

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Brycon orbignyanus* EM  
SISTEMA REPRODUTIVO SEMINATURAL**

**Autor: Nelson Mauricio Lopera Barrero  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro**

**MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Dezembro – 2007**

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

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Brycon orbignyanus* EM  
SISTEMA REPRODUTIVO SEMINATURAL**

**Autor: Nelson Mauricio Lopera Barrero  
Orientador: Prof. 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  
Dezembro – 2007**

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

L864d Lopera Barrero, Nelson Mauricio  
Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural / Nelson Mauricio Lopera Barrero. -- Maringá : [s.n.], 2007.  
92 f. : il. color., figs., tabs., retrs.

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

1. *Brycon orbignyanus*. 2. Diversidade genética. 3. Conservação genética. 4. RAPD e microssatélites. 5. Piracanjuba. I. Universidade Estadual de Maringá. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

CDD 21.ed. 639.31



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Brycon orbignyanus* EM  
SISTEMA REPRODUTIVO SEMINATURAL**

Autor: Nelson Mauricio Lopera Barrero  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção  
Animal

APROVADA em 11 de dezembro de 2007.

Prof.ª Dr.ª Claudete Aparecida  
Mangolin

Prof. Dr. Danilo Pedro  
Streit Junior

Dr. Rodolfo Nardez Sirol

Dr. Jayme Aparecido Povh

  
Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro  
(Orientador)

“Só Deus sabe para onde nossos passos vão levar a nossa vida. O que realmente importa nessa caminhada é saber enfrentar a inexperiência do primeiro passo, ter a suficiente coragem de encarar todos os outros e nunca ter medo, nem perder a fé ao dar o último”

Nelson Mauricio Lopera Barrero

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

Aos meus pais, Pompilio Lopera e Eufrosina Barrero,  
pelo amor, carinho e apoio que me deram durante minha vida toda,  
sem ter medido esforços nem sacrifícios na minha educação.  
Agradeço a vocês por ser essa luz que sempre iluminou meu caminho.

Aos meus irmãos, Mario Fernando e Carlos Andrés,  
por sempre me motivar, ajudar e apoiar em minhas lutas,  
e me dar a alegria de ser tio e padrinho de meus amados Juan Felipe,  
Juan Esteban e Santiago.

À minha namorada, Angela Rocio Poveda Parra,  
pelo amor, carinho, compreensão, incentivo e confiança.

Ao meu adorado filho, Diego Mauricio Lopera Poveda, indubitavelmente  
a razão mais forte da minha existência e luta neste mundo

A todos meus amigos,  
por sua grande amizade e por estar sempre comigo  
nos momentos de alegria e sofrimento

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e ao “Divino Niño Jesus” por estar sempre comigo, me apoiar nos momentos difíceis e me guiar pelo caminho do bem. Sem eles nunca teria chegado aqui.

Aos meus pais, Pompilio Lopera e Eufrosina Barrero, por ter ensinado muitos valores que dia-a-dia, levam-me a atuar com dignidade, humildade, respeito, fé e profissionalismo.

Aos meus irmãos, Mario Fernando Lopera e Carlos Andrés Lopera, por sempre me apoiar nas idéias e nos momentos difíceis e por me brindar uma grande amizade e companhia.

Aos meus queridos sobrinhos Juan Felipe, Juan Esteban e Santiago, por dar a alegria de ser tio e padrinho e ao mesmo tempo fazer lembrar a inocência que tem cada palavra, cada gesto, cada expressão.

À toda minha família e a todas essas pessoas que nunca me deixaram sozinho neste caminho da vida.

À minha namorada, Angela Rocio Poveda Parra, por compartilhar comigo grandes momentos de luta, amor e felicidade. Obrigado por me dar a oportunidade única de ser pai.

Ao meu filho, Diego Mauricio Lopera Poveda, por representar o mais maravilhoso da minha vida, por me dar uma nova luz nesta vida cheia de desafios e obstáculos.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro por seus ensinamentos, por mostrar o caminho do conhecimento desde o momento que decidi me orientar, pela amizade, pelo apoio.

Ao grande amigo, Jayme Aparecido Povh, por sua imensa ajuda e companhia em todos os momentos, sem dúvida, o melhor amigo que tive e que terei em toda minha vida.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claudete Aparecida Mangolin do Departamento de Biologia, que sempre direta ou indiretamente foi uma ajuda fundamental na conclusão deste trabalho.

A todos meus amigos e colegas de curso, em especial a Nelson Fukumoto, Patrícia Faquinello, Patrícia Gomes e Danilo Streit Jr.

Em memória da minha querida tia Nelly, Orlando Giglioli, Pablo Ernesto Cedeño e do Dr. Francisco Segura.

À Zeni Barbosa, técnica de laboratório, por sua companhia e ajuda.

Ao Prof. Dr. Lauro Vargas e à Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliane Gaspararino pela ajuda e apoio.

Aos funcionários do PPZ, DZO, laboratório de nutrição e da Estação de Piscicultura.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ).

A CNPq, pela bolsa de estudo concedida no doutorado.

À Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema) por terem cedido as amostras do experimento. Ao Dr. Rodolfo Nardez Sirol e aos funcionários Edmilson Pelisar e Mauro Jardim.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais esta jornada da minha vida.





## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
FIGURAS DO APÊNDICE.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
I - INTRODUÇÃO GERAL.....	01
1.1. <i>Brycon orbignyana</i> .....	02
1.2. Rio Paranapanema.....	05
1.3. Reprodução de espécies migratórias e estratégias reprodutivas.....	07
1.3.1. Identificação dos estoques.....	07
1.3.2. Acasalamento e razão sexual.....	10
1.3.3. Sistemas reprodutivos.....	11
1.4. Genética e Biotecnologia na piscicultura.....	14
1.4.1. Marcador molecular RAPD.....	15
1.4.2. Marcador molecular microssatélite.....	16
1.4.3. Conservação genética de peixes.....	17
1.4.3.1. Coleta e preservação de amostras.....	17
1.4.3.2. Variabilidade e estrutura genética.....	19
1.4.3.3. Análise da paternidade e da contribuição reprodutiva.....	20
1.4.3.4. Monitoramento genético de programas de repovoamento.....	22
1.5. Conservação do <i>Brycon orbignyana</i> .....	25
1.6. Referências.....	26

II - OBJETIVOS GERAIS.....	36
III - EFEITO DO SISTEMA SEMINATURAL E DO ACASALAMENTO EM PROPORÇÕES IGUAIS DE SEXO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DO <i>Brycon orbignyanus</i> .....	37
Resumo .....	38
Resumen.....	38
Abstract.....	39
Introdução .....	40
Material e Métodos .....	41
Resultados e Discussão .....	45
Conclusões .....	51
Agradecimentos .....	51
Literatura Citada .....	51
IV – DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA PROGÊNIE DE PIRACANJUBA NO SISTEMA SEMINATURAL EM PROPORÇÕES DESIGUAIS DE SEXO.....	55
Resumo .....	56
Abstract.....	56
Introdução .....	57
Material e Métodos .....	59
Resultados e Discussão .....	62
Conclusões .....	67
Agradecimentos .....	67
Referências.....	67
V - DIVERSIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DE UMA PROGÊNIE DE <i>Brycon orbignyanus</i> UTILIZADA EM PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO NO SISTEMA REPRODUTIVO SEMINATURAL .....	71
Resumo .....	72
Abstract.....	72
1. Introdução .....	73
2. Material e Métodos .....	74
3. Resultados.....	78
4. Discussão .....	81

5. Conclusão.....	84
Agradecimentos .....	85
Referências.....	85
VI - CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	89
VII - APÊNDICES.....	90

## LISTA DE TABELAS

	Página
III - EFEITO DO SISTEMA SEMINATURAL E DO ACASALAMENTO EM PROPORÇÕES IGUAIS DE SEXO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DO <i>Brycon orbignyana</i> .....	37
TABELA 1 - Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> , porcentagem de G+C e número e tamanho dos fragmentos amplificados para os parentais e a progênie de <i>Brycon orbignyana</i> .....	45
IV - DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA PROGÊNIE DE PIRACANJUBA NO SISTEMA SEMINATURAL EM PROPORÇÕES DESIGUAIS DE SEXO.....	55
TABELA 1 - Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> , porcentagem de G+C e número e tamanho dos fragmentos amplificados para os parentais e a progênie de <i>B. orbignyana</i> .....	63
V - DIVERSIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DE UMA PROGÊNIE DE <i>Brycon orbignyana</i> UTILIZADA EM PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO NO SISTEMA REPRODUTIVO SEMINATURAL .....	71
TABELA 1 - Número, tamanho em pares de bases (pb) e frequência dos alelos para os parentais e a progênie de <i>B. orbignyana</i> , no sistema reprodutivo seminatural.....	78
TABELA 2 - Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e teste de probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P_{HW}$ ) estimados nos parentais e na progênie de <i>B. orbignyana</i> , no sistema reprodutivo seminatural. ....	79

## LISTA DE FIGURAS

	Página
I - INTRODUÇÃO GERAL .....	01
FIGURA 1 - Características externas da piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> ).....	02
FIGURA 2 - Utilização do <i>Transponder</i> como método de marcação dos reprodutores de <i>Brycon orbignyanus</i> .....	10
FIGURA 3 - Sistema reprodutivo por extrusão utilizado em espécies migradoras.....	12
FIGURA 4 - Sistema reprodutivo seminatural utilizado em espécies migradoras.....	13
FIGURA 5 - Coleta e preservação de amostras de nadadeira de <i>B. orbignyanus</i> .....	18
FIGURA 6 - Fluxograma do manejo de estoques de <i>B. orbignyanus</i> mantidos em ambientes controlados.....	26
III - EFEITO DO SISTEMA SEMINATURAL E DO ACASALAMENTO EM PROPORÇÕES IGUAIS DE SEXO NA DIVERSIDADE GENÉTICA DO <i>Brycon orbignyanus</i> .....	37
FIGURA 1 - Localização da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da <i>Duke Energy International</i> (Geração Paranapanema) e da cidade de Castilho, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.....	42
FIGURA 2 - Índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos para os parentais e a progênie do acasalamento de <i>B. orbignyanus</i> .....	46
FIGURA 3 - Divergência genética obtida para os parentais e a progênie do acasalamento de <i>B. orbignyanus</i> .....	47

IV - DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA PROGÊNIE DE PIRACANJUBA NO SISTEMA SEMINATURAL EM PROPORÇÕES DESIGUAIS DE SEXO.....	55
FIGURA 1 - Localização da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da <i>Duke Energy International</i> (Geração Paranapanema) e da cidade de Castilho, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.....	59
FIGURA 2 - Índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos para os parentais e a progênie do sistema de acasalamento de <i>B. orbignyana</i> ... ..	64
FIGURA 3 - Divergência genética obtida para os parentais e a progênie do acasalamento de <i>B. orbignyana</i> ... ..	64
V - DIVERSIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DE UMA PROGÊNIE DE <i>Brycon orbignyana</i> UTILIZADA EM PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO NO SISTEMA REPRODUTIVO SEMINATURAL .....	71
FIGURA 1 - Localização da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da <i>Duke Energy International</i> (Geração Paranapanema) e da cidade de Castilho, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.....	75
FIGURA 2 - Contribuição parental da progênie de <i>B. orbignyana</i> no sistema reprodutivo seminatural.....	80
FIGURA 3 - Composição das famílias na progênie de <i>B. orbignyana</i> no sistema reprodutivo seminatural.....	80

## FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
VI - APÊNDICES.....	90
FIGURA 1 - Análise dos fragmentos de RAPD produzidos a partir da amplificação com o <i>primer</i> OPW03, separados em gel de agarose 1,5%.....	91
FIGURA 2 - Análise dos alelos de microssatélite produzidos a partir da amplificação com o loco BoM2, separados em gel de poliacrilamida desnaturante (10%).....	92



## RESUMO

Diversos fatores ecológicos, climáticos e especialmente aqueles relacionados com ações humanas têm levado ao desaparecimento de populações naturais de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*). Pela importância nos ecossistemas nos quais está localizada, e por suas qualidades de crescimento rápido e boa adaptação à ambientes controlados, nos últimos anos o interesse dos produtores na utilização dessa espécie migradora tem aumentado, objetivando a produção e a participação em programas de conservação e repovoamento. Na implantação de programas de repovoamento como estratégias de conservação o monitoramento genético, a avaliação de procedimentos reprodutivos e o apoio científico de diferentes áreas são necessários para obter uma correta manutenção e uma maior objetividade deste tipo de programas. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do sistema reprodutivo e do sistema seminatural na diversidade genética e na contribuição parental de progênies de *B. orbignyianus*, destinadas a programas de repovoamento do rio Paranapanema com os marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites. Os resultados mostraram um aumento da variabilidade genética, quando foi utilizada uma proporção igual de sexo, possivelmente devido ao número efetivo de reprodutores usados no acasalamento e ao sistema reprodutivo seminatural. O sistema seminatural possibilitou a preservação dos reprodutores no processo reprodutivo. Foi verificada a ocorrência de paternidade múltipla e de dominância reprodutiva. Estes resultados forneceram informações que contribuirão para o desenvolvimento de modelos de manejo do *B. orbignyianus*, garantindo um correto monitoramento genético e reprodutivo que são importantes para uma segura conservação da espécie.

## ABSTRACT

Several ecological and climatic factors and especially those related to man's actions have led to the disappearance of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) natural populations. For the importance of the ecosystems in which it is located and by its qualities of fast growth and good adaptation to controlled environments, in the last years the producer's interest in the use of such migratory species has increased, aiming the production and the participation in conservation and stock enhancement programs. In the implementation of management and stock enhancement programs as conservation strategies, the genetic monitoring, the evaluation of reproductive procedures and the scientific support of different areas are necessary to obtain a correct maintenance and a greater objectivity of such programs. The purpose of this study was to evaluate the influence of the reproductive and semi-natural systems in the genetic diversity and the parental contribution of *B. orbignyanus* offspring's destined to stock enhancement programs of the Paranapanema River with the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) and microsatellites molecular markers. The results showed an increase of the genetic variability when an equal proportion of sex was used, possibly due to the effective broodstock number used in the mating and the semi-natural reproductive system. The semi-natural system allowed the preservation of the reproducers in the reproductive process. The occurrence of multiple paternities and the reproductive dominance was verified. These results provide information's that will contribute to the development of management models in *B. orbignyanus*, ensuring a correct genetic and a reproductive monitoring that are important for a safe conservation of the specie.

## **I. INTRODUÇÃO GERAL**

A produção mundial de pescados superou em 2005 o volume de 200 milhões de toneladas e manteve um crescimento ascendente, apesar dos limites de recomposição dos estoques naturais; este resultado deve-se à crescente participação da aquicultura, que chegou a alcançar os 62,4 milhões de toneladas (FAO, 2005). Nos últimos dez anos, a produção em aquicultura apresentou crescimento anual de cerca de 11%, e de modo diferente do cultivo de plantas e da produção de animais, a indústria da aquicultura baseou-se somente em processos de hibridação e seleção para aumentar a produtividade de poucas espécies (Porto-Foresti e Foresti, 2004).

No Brasil, no ano 2005, a aquicultura marinha e continental obteve uma produção estimada de 257.780 toneladas, representando 25,55% da produção total de pescados no país (estimada em 1.009.073 toneladas). A região Nordeste e a região Sul participaram com 36,60% e 29,84% do total (SEAP, 2007). Pode-se observar com a trajetória que a aquicultura mundial e brasileira vem traçando, que existem vários padrões de crescimento, sendo que nos últimos 15 anos as modalidades de piscicultura e carcinicultura marinha estão apresentando grandes progressos.

Apesar da produtividade da aquicultura ainda ser modesta quando comparada com programas de produção de animais terrestres, a disponibilidade de proteína animal no futuro pode depender do correto desenvolvimento e do monitoramento da exploração dos recursos da aquicultura continental e marinha. Os peixes são importantes por serem uma relevante fonte de proteínas para várias comunidades humanas, e por apresentarem características de adaptação a ambientes controlados. Por isso, nos últimos anos o interesse dos produtores na utilização de espécies nativas com apreciáveis características zootécnicas tem aumentado, objetivando a produção, a melhora econômica e a participação em programas de melhoramento e repovoamento, onde,

além da aplicação de estratégias de monitoramento e de exploração, a utilização de diversas ferramentas biotecnológicas podem ser propostas.

### 1.1. *Brycon orbignyanus*

Os estudos visando o aproveitamento dos *Brycon* na piscicultura brasileira tiveram início com Ihering na década de 1930, mas foi somente a partir da década de 1990, mais precisamente em 1994, com a realização do “I Seminário sobre criação de espécies do gênero *Brycon*” que vários grupos de pesquisadores começaram a intensificar os estudos. Esses estudos objetivaram não somente a viabilização dos *Brycon* na piscicultura, mas também viabilizar programas de repovoamento em regiões onde estavam ameaçados de extinção (Sampaio et al., 2004).

Composto por mais de 60 espécies (Lima, 2003), o gênero *Brycon* está sendo utilizado em produções comerciais no Brasil e em programas de repovoamento (Borba et al., 2006). Dentre os peixes deste gênero, apontados como grande potencial para a piscicultura nacional nos últimos anos, a matrinxã (*Brycon cephalus*) e a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), são incluídas como as duas espécies mais promissoras (Wasko, 2005).

A piracanjuba (*B. orbignyanus*) (Valenciennes, 1849), conhecida também em outras regiões como bracanjuba, é uma espécie migratória nativa das bacias formadas pelos rios Uruguai (Zaniboni-Filho e Schulz, 2003) e Paraná (Ganeco et al., 2001) (Figura 1).



**Figura 1.** Características externas da piracanjuba (*B. orbignyanus*).

Pertencente à Ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae, é um peixe muito apreciado pelo elevado valor nutricional e sabor agradável da sua carne, crescimento rápido, boa conversão alimentar e boa aceitação a ração artificial e subprodutos agro-industriais quando em cativeiro (Borba et al., 2006; Ninhaus-Silveira et al., 2006). Characiformes é o grupo de peixes com dominância em água doce, compreendendo formas herbívoras, onívoras, iliófagas e carnívoras. Os peixes desta ordem estão restritos à América do Sul (90%) e África, embora algumas espécies tenham alcançado a América Central (Sampaio et al., 2004). No Brasil, existem aproximadamente 1.300 espécies distribuídas em 16 famílias.

*B. orbignyanus* é um peixe de escamas, de corpo fusiforme e comprimido, com boca ampla e terminal (Britto et al., 2003), caracterizada pela presença de três séries de dentes no pré-maxilar, dois no dentário e um no maxilar, o qual apresenta dentes em quase toda sua extensão. Apresenta uma coloração prateada, dorso castanho-escuro com reflexos esverdeados e uma grande mancha na base do pedúnculo caudal que se estende até os raios caudais medianos. Possui uma nadadeira caudal vermelha bifurcada com uma faixa mediana bem escura e uma nadadeira anal longa da mesma cor. Este peixe pode atingir até 80 cm de comprimento corporal e 10 kg de peso.

É uma espécie onívora e na natureza alimenta-se preferencialmente de frutos, sementes, flores e folhas. Estudos mostram que esta espécie apresenta uma grande capacidade digestiva de assimilação de proteínas vegetais (Sá e Fracalossi, 2002).

Esta espécie realiza migrações reprodutivas no período de novembro a janeiro, período no qual o alimento é mais abundante, garantindo a sobrevivência da progênie. A estratégia de realizar migrações entre os locais de alimentação e desova permite que algumas espécies de peixes maximizem o aproveitamento do ecossistema, buscando os melhores locais para cada uma das etapas do ciclo de vida (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007). Geralmente isso acontece em estações chuvosas, com altas temperaturas e dias longos, que permitem a produção de elevadas quantidades de plâncton.

A maturação sexual é influenciada por vários fatores, entre eles a temperatura da água, sendo atrasada ou adiantada de acordo com o frio do inverno (Zaniboni-Filho e Schulz, 2003), mas de modo geral o macho se reproduz a partir dos dois anos de idade e a fêmea a partir dos três anos. Os machos de *B. orbignyanus* apresentam como característica sexual uma aspereza na nadadeira anal, devido a presença de espículas na

época da reprodução (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). Essa espécie apresenta uma desova total, onde seus ovos semidensos dependem de águas fluentes durante a fase inteira de incubação e nos estágios iniciais de desenvolvimento larval (Oliveira et al., 2004).

As pós-larvas do *B. orbignyanus* mostram-se influenciadas pelo fotoperíodo, apresentando maiores valores de sobrevivência aquelas pós-larvas expostas a longos períodos de luz. São carnívoras, selecionando alimento do zooplâncton e mostram uma tendência ao canibalismo durante as etapas pós-larval e larval (Reynalte-Tataje et al., 2002a), sendo que a mudança para o hábito alimentar onívoro e herbívoro provavelmente ocorre em peixes juvenis. Esta característica traz dificuldades na sua reprodução em cativeiro, sendo necessário um cuidadoso manejo nutricional na fase inicial de crescimento, em programas de produção e repovoamento.

*B. orbignyanus* tem despertado grande interesse de pesquisadores e produtores, em função de nos últimos anos ter apresentado uma redução drástica nas populações naturais (Zaniboni-Filho et al., 2006) e, portanto apresenta risco de extinção (Machado, 2005; Lopera-Barrero et al., 2006; Borba et al., 2006). Apesar de apresentar características zootécnicas que constituem ótimos indicadores para seu cultivo, ainda não existe tecnologia disponível para sua criação intensiva (Carmo e Fracalossi, 2002), e nem para estudos de propagação artificial, que são úteis para programas de repovoamento controlado.

Devido a sua adaptação às bacias de origem, existe uma baixa tolerância dessa espécie a alterações ambientais. O desmatamento ao longo das margens dos rios, redução das fontes de alimento, construção de barragens e drenagens para aproveitamento agrícola, degradação da qualidade da água em função da poluição (Martinelli et al., 2002; Monteiro et al., 2006; Hori et al., 2006) e eco-turismo mal planejado, são possivelmente causas da redução do *B. orbignyanus*. Já que é considerado um dos peixes mais apreciados na pesca esportiva, a captura intensiva predatória também é uma causa importante. Tundisi (2003) relatou outros fatores que podem ameaçar a biodiversidade aquática, como por exemplo, o tratamento inadequado da água e dos esgotos nas grandes cidades, a agricultura, indústrias, irrigação, aqüicultura e pecuária intensiva.

Por ser uma espécie em alto risco de extinção, *B. orbignyanus* pode ser catalogado como espécie indicadora, já que um aumento das populações nos rios onde se encontra é

indicativo do sucesso dos programas de repovoamento ou conservação do ecossistema, demonstrado pela sobrevivência e adaptação dos indivíduos ao ambiente. Por outro lado, a falta de estabelecimento desse peixe e o impacto negativo no ecossistema são considerados um fracasso do programa.

“Espécies indicadoras” ou “indicadores ecológicos” podem ser definidos como parâmetros biológicos, baseados em populações, conjunto de populações ou propriedades sistêmicas, que por suas características qualitativas e/ou quantitativas, retratam o estado de um sistema ecológico, permitindo detectar e monitorar eventuais mudanças nesse sistema ao longo do tempo (Dale e Beyeler, 2001). Frequentemente, seu desenvolvimento é baseado em um grande conjunto de descrições, que são dados qualitativos e quantitativos que descrevem aspectos bióticos, abióticos ou antrópicos do ambiente (Metzger e Casatti, 2006).

O excelente desempenho do *B. orbignyanus* em cativeiro e seu valor comercial despertaram grande interesse para estudos direcionados ao desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias para sua criação. Nos últimos anos, além das linhas de alimentação e nutrição (Borba et al., 2006; Zaniboni-Filho et al., 2006), fisiologia e comportamento (Reynalte-Tataje et al., 2002a), também têm sido desenvolvidas análises de células germinativas e técnicas de criopreservação de esperma (Ganeco et al., 2001; Murgas et al., 2004). Análises genéticas (Wasko e Galetti Jr, 2003; Lopera-Barrero et al., 2006) e de citogenética (Wasko et al., 2001) mostram-se importantes para a elaboração de cruzamentos planejados do *B. orbignyanus* (Wasko, 2005) e na determinação da variabilidade genética de populações naturais e estocadas. Para as outras espécies do gênero *Brycon*, estudos determinando a análise de densidade de estocagem (Brandão et al., 2005), produção (Mateus e Estupiñan, 2002), técnicas de criopreservação de esperma (Ninhaus-Silveira et al., 2006; Velasco-Santamaría et al., 2006), análises genéticas em estoques e populações naturais (Hilsdorf et al., 2002; Wasko e Galetti Jr., 2002; Wasko et al., 2004; Sanches e Galetti Jr, 2006; Lopez, 2006) e de citogenética (Hilsdorf e Krieger, 2004) também têm sido realizados.

## **1.2. Rio Paranapanema**

O habitat de várias espécies de peixes tem sido afetado por vários fatores que alteram os ambientes de procriação, e que criam barreiras para caminhos de dispersão

natural de peixes migradores, eliminando assim a oportunidade para que fluxo gênico entre populações de peixes aconteça (Bert et al., 2002). A pesca industrial ligada à sobrepesca tem contribuído igualmente no desaparecimento de espécies autóctones (Ayllon et al., 2006), que para comunidades ribeirinhas muitas vezes é a única fonte de proteína disponível (Hilsdorf et al., 2006). O processo evolutivo e de adaptação das espécies de peixes, depende das circunstâncias ambientais as quais o genoma se depara especialmente aqueles ambientes artificiais que o homem tem criado por necessidade. Se atualmente não for realizado um adequado manejo das espécies naturais, a pressão contra a sua sobrevivência será cada vez mais forte e seu desaparecimento estará praticamente assegurado (Pineda-Santis, 2004).

Ao longo do trajeto dos rios, variações hidrológicas, geomorfológicas e biológicas podem ser observadas. Essas mudanças, quando ocorrem de forma natural, podem sustentar uma comunidade biológica que vive em equilíbrio com tais alterações ambientais. Porém, uma interrupção no curso da água, por exemplo, com a construção e instalação de barragens, pode quebrar essa seqüência de características, forçando conseqüentemente uma adaptação das comunidades biológicas as novas condições impostas (Santos et al., 2006).

Apesar da inegável auto-suficiência em energia que é fornecida pela construção de hidroelétricas no Brasil, a interrupção da migração dos peixes causada por este represamento é considerada um prejuízo na sua reprodução e multiplicação nos rios (Britto e Sirol, 2006), razão pela qual são necessárias pesquisas em regiões impactadas. Atualmente, a grande maioria dos rios do país apresenta este tipo de construções. Entre esses rios, pode-se citar o Paranapanema.

O Rio Paranapanema é um importante afluente do rio Paraná, com uma bacia de 100.800 km<sup>2</sup> que drena as regiões sudoeste de São Paulo e noroeste do Paraná, servindo ainda como divisor entre os dois estados. O desnível de 570 m, ao longo dos 929 km de extensão do rio foi intensamente aproveitado para a exploração de energia hidroelétrica (Nogueira et al., 2006). Atualmente, este rio possui 10 usinas em operação, o que transformou seu curso original em uma sucessão de reservatórios justapostos (usina hidrelétrica (UHE) Jurumirim, UHE Piraju, UHE Paranapanema, UHE Chavantes, UHE Salto Grande, UHE Canoas 2, UHE Canoas 1, UHE Capivara, UHE Taquaruçú 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 e Rajiformes) e um total de 155 espécies identificadas (Britto et al., 2003) e algumas outras ainda desconhecidas (Castro et al., 2003). Várias destas espécies têm apresentado uma diminuição das populações naturais, onde *B. orbignyanus* é raramente encontrado (Britto et al., 2003).

### **1.3. Reprodução de espécies migradoras e estratégias reprodutivas**

Embora o Brasil tenha uma rica fauna ictiológica e condições geográficas excepcionais, somente algumas espécies vêm sendo pesquisadas objetivando a sua utilização na piscicultura. Dentre estas, existe um grupo que abrange a maior parte das espécies nativas, e que necessita realizar migrações (piracema) rumo as cabeceiras dos rios para a reprodução, sendo denominados peixes reofilicos ou migradores. Entre esses encontra-se o *B. orbignyanus* (Furuya e Furuya, 2001).

O desenvolvimento da piscicultura mundial esteve centrado, durante séculos, no cultivo de peixes que se reproduzem naturalmente em ambientes lentos, apesar dos peixes migradores via de regra, apresentarem maior preço de mercado. Essa tendência foi motivada pela dificuldade da indução à desova dessas espécies (Zaniboni-Filho e Weingartner, 2007).

Assim, a possibilidade de uma espécie de peixe reproduzir-se naturalmente em cativeiro, foi considerada durante vários anos uma característica desejável para esta espécie ser destinada ao cultivo. Por isso, é necessário analisar de que maneira o cativeiro e o manejo afetam as funções fisiológicas e hormonais dos peixes, e como este processo pode desencadear problemas reprodutivos. A criação em cativeiro torna imprescindível a utilização de técnicas de marcação e indução à desova, com a obtenção de progênies com bom desempenho que possam ser utilizadas para os programas de melhoramento, formação de estoques ou programas de repovoamento.

#### **1.3.1. Identificação dos estoques**

Em peixes, a marcação é uma estratégia importante para o estabelecimento de um histórico individual dos animais utilizados em estudos de melhoramento genético, tanto

em processos experimentais quanto de produção em escala comercial. Também é necessário ressaltar a importância desse método em estudos da dinâmica de populações de peixes em ambientes naturais (Faria et al., 2003). Esta necessidade é uma exigência básica para muitos estudos que visam o conhecimento de diversas relações destes animais com o meio ambiente.

O desenvolvimento de várias formas de marcação de peixes tem sido uma premissa para vários estudos, já que fazem parte importante do sucesso e da finalidade da pesquisa. Vários tipos de marcadores são desenvolvidos continuamente para melhorar as práticas que envolvem permanência, facilidade de identificação e efeito no comportamento dos peixes (Parker et al., 1990). O tipo de marcação utilizado e suas características vão depender diretamente de cada espécie, do comportamento e fisiologia dos indivíduos no ambiente ao qual vão ser expostos, das condições de estresse ou densidade de estocagem, do tamanho dos peixes e do número de indivíduos identificados, requeridos para o estudo. Segundo Faria et al. (2003) outro fator que pode ser considerado na marcação é a porção de tecido afetado, verificando se chega provocar um estresse momentâneo ou prolongado e se o animal após a marcação terá riscos de infecção ou abscessos.

Existem dois tipos de marcação: a marcação não invasiva e a marcação invasiva. A marcação não invasiva faz referência a técnicas nas quais não são usados métodos que causem injúrias nos peixes. Entre as mais usadas estão a remoção de parte das nadadeiras, utilização de miçangas ou fios e a marcação em frio.

A remoção total ou parcial de nadadeiras é uma técnica não invasiva bastante utilizada em cultivo comercial (Sire et al., 2000) e durante a indução hormonal na reprodução (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004), devido a ausência de custos e simplicidade da operação. Porém, oferece riscos aos animais em caso de negligência, além de apresentar restrição no número de combinações e limitado tempo de duração pela rápida regeneração. Outra técnica não invasiva utilizada é a marcação em frio, que segundo Harvey e Carolsfeld (1993), não afeta o comportamento e tem um tempo de marcação mais longo.

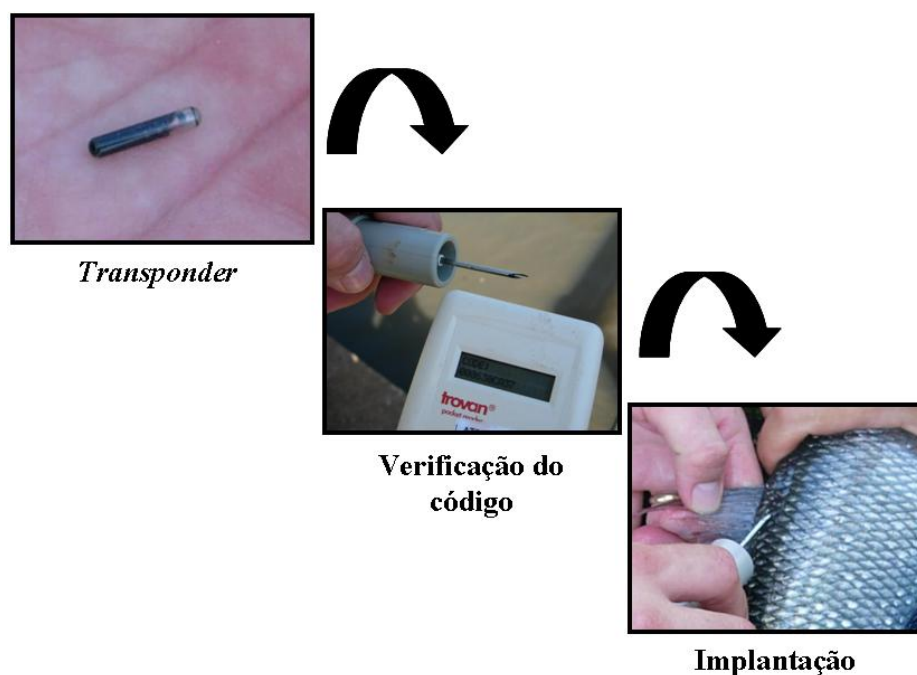
A marcação invasiva pelo contrário, produz lesões superficiais ou internas nos peixes, mas em contrapartida, estas marcas ficam fixadas com firmeza por mais tempo e têm menos possibilidades de ser removidas. Estas marcas devem ser necessariamente presas através da musculatura ou dos ossos, apresentando o risco de aparecimento de

infecções, porém, é o tipo de marcação mais usado na piscicultura. Identificações desse tipo são as marcações externas, onde miçangas, etiquetas de náilon, contas, pérolas e a regeneração de escamas têm sido usadas (Sire et al., 2000; Leboute et al., 2002; Faria et al., 2003; Ferraz et al., 2004) e as marcações internas.

Apesar dos riscos, a marcação interna é mais segura do que a externa, já que permanece no local de identificação por longos períodos de tempo e a possibilidade de serem expelidas é mínima. Marcações internas utilizadas são os elastômeros (Harvey e Carolsfeld, 1993) ou os marcadores eletrônicos.

Os marcadores eletrônicos ou também chamados de PIT (*Passive Inductive Transponder*) ou *transponders* são os mais utilizados e recomendados apesar de apresentar um custo elevado, o que impossibilita e limita sua viabilidade na utilização por grande parte dos produtores. Estas marcas podem ser implantadas no músculo (normalmente próximo à nadadeira dorsal) ou na cavidade peritoneal e apresentam como vantagens seu reduzido tamanho (parecido com um grão de arroz), efetiva identificação de grande número de animais, seu reaproveitamento e a baixa chance de serem expelidos. Testando vários métodos de marcação, Basavaraju et al. (1998) encontraram que a combinação entre elastômero/remoção parcial de nadadeiras e a utilização de PIT na identificação de linhagens e reprodutores de *Catla catla* foi satisfatória e apresentou boas taxas de retenção.

É importante ressaltar que durante o processo de reprodução induzida de peixes, a identificação dos reprodutores é uma etapa fundamental para distinguir indivíduos que receberão diferentes quantidades de hormônio. Além disso, a identificação durante a seleção dos peixes possibilita o controle do desempenho reprodutivo de cada exemplar do plantel, a avaliação do desempenho das desovas obtidas, a medição de informações genéticas individuais, a coleta organizada de amostras de cada peixe e a formação de bancos de germoplasma. Apesar do seu relativo custo e do treinamento necessário para sua colocação, em *Brycon orbignyana* a marcação com *transponder* tem sido utilizada com sucesso (Figura 2).



**Figura 2.** Utilização do *Transponder* como método de marcação dos reprodutores de *Brycon orbignyanus*.

### 1.3.2. Acasalamento e razão sexual

O acasalamento é manejado comumente de maneira aleatória na reprodução artificial de estoques mantidos em cativeiro. Muitas pisciculturas durante a formação do acasalamento utilizam uma quantidade maior de machos ou sêmen de mais de um macho na fertilização dos ovócitos das fêmeas. Este procedimento é bastante utilizado com a finalidade de compensar a baixa qualidade e quantidade do sêmen que alguns dos machos oferecem após a indução hormonal, resultado possivelmente atribuído às condições de estresse que os animais passam durante o processo reprodutivo. Apesar da sua finalidade positiva, pode existir a possibilidade desse acasalamento ocasionar perda da variabilidade genética e diminuição da viabilidade e sobrevivência dos estoques e progênes na piscicultura, isto devido ao direcionamento reprodutivo não intencional e ao estresse.

Segundo Moreira (2001) um grande problema da piscicultura é o cruzamento de indivíduos aparentados, aumentando deste modo a homozigose nos estoques. Este cruzamento ocorre mais comumente em estoques de reprodutores com pequeno número efetivo de reprodutores e fechados, onde depois de algumas gerações a variação

genética tende a diminuir (Povh et al., 2005), podendo afetar a produtividade. O número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) são aqueles animais em idade de reprodução que apresentam capacidade de deixar uma descendência viável. Quanto maior for o  $N_e$ , menores as chances da ocorrência de problemas relacionados a consangüinidade do estoque.

Para manter o potencial genético de um estoque ou população de reprodutores, Moreira (2001) e Frost et al. (2006) recomendaram manter o  $N_e$  tão grande quanto possível e desovar igual razão de sexos (1:1), o que na teoria pode manter a variabilidade genética no plantel.

Alguns trabalhos têm demonstrado a influência do acasalamento na variabilidade genética de estoques na piscicultura. Povh (2007) comparando o sistema de desova seminatural e por extrusão em um estoque de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), encontrou um aumento da variabilidade genética no estoque manejado pelo sistema seminatural (índice de Shannon = 0,365 e % Fragmentos Polimórficos = 60,5%), utilizando uma razão de sexo 1:1.

### **1.3.3. Sistemas reprodutivos**

Considerando-se as espécies migradoras tropicais, existem dois sistemas reprodutivos definidos por Zaniboni-Filho e Nuñez (2004), o seminatural e o por extrusão.

O sistema reprodutivo por extrusão é um dos mais utilizados no Brasil (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004). Este sistema apresenta como vantagens a não utilização de tanques de reprodução ou desova, permite o fácil manejo dos gametas destinados para programas de melhoramento e seleção e reduz a mão-de-obra necessária no procedimento.

Deve ser observado que algumas espécies são mais dóceis e não apresentam muitos problemas na manipulação, como por exemplo, o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), o curimba (*Prochilodus lineatus*) e espécies do gênero *Colossoma*. Em geral, as espécies do gênero *Brycon* são animais muito sensíveis e passam por grande estresse nesse manejo reprodutivo, podendo apresentar altas taxas de mortalidade.

No sistema reprodutivo por extrusão, as fêmeas e machos após indução hormonal, são colocados numa superfície macia, sendo manipulados utilizando um pano úmido

para reduzir o estresse ao contato com as mãos. Em seguida, é realizado um processo de massagem abdominal, pressionando o corpo do animal no sentido encéfalo-caudal, observando a ocorrência de liberação de ovócitos nas fêmeas ou liberação do esperma nos machos. Os ovócitos e espermatozóides são coletados em recipientes separados e secos, sendo em seguida misturados com 15 % de água sobre o peso total dos ovócitos, iniciando o processo de fertilização. Posteriormente, os ovos (já fertilizados) são colocados em incubadoras, com fluxo constante de intercâmbio de água, terminando o processo com a eclosão (Figura 3).

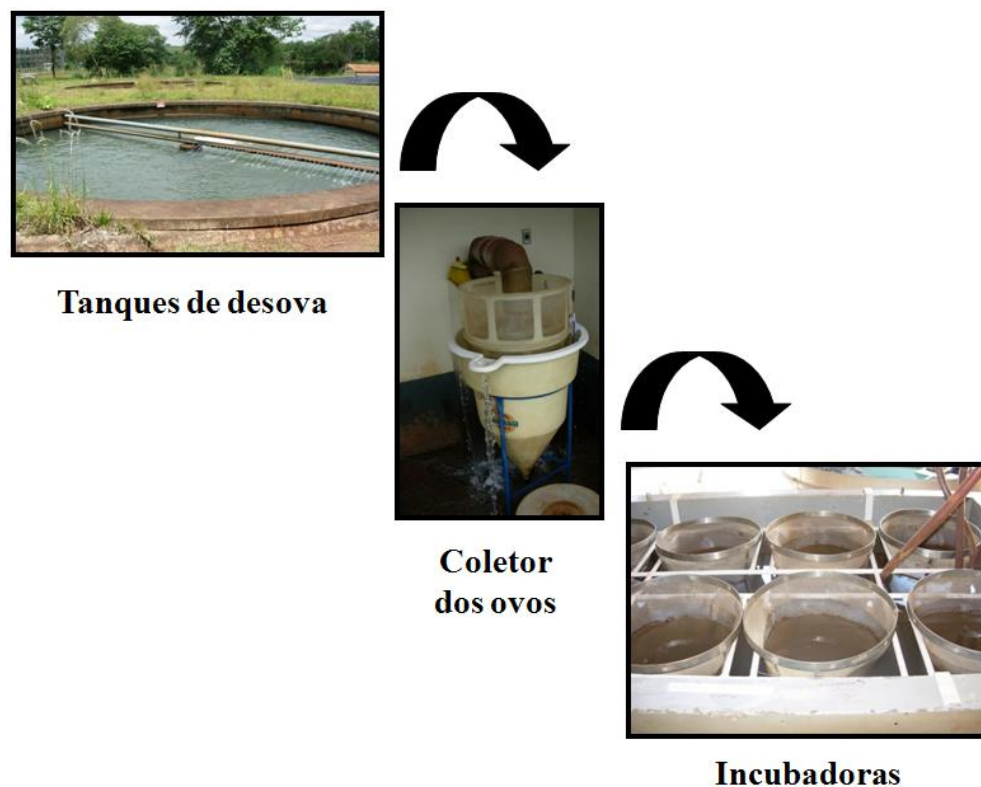


**Figura 3.** Sistema reprodutivo por extrusão utilizado em espécies migradoras.

O sistema reprodutivo seminatural caracteriza-se pela pouca interferência do produtor no processo reprodutivo, simulando condições reprodutivas naturais. Nesta técnica, as matrizes e reprodutores após indução hormonal, são colocados dentro de um tanque de reprodução (simulando condições ambientais satisfatórias), onde diretamente

ocorre a fertilização dos ovócitos pelos machos de forma aleatória. Este sistema permite um melhor arranjo alélico pela participação múltipla de reprodutores, a conservação de peixes sensíveis a manipulação (como é o caso do *B. orbignyanus*) com baixas taxas de mortalidade durante a reprodução.

A principal desvantagem do sistema reprodutivo seminatural, está relacionada com a necessidade da retirada dos ovos do tanque para transferência para as incubadoras, que segundo Zaniboni-Filho e Nuñez (2004), pode prejudicar a evolução dos embriões e aumentar a possibilidade de infecção destes por fungos. Sirol et al. (2007) para contornar este problema, propuseram uma técnica simples de sistema reprodutivo seminatural, utilizando tanques circulares de fluxo contínuo e circular de água que possuem uma tubulação que permite coletar e dirigir os ovos ao centro do tanque para serem levados a um sistema terminal de incubadora (Figura 4).



**Figura 4.** Sistema reprodutivo seminatural utilizado em espécies migradoras.

Existem alguns trabalhos comparando a eficiência reprodutiva na utilização dos dois sistemas reprodutivos na variabilidade genética das progênes. No estudo desenvolvido por Reynalte-Tataje et al., (2002b) com *Leporinus macrocephalus*, o

sistema reprodutivo seminatural apresentou uma maior taxa de sobrevivência dos reprodutores e uma maior taxa de fertilização dos óvulos, sendo confirmado por Sirol et al. (2007) trabalhando com *P. mesopotamicus*, onde os autores encontraram menor eficiência reprodutiva e maior mortalidade ao usar o sistema reprodutivo por extrusão.

Da mesma forma, Povh (2007) analisando a variabilidade genética de estoques de *P. mesopotamicus* no sistema de reprodução seminatural e por extrusão, encontrou que a variabilidade genética foi maior no sistema seminatural, concluindo que quando o objetivo da alevinocultura é a produção de alevinos ou juvenis para programas de repovoamento, deve-se preconizar o sistema reprodutivo seminatural, mas enfatiza que maiores análises são necessárias para a confirmação da eficiência desse sistema na preservação da variabilidade genética para outras espécies migradoras.

#### **1.4. Genética e biotecnologia na piscicultura**

A piscicultura nos próximos anos será desafiada a produzir de maneira mais eficiente, ou seja, melhorar as taxas de crescimento e eficiência de conversão alimentar, maior controle da reprodução e produzir animais geneticamente adaptados aos ambientes naturais de criação. Diante de tal cenário, a genética nos últimos anos está tendo uma revolução técnica e acadêmica na piscicultura, onde o monitoramento de populações naturais e de estoques mantidos em cativeiro mostra-se importante para conseguir ganhos expressivos na produção. Este procedimento é justificado em função da perda de variabilidade genética que ocorre no processo de estocagem dos animais que pode levar a alterações alélicas, podendo desencadear o aparecimento de endogamia e redução da adaptabilidade das espécies em ambientes naturais.

Neste contexto, o desenvolvimento de marcadores moleculares foi importante. A partir da elucidação da estrutura dos ácidos nucleicos por Watson e Crick em 1953, foi possível passar a utilizar segmentos da molécula de DNA como marcadores, com maior especificidade e sensibilidade (Asensio et al., 2001). Outra vantagem é que o DNA é integralmente transmitido a todas as células, podendo ser extraído de tecidos superficiais de peixes (Lopera-Barrero et al. 2008).

Várias técnicas de análise do DNA foram criadas, mas foi a partir do desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) por Mullis e seus colaboradores em 1983, que uma verdadeira revolução na biologia foi apresentada,



tanto na pesquisa, visando o entendimento de processos biológicos fundamentais, como nas áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (Ali et al., 2004).

O princípio da PCR é uma imitação de um processo natural de replicação do DNA “*in vivo*” antes da divisão celular. A molécula sofre uma separação de suas fitas complementares, num processo denominado desnaturação. Cada fita serve como molde para iniciar em sua extremidade 3’ um processo de polimerização ou formação de uma nova fita homóloga por encadeamento de bases complementares à fita molde. Este evento é promovido por enzimas específicas denominadas DNA polimerases. Como resultado do processo duas moléculas idênticas a que iniciou a replicação são obtidas.

Vários marcadores de análise do DNA baseados na PCR foram desenvolvidos, permitindo que a avaliação genética de um animal, de uma comunidade ou de uma população seja determinada com maior precisão, antes mesmo da expressão do seu fenótipo, e desta forma, fornecer uma metodologia mais objetiva para a pesquisa e monitoramento genético em estoques mantidos em cativeiro e em populações naturais.

Entre os vários marcadores moleculares desenvolvidos nos últimos anos, o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microssatélites são os mais usados em estudos de genética de peixes (Liu e Cordes, 2004).

#### **1.4.1. Marcador molecular RAPD**

Dois grupos de pesquisadores norte-americanos (Williams et al., 1990; Welsh e McClelland, 1990) propuseram independentemente, o uso de pequenos iniciadores ou *primers* aleatórios na reação em cadeia da polimerase (PCR) como um método de geração de marcadores moleculares polimórficos, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio da seqüência (Borém e Santos, 2004).

O marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é basicamente uma variação do protocolo de PCR com duas características distintas: utiliza um iniciador (*primer*) único e de seqüência arbitrária e, portanto, sua seqüência alvo é conhecida (Ali et al., 2004). Cada *primer* anela-se ao DNA molde e podem ser sintetizados vários fragmentos de DNA a partir de diversos pontos do genoma, resultando assim na visualização de várias bandas no gel, razão pela qual gera um alto polimorfismo dos indivíduos ou populações analisadas (Oliveira et al., 2002).

O potencial desse marcador é relativamente alto para a detecção de polimorfismo (Asensio et al., 2001); possibilita a análise simultânea de muitas amostras e com cobertura de grandes áreas do genoma, não utiliza equipamentos muito sofisticados ou radioisótopos, necessita de quantidades diminutas de tecido (Ali et al., 2004), proporcionando uma possibilidade de coleta de amostra não invasiva e sem necessidade de sacrifício do animal (Wasko et al., 2003; Lopera-Barrero et al., 2008).

Apesar do seu baixo custo, menor tempo e etapas para a obtenção de resultados e de não precisar do desenvolvimento prévio de uma biblioteca de sondas específicas para o organismo de interesse (Liu e Cordes, 2004), sua principal limitação é o baixo conteúdo de informação genética, em função desse marcador ser dominante (genótipos heterozigotos não podem ser discriminados dos homozigotos).

#### **1.4.2. Marcador molecular microssatélite**

Os eucariotos têm dois tipos principais de DNA repetitivo: disperso e em tandem. Estes últimos são encontrados geralmente em centrômeros e telômeros, embora possam ocorrer em localização intersticial. Em tese, essas regiões não estão sujeitas as pressões evolutivas, pois suas mutações moleculares são fenotipicamente neutras. Elas estão dispersas ao longo da molécula e flanqueiam regiões codificantes (Rengmark et al., 2006).

Seqüências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*) mais tarde denominadas também microssatélites, consistem em pequenas seqüências com um a oito nucleotídeos de comprimento, repetidas em tandem (Alam e Islam, 2005). Têm usualmente menos que 100 pares de bases e estão flanqueados por seqüências únicas (Chun-Li et al., 2002).

A repetição dinucleotídica  $[CA]_n$  é uma das mais abundantes famílias de microssatélites em genoma de vertebrados, ocorrendo em média a cada 15 a 30 kb. Esta família de marcadores é útil para mapeamento genético de alta resolução e tem sido usada para mapeamento de características quantitativas em espécies de valor zootécnico (Tong et al., 2005).

Os microssatélites são marcadores codominantes porque é possível verificar para cada loco (amplificado individualmente a partir de suas seqüências flanqueadoras), o comprimento de cada um dos alelos herdados. Isso possibilita a identificação

inequívoca de homozigotos e heterozigotos. Esta condição de codominância permite que os dados obtidos por este marcador sejam analisados por métodos estatísticos da genética populacional clássica (Chistiakov et al., 2006). Por isso, o marcador microssatélite possui um elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC - *Polymorphism Information Content*) (Chun-Li et al., 2002). Os microssatélites são muito freqüentes e distribuídos ao acaso, permitindo a mais completa cobertura de qualquer genoma (Liu e Cordes, 2004).

### **1.4.3. Conservação genética de peixes**

Os recursos genéticos na aquicultura constituem um patrimônio de muito valor, sendo importante investir na sua conservação (Agostinho et al., 2005). Com esse objetivo, são necessários estudos que permitam determinar a variabilidade e a estrutura genética de estoques e populações naturais, a paternidade e a contribuição reprodutiva de acasalamentos, o monitoramento de programas de repovoamento e a formação de bancos de germoplasma.

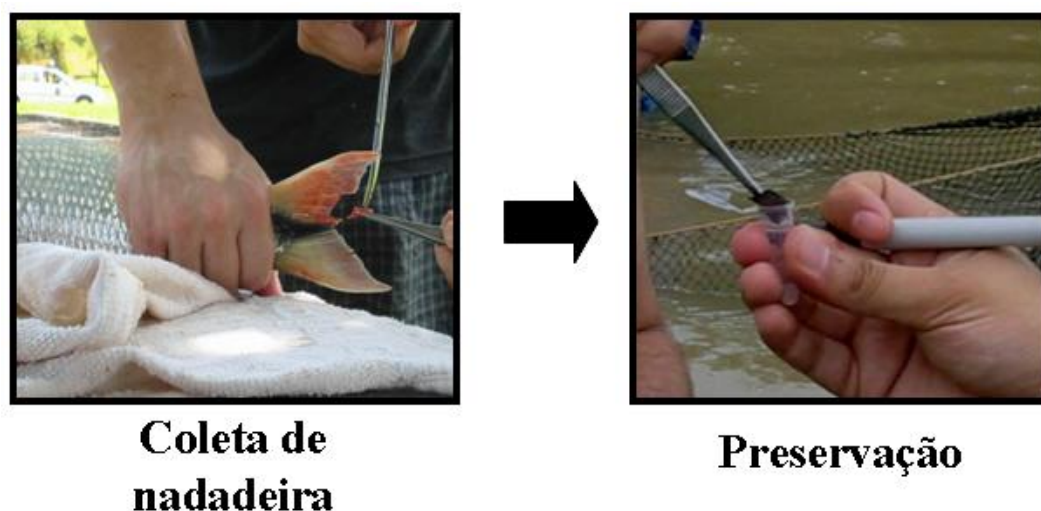
#### **1.4.3.1. Coleta e preservação de amostras**

Nos últimos anos um grande número de estudos genéticos realizados em peixes têm sido realizados mediante a utilização de protocolos baseados na análise do DNA. Porém, a viabilidade de tais estudos está freqüentemente limitada pela habilidade do investigador para isolar DNA de uma qualidade e quantidade aceitável (Yue e Orban, 2001; Aranishi, 2006).

Por esta razão, a coleta e conservação de amostras é parte importante dos diferentes protocolos de análise genética mediante a utilização dos marcadores moleculares. Dois procedimentos podem ser utilizados na obtenção de amostras de DNA: a amostragem invasiva e a amostragem não invasiva.

A amostragem invasiva utiliza procedimentos cirúrgicos para retirar amostras de tecidos internos. Este tipo de amostragem tem como desvantagens a apresentação de injúrias que podem ser porta de entrada para infecções ou que podem produzir a morte dos peixes. Amostras invasivas mais comuns são de músculo (Weber et al., 2003; Chakraborty et al., 2006) e de fígado.

Por causa dessas desvantagens, a amostragem não invasiva é mais atrativa e mais utilizada, já que a partir de tecidos externos é possível obter amostras de DNA de boa qualidade. Tipos de amostras não invasivas são nadadeira (Nam et al., 2003; Wasko et al., 2003; Vieira et al., 2005; Lopera-Barrero et al., 2008) (Figura 4), sangue (Pineda-Santis et al., 2004), escamas (Yue e Orban, 2001; Wasko et al., 2003), células bucais (Livia et al., 2006), óvulos (Aranishi, 2006) e larvas (Povh, 2007; Gomes, 2007).



**Figura 5.** Coleta e preservação de amostras de nadadeira de *B. orbignyanus*.

Por sua simplicidade na coleta e na estocagem (normalmente em álcool etílico 70% ou 100%), pela facilidade do protocolo de extração e pela quantidade e qualidade de DNA extraído, a obtenção de DNA a partir da nadadeira tem sido relatada para várias espécies de peixes, incluindo o *B. orbignyanus* (Wasko et al., 2003; Povh et al., 2005; Lopera-Barrero, et al., 2006; Gomes, 2007; Lopera-Barrero et al., 2008).

As aplicações do banco de sêmen em programas de conservação de recursos genéticos têm várias vantagens. Redução do número de reprodutores machos utilizados em programas de propagação artificial, disponibilidade de manejo simultâneo de reprodutores em qualquer época do ano (Murgas et al., 2004), orientação de programas de melhoramento genético, obtenção e manejo de material genético para análise da diversidade genética e a recuperação de estoques naturais ameaçados de extinção por fatores ambientais ou pela ação do homem são algumas delas (Streit Jr, 2005). Além dessas vantagens, a utilização de um banco de sêmen de peixe pode diminuir o custo de produção do alevino utilizado em programas de repovoamento.

A conservação de embriões de peixes pela criopreservação ainda não é viável devido a inúmeros fatores como: sensibilidade ao frio, diferença na permeabilidade das membranas e quantidade de vitelo (Liu et al., 2001). Por outro lado, pesquisas têm mostrado que o estabelecimento de um protocolo de resfriamento de embriões de peixe está mais próximo de ser atingido (Ahammad et al., 2002). Dentre as possíveis aplicações do resfriamento de embriões, possibilitar a reprodução de espécies em que não ocorrem o sincronismo reprodutivo (Cloud, 2000), permitir a colheita de embriões em lugares remotos, e mantê-los em refrigeração até ser incubados com segurança, são as principais. A biotecnologia de criopreservação de gametas garante a preservação de material genético por muitos anos e pode ser um estoque de material genético de boa qualidade para variedade de pesquisas em diferentes áreas (Streit Jr, 2005).

#### **1.4.3.2. Variabilidade e estrutura genética**

Em todos os organismos, a variabilidade genética é base da diversidade genética, do potencial evolutivo (Borowsky, 2001) e da capacidade adaptativa de uma espécie (Saura et al., 2006). Um grande aumento da endogamia pode resultar na redução de até 15% da viabilidade da progênie (Wang et al., 2002) e pode alterar padrões de sobrevivência e crescimento (Shikano e Taniguchi, 2002; Cena et al., 2006).

Os peixes mantidos em ambientes controlados podem estar expostos a uma diminuição da variabilidade genética devido ao efeito do acasalamento entre indivíduos aparentados, que por representar só uma pequena amostra da população natural, intensificam seu efeito de forma que o componente genético dos descendentes vai se homogeneizando, até diferir das populações naturais (Pineda-Santis, 2004).

Esta tendência foi encontrada no estudo feito por Wasko et al. (2004) em *Brycon cephalus*, onde a comparação entre três gerações estocadas e uma população natural mostrou uma diminuição na variabilidade genética, causada possivelmente pela utilização de pequenos estoques de reprodutores no processo reprodutivo, sendo necessárias estratégias de conservação genética.

Por isso, a primeira providência a ser tomada na implantação de uma piscicultura ou qualquer programa de melhoramento genético e repovoamento é verificar a variabilidade genética dos estoques, a fim de selecionar aqueles que efetivamente

possam contribuir com a formação de um estoque com base genética suficientemente ampla para tais objetivos.

A análise da diversidade genética em estoques mantidos em cativeiro tem sido objeto de várias pesquisas nos últimos anos usando os marcadores RAPD (Matoso et al., 2004; Ramella et al., 2006; keyvanshokoo e Kalbussi, 2006; Lopera-Barrero et al., 2006; Nagarajam et al., 2006; Basavaraju et al., 2007; Gomes, 2007) e microssatélites (Aho et al., 2006; Innes e Elliott, 2006; Kang et al., 2006; Machado-Schiaffino et al., 2007; Povh, 2007) como consequência da busca da manutenção genética entre os estoques e o sucesso em programas de melhoramento genético e conservação. A avaliação da estrutura genética de linhagens tem sido também pesquisada (Shikano e Taniguchi, 2002; Pineda-Santis et al., 2004).

Como regra geral, a variabilidade genética encontrada nas populações naturais é muito inconstante, dependendo da espécie, do rio, da localização no rio e das pressões existentes em cada ambiente (Povh, 2007). Por isso, a compreensão de diferenças genéticas e estruturas genéticas são fundamentais para um correto manejo e manutenção do ambiente em que as espécies se encontram, podendo contribuir para promover a conservação e o aumento dos recursos exploráveis (Ortega-Villaizán Romo et al., 2006).

Informações obtidas mediante a utilização de marcadores moleculares RAPD e microssatélites têm contribuído para um desenvolvimento sustentável (Martins et al., 2003). Nesse contexto, várias pesquisas têm sido realizadas analisando a estrutura populacional de várias espécies de peixes nativas usando marcadores RAPD (Almeida et al., 2003; Hatanaka e Galetti Jr, 2003; Leuzzi et al., 2004; Sofia et al., 2006) e microssatélites (Barroso et al., 2003; Barroso et al., 2005; Hassanien e Gilbey, 2005; Lopez, 2006; Liao et al., 2006; Luan et al., 2006, Povh, 2007).

#### **1.4.3.3. Análise da paternidade e da contribuição reprodutiva**

O manejo inadequado da reprodução em estoques mantidos em cativeiro pode resultar em impactos genéticos nos reprodutores usados e conseqüentemente na progênie, devido a perda da variabilidade genética. Os peixes apresentam o sistema de acasalamento mais complexo no reino animal, sendo igualmente difícil obter informações sobre a descendência. Com o advento de marcadores genéticos e de

melhores métodos de informática para calcular descendência, a obtenção destas informações tem se tornado relativamente mais fácil (Hastein et al., 2001).

A taxa de perda de variabilidade genética em uma população é baseada no tamanho efetivo da população. Essa variabilidade genética pode ser afetada pelo número de indivíduos fundadores do estoque (Wasko, 2005), pela desigual relação de sexo no momento da reprodução (Moreira, 2001) e por variações intrapopulacionais (Paiva 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 dessa variabilidade.

Para minimizar esses efeitos na utilização do sistema reprodutivo seminatural, um correto monitoramento da variabilidade genética dos estoques acompanhada de análise da paternidade encontrada nas progênes é necessário, já que a perda da variabilidade genética da progênie pode mostrar um manejo reprodutivo e genético inadequado dos estoques parentais. Os marcadores microssatélites provêm bons resultados, uma vez que esses marcadores exibem um grande número de alelos e altos níveis de polimorfismo, produzindo genótipos únicos para todo indivíduo.

Avaliando a paternidade das progênes do *Paralichthys olivaceus* no sistema seminatural, Sekino et al. (2003) encontraram que a contribuição reprodutiva dos reprodutores foi determinada em maior porcentagem por um só macho. Por esta razão, os autores recomendam o contínuo monitoramento da progênie com o teste de paternidade em qualquer programa de piscicultura, sendo que o marcador molecular microssatélite tem sido utilizado com sucesso para este fim.

Dados de paternidade têm sido utilizados para muitas finalidades na ecologia comportamental, podendo ser aplicados em exames de padrões de acasalamento de zonas híbridas e na elucidação da variação individual no sucesso reprodutivo (Pearse et al., 2001). A determinação de parentais por meio de marcadores de DNA tem sido empregada para estudar a estrutura populacional em peixes (Qin et al., 2007); para a estimativa do número efetivo de reprodutores de populações selvagens e cativas (Jackson et al., 2003); e para a melhora de delineamentos experimentais em estudos de mapeamento genético e em programas de melhoramento genético.

Outros trabalhos têm sido realizados para várias espécies com o objetivo de avaliar a paternidade de estoques e para isso estão sendo usados marcadores

moleculares microssatélite (Lemos et al., 2006; Wesmajervi et al., 2006; Yue et al., 2007).

#### **1.4.3.4. Monitoramento genético de programas de repovoamento**

Dentre as possibilidades para o manejo da ictiofauna em ambientes naturais impactados por ações do homem, a implantação de períodos de defeso, definição de cotas de captura, normatização dos tipos de equipamentos permitidos para captura, revitalização das áreas de desova e crescimento são os mais utilizados (Sirol e Britto, 2006). O controle da pesca procura regular a captura de peixes jovens (comprimento mínimo de captura e tamanho mínimo de malha) e proteger locais de desova durante o período reprodutivo. Porém, essas medidas são comprometidas pela falta de informações sobre as populações de peixes, pela falta de recursos financeiros e pelo limitado poder de fiscalização (Agostinho et al., 2005).

A recuperação de ambientes naturais e a construção de mecanismos de transposição de peixes (escadas e elevadores) em usinas hidrelétricas podem também ser utilizadas (Agostinho e Gomes, 2006; Sirol e Britto, 2006) desde que haja um bom gerenciamento e monitoramento. Porém, podem resultar em insucesso, pois elas apresentam elevada seletividade e os movimentos são essencialmente unidirecionais (Agostinho et al., 2005). Num estudo realizado por Britto e Sirol (2006) analisando as escadas do complexo Canoas (médio Rio Paranapanema) demonstraram a sua eficiência quanto a transposição de diferentes espécies de peixes e que garantem uma rota migratória, mas que apesar disso, essa rota não é suficiente para o processo seletivo das espécies migradoras da região.

Outra alternativa de conservação de peixes que pode ser utilizada é a estocagem e o repovoamento. Apesar dessa alternativa ter destaque garantido pelo grande apoio da sociedade, esta estratégia deve ser amplamente discutida e cercada de conhecimento científico (Sirol e Britto, 2006). Estes autores relataram que a definição das espécies a serem utilizadas no repovoamento, a proteção da variabilidade genética das populações selvagens, locais e períodos de soltura, tamanho, sanidade, quantidade e frequência de soltura são pontos importantes para obter um bom gerenciamento do repovoamento.

O projeto de Recomposição do Estoque Pesqueiro dos Rios Paranaenses “Paraná mais peixe” é uma iniciativa do Governo de Estado que integra trabalhos entre as



Secretarias de Ciência, Tecnologia e Ensino Superior, Agricultura e Abastecimento, Melhor Ambiente e suas empresas vinculadas, Polícia Florestal e Militar, Universidades Estaduais de Londrina e Maringá, prefeituras e comunidades (Agência Estadual de Notícias, 2007). O objetivo é recuperar estoques de espécies nativas de peixes do Paraná. De acordo com o projeto, a soltura de peixes contribui para a recuperação do meio ambiente, já que envolve outras ações em defesa da natureza, como o plantio de mata ciliar às margens dos rios.

Antes da reposição de peixe nos rios, a Secretaria da Agricultura realiza primeiro o processo de análise da água. É verificado se há ocorrência de pontos de esgoto nas margens dos rios, se há saneamento na região e é realizado o plantio de mudas de árvores para recomposição das matas ciliares. O monitoramento quanto à pesca predatória e de análise genético, além da vigilância constante após a liberação dos peixes também é fiscalizado (Agência Estadual de Notícias, 2007).

Desde 2005, início do programa, já foram lançados nos rios paranaenses mais de 23 milhões de peixes de espécies como piracanjuba, curimba, piapara, pacu, acará e lambarí. As espécies de pintados e dourados estão em fase de estudo por se tratar de espécies carnívoras que não se adaptam aos tanques (Agência Estadual de Notícias, 2007).

Em outros países como Estados Unidos, os programas de repovoamento são comuns para muitas espécies e o uso de pisciculturas para suplementar populações de salmónidos tem sido particularmente popular (Araki et al., 2006). Apesar dessa popularidade, o fato dele realmente contribuir com a conservação de populações nativas ainda não foi testado adequadamente (McDougall et al., 2006) e há razões para acreditar que essa suplementação pode diminuir a viabilidade delas (Myers et al., 2004), diminuindo o tamanho efetivo da população (Wang e Ryman, 2001) com um incremento da carga genética por acumulação de mutações e seleção de domesticação (Goodman, 2005).

Um estudo realizado por Araki et al. (2006) analisando programas de repovoamento de *Oncorhynchus mykiss*, determinou que o sucesso reprodutivo de organismos provenientes de pisciculturas (cultivados em cativeiro e que se reproduziram naturalmente no rio) não foi diferente ao de peixes nativos. Em contraste, peixes provenientes de uma piscicultura tradicional (origem não local, múltiplas gerações em cativeiro) mostraram uma adaptabilidade menor do que os peixes nativos.

Adicionalmente, os cruzamentos entre peixes nativos e peixes repovoados da mesma população do rio foram efetivos, concluindo que não houve sinal de que o cruzamento entre indivíduos repovoados e nativos reduza a adaptabilidade por uma geração.

A determinação da variabilidade genética é muito importante, já que nos programas de repovoamento é comum introduzir os peixes nos rios sem ter informações genéticas, sendo possível que existam características genéticas que não permitam que eles se desenvolvam e sobrevivam às condições do novo ambiente. O objetivo dos programas de manejo para peixes cultivados usados para repovoamento em águas naturais é a conservação da variabilidade genética das populações naturais e a manutenção de uma captura sustentável (FAO, 2005). Eles devem considerar a similaridade genética e distância geográfica entre as populações naturais e aquelas produzidas para liberação, além da sua variação genética intrapopulacional (Lopera-Barrero, 2005).

Normalmente, as progênes obtidas para repovoamento são provenientes de acasalamentos de poucos parentais, o que promove um gargalo genético (efeito *bottleneck*), levando a uma redução da variabilidade genética (Povh et al., 2008). Dessa forma, introduções de peixes de forma irracional, mesmo feitas com as melhores das 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 (Taniguchi, 2003).

Para a conservação da diversidade genética de populações naturais, todos os peixes que serão liberados através de programas de repovoamento devem representar geneticamente as populações naturais tanto quanto possível (Povh, 2007). Isto pode ser obtido pela utilização de número efetivo suficiente de reprodutores advindos de populações com composição genética similares às naturais, que receberão os indivíduos liberados (Hara e Sekino, 2003).

Segundo Sønstebø et al. (2007), a mistura entre, populações naturais e populações repovoadas geneticamente diferentes pode promover a perda de alelos importantes para a adaptação local. A razão disto é porque cada população de uma determinada espécie possui um *pool* de alelos adaptativos diferentes e, desta forma, quando um local é reabastecido com indivíduos criados em cativeiro que não se originaram do habitat da população nativa, genes importantes para sobrevivência naquele hábitat podem ser reduzidos ou mesmo perdidos (Almeida et al., 2003; Leuzzi et al., 2004).

No caso do *B. orbignyanus* encontrado no rio Paranapanema, este problema pode não ser observado. É de se esperar que através da drástica redução das populações naturais deste peixe, os peixes adultos encontrados no rio sejam produto dos contínuos repovoamentos realizados pela Estação de Hidrobiologia e Aqüicultura da *Duke Energy International*, localizada na usina Salto Grande-SP.

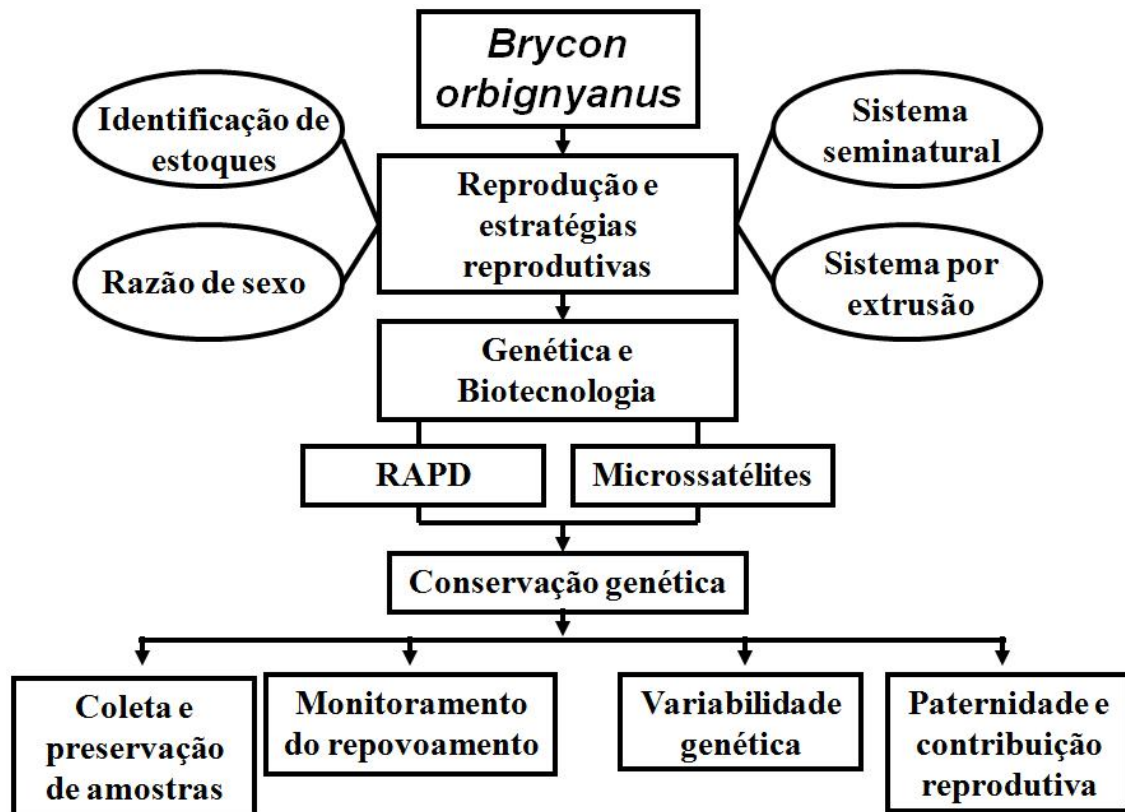
### **1.5. Conservação do *Brycon orbignyanus***

Apesar da grande importância dos peixes para o homem, pouco se conhece da sua diversidade e estima-se que 20% da ictiofauna de água doce do mundo já esteja extinta ou ameaçada de extinção (Hilsdorf e Petrere Jr, 2002). É nesse contexto que programas de repovoamento têm destaque, sendo necessária uma ampla discussão científica onde a genética, a ecologia, fisiologia, reprodução e a participação de outras áreas permitam determinar objetivamente quais espécies, sistemas, técnicas e estratégias devem ser usadas ou recomendadas.

O manejo de estoques de *B. orbignyanus* exige o conhecimento tanto de sistemas reprodutivos como de informações genéticas dos estoques mantidos em cativeiro e das populações naturais, e assim alcançar uma objetiva conservação genética que começa a partir da coleta e preservação de amostras até a análise da variabilidade, da paternidade e do monitoramento de programas de repovoamento.

Nesse contexto, a integração com áreas biológicas, agrárias, ambientais e a participação de empresas geradoras de energia são muito importantes. Essa importância ocorre em função da sua contribuição científica, da definição dos sistemas de acasalamento e reprodução utilizados e da manutenção genética de estoques e populações naturais que serão realizadas objetivamente. Estas informações facilitarão a elaboração de programas de conservação em espécies ameaçadas ou não de extinção.

Por esse motivo, a primeira providência a ser tomada na implantação de uma piscicultura ou de programas de repovoamento é verificar a variabilidade genética dos estoques e a estrutura genética das populações naturais, a fim de selecionar aqueles indivíduos que efetivamente possam contribuir na formação do estoque, com base genética suficientemente ampla para tais objetivos (Figura 6).



**Figura 6.** Fluxograma do manejo de estoques de *B. orbignyanus* mantidos em ambientes controlados.

## 1.6. Referências

- Agência Estadual de Notícias, 2007. Disponível em: <http://www.agenciadenoticias.pr.gov.br>.
- 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., Jorcin, A. (Eds.), Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. RiMA, São Carlos, pp. 23-55.
- Agostinho, A.A., Thomaz, S.M., Gomes, L.C., 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conserv. Biol.* 19, 646-652.
- Ahammad, M.M., Bhattacharyya, D., Jana, B.B., 2002. The hatching of common carp (*Cyprinus carpio* L.) embryos in response to exposure to different concentrations of cryoprotectant at low temperatures. *Cryobiology* 44, 114-121.
- Aho, T., Rönn, J., Piironen, J., Björklund, M., 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253, 244-248.
- Alam, M.S., Islam, M.S., 2005. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 246, 151-160.

- Ali, B.A., Huang, T.H., Qin, D.N., Wang, X.M., 2004. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Rev. Fish Biol. Fish.* 14, 443-453.
- Almeida, F.S., Sodre, L.M.K., Contel, E.P.B., 2003. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genet. Mol. Biol.* 26, 301-305.
- Araki, H., Ardren, W.R., Olsen, E., Cooper, B., Blouin, M.S., 2006. Reproductive Success of captive-Bred Steelhead Trout in the Wild: Evaluation of Three Hatchery Programs in the Hood River. *Conserv. Biol.* 21, 181-190.
- Aranishi, F., 2006. Single fish egg DNA extraction for PCR amplification. *Conserv. Genet.* 7, 153-156.
- Asensio, L., González, I., Fernández, A., Rodríguez, M.A., Hernandez, P.E., Garcia, T., Martín, R., 2001. PCR-SSCP: A simple method for the authentication of grouper (*Epinephelus guaza*), Wreck Fish (*Polyprion americanus*), and Nile Perch (*lates niloticus*) filets. *J. Agric. Food Chem.* 49, 1720-1723.
- Ayllon, F., Martinez, J.L., Garcia-Vazquez, E., 2006. Loss of regional population structure in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., following stocking. *ICES J. Mar. Sci.* 63, 1269-1273.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Mello, A.M., Guimarães, S.E.F., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2003. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol. Notes* 3, 297-298.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture* 247, 51-65.
- Basavaraju, Y., Prasad, D.T., Rani, K., Kumar, S.P., Naika, U.D., Jahageerdar, S., Srivastava, P.P., Penman, D.J., Mair, G.C., 2007. Genetic diversity in common carp stocks assayed by random-amplified polymorphic DNA markers. *Aquac. Res.* 38, 147-155.
- Basavaraju, Y., Renuka Devi, B.S., Mukthayakka, G., Purushotham Reddy, L., Mair, G.C., Roderick, E.E., Penman, D.J., 1998. Evaluation of marking and tagging methods for genetic studies in carp. *J. Biosci.*, 23, 585-593.
- Bert, T.M., Seyoum, S., Tringali, M.D., McMillen-Jackson, A., 2002. Methodologies for conservation assessments of the genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. *Braz. J. Biol.* 62, 387-408.
- Brandão, F.R., Gomes, L.C., Chagas, E.C., Araújo, L.D., Silva, A.L.F., 2005. Densidade de estocagem de matrinxã (*Brycon amazonicus*) na recria em tanque-rede. *Pesq. Agropec. Bras.* 40, 299-303.
- Britto, S.G.C., Sirol, R.N., Vianna, N.C., Jardim, S.M., Santos, J.C., Pelisari, E., 2003. Peixes do rio Paranapanema. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema. 112 pp.
- Britto, S.G.C., Sirol, R.N., 2006. Transposição de Peixes como forma de manejo: as escadas do complexo Canoas, médio rio Paranapanema, Bacia do alto Paraná. . In: Nogueira M.G., Henry, R., Jorcin, A. (Eds.), *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. RiMA, São Carlos, pp. 275-284.
- Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E., 2006. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquac. Nutr.* 12, 183-191.

- Borém, A., Santos, F.R., 2004. Biotecnologia Simplificada. 2ª edição, Rev. E ampli. Viçosa. pp 302.
- Borowsky, R.L., 2001. Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. *Mol. Phylogenet. Evol.* 18, 143-148.
- Carmo, M., Fracalossi, D.M., 2002. Dietary Protein Requirement and Energy to Protein Ratio for Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) Fingerlings. *Rev. Bras. Zootec.* 31, 1-10.
- 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., Lima, F.C., 2003. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. *Biota Neotrop.* 3, 1-14.
- Cena, C.J., Morgan, G.E., Malette, M.D., Heath, D.D., 2006. Inbreeding, outbreeding and environmental effects on genetic diversity in 46 walleye (*Sander vitreus*) populations. *Mol. Ecol.* 15, 303-320.
- Chakraborty, A., Sakai, M., Iwatsuki, Y., 2006. Museum fish specimens and molecular taxonomy: A comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. *J. Appl. Ichthyol.* 22, 160-166.
- Chistiakov, D.A., Hellemans, B., Volckaert, F.A.M., 2006. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. *Aquaculture* 255, 1-29.
- Chun-Li, Y., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E., 2002. Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Mol. Ecol.* 11, 2453-2465.
- Cloud, J.G., 2000. Cryopreservation of sperm of steelhead rainbow trout after refrigerated storage. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), *Cryopreservation in aquatic species*. World Aquaculture Society, 3, 101-103.
- Dale, V.H., Beyeler, S.C., 2001. Challenges in the development and use of ecological indicators. *Ecol. Indic.* 1, 3-10.
- FAO 2005, *State of World Fisheries and Aquaculture*. Roma: FAO Fisheries Department, pp 153.
- Faria, R.H.S., Souza, M.L.R., Ribeiro, R.P., Fülbe, V.M., 2003. Avaliação de diferentes posições de marcação externa em juvenis de tilápia *Oreochromis niloticus* (Cichlidae). *Acta Sci. Anim. Sci.* 25, 273-276.
- Ferraz, E.M., Cerqueira, V.R., Alvarez-Lajonchère, L., Candido, S., 2004. O uso de etiquetas externas para identificação de reprodutores do robalo-peva, *Centropomus parallelus*, em tanques. *B. Inst. Pesca* 29, 183 - 186.
- Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R., 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261, 1056-1064.
- Furuya, W.M., Furuya, V.R.B., 2001. Reprodução de peixes. In: Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Zimmermann, S (Eds.), *Fundamentos da moderna aquicultura*. ULBRA, Canoas, p 69-81.
- Ganeco, L., Nakaghi, L., Urbinati, E., Dumont-Neto, R., Vasques, L.H., 2001. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante o ciclo reprodutivo. *B. Inst. Pesca* 27, 131-138.
- Gomes, P.C., 2007. Diversidade genética de três populações de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando marcadores moleculares. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 75p.

- Goodman, D., 2005. Selection equilibrium for hatchery and wild spawning fitness in integrated breeding programs. *Canadian J. Fish. Aquat. Sci.* 62, 374–389.
- Hara, M., Sekino, M., 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* 217, 107-114.
- Harvey, B., Carolsfeld, J., 1993. Induced breeding in tropical fish culture. Ottawa: International Development Research Center, 1993. 144p.
- Hassanien, H.A., Gilbey, J., 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA Microsatellites. *Aquac. Res.* 1450-1457.
- Hastein, T., Hill, B.J., Berthe, F., Lightner, D.V., 2001. Traceability of aquatic animals. *Rev. Sci. Tech.* 20, 564-583.
- Hatanaka, T., Galetti Jr., P.M., 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genet. Mol. Biol.* 26, 19-25.
- Hilsdorf, A.W.S., Azeredo-Espin, A.M.L., Krieger, M.H., Krieger, J.E., 2002. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture* 214, 81-91.
- Hilsdorf, A.W.S., Krieger, J.E., 2004. Restriction site heteroplasmy in the mitochondrial DNA of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) Site heteroplasmy in the mtDNA of *Brycon opalinus*. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 307-310.
- Hilsdorf, A.W.S., Resende, E.K., 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.
- Hilsdorf, A., Petrere Jr., M., 2002. Conservação de peixes na bacia do rio do Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* 30, 62-65.
- Hori, T.S.F., Avilez, I.M., Inoue, L.K., Moraes, G., 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 67-72.
- Innes, B.H., Elliott, N.G., 2006. Genetic diversity in a Tasmanian hatchery population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) compared with its Canadian progenitor population. *Aquac. Res.* 37, 563-569.
- Jackson, T.R., Martin-Robichaud, D.J., Reith, M.E., 2003. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220, 245-259.
- Kang, J.H., Noh, J.K., Kim, J.H., Lee, J.H., Kim, H.C., Kim, K.K., Kim, B.S., Lee, W.J., 2006. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. *Aquac. Res.* 37, 701-707.
- Keyvanshokoo, S., Kalbassi, M.R., 2006. Genetic variation of *Rutilus rutilus caspicus* (Jakowlew 1870) populations in Iran based on random amplified polymorphic DNA markers: a preliminary study. *Aquac. Res.* 37, 1437-1440.
- Leboute, E.M., Afonso, L.O.B., Rotta, M.A., 2002. Técnica simples de marcação externa de reprodutores de tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*). *Ciênc. Rural* 32, 147-149.

- Lemos, A., Freitas, A.I., Fernandes, A.T., Gonçalves, R., Jesus, J., Andrade, C., Brehm, A., 2006. Microsatellite variability in natural populations of the blackspot seabream *Pagellus bogaraveo* (Brünnick, 1768): a database to access parentage assignment in Aquaculture. *Aquac. Res.* 37, 1028-1033.
- Leuzzi, M.S.P., Almeida, F.S., Orsi, M.L., Sodr , L.M.K., 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genet. Mol. Biol.* 27, 355-362.
- Liao, X., Yu, X., Tong, J., 2006. Genetic diversity of common carp from two largest Chinese lakes and the Yangtze River revealed by microsatellite markers. *Hydrobiologia* 568, 445-453.
- Lima, F.C.T., 2003. Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: Reis, R.E., Kullander, S.O., Ferraris, C.J. Jr. (Eds.), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 174-181.
- Liu, Z.J., Cordes, J.F., 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238, 1-37.
- Liu, X.H., Zhang, T., Rawson, D.M., 2001. Effects of cooling and partial removal of yolk a the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 55, 1719-1731.
- Livia, L., Antonella, P., Hovirag, L., Mauro, N., Panara, F., 2006. A nondestructive, rapid, reliable and inexpensive method to sample, store and extract high-quality DNA from fish body mucus and buccal cells. *Mol. Ecol. Notes* 6, 257-260.
- Lopera-Barrero, N.M., 2005. Diversidade genética de popula es de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com a técnica de RAPD. Disserta o (Mestrado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 45 p.
- Lopera-Barrero, N.M., Povh, J.A., Ribeiro, R.P., Gomes, P.C., Jacometo, C.B., Lopes, T da S., 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN com muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). *Cien. Inv. Agr. (prelo)*.
- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Povh, J.A., Gomes, P.C., Vargas, L., Streit Jr., D.P., 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *J. Anim. Sci.* 84, 170-170.
- Lopez, L., 2006. Genetic variability and population structure of dorada (*Brycon moorei sinuensis* Dahl) in the Sin  River, Córdoba, Col mbia. *Lakes & Reservoirs: Research and Management* 11, 1-7.
- Luan, S., Kong, J., Wang, Q.Y., 2006. Genetic variation of wild and cultured populations of the Kuruma prawn *Marsupenaeus japonicus* (Bate 1888) using microsatellites. *Aquac. Res.* 37, 785-792.
- Machado, A.B.M., 2005. Lista da fauna brasileira ameaçada de extin o: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. In: Machado, A.B.M., Martins, C.S., Drummond, G.M., (Eds.). Funda o Biodiversitas, Belo Horizonte, 160p.
- Machado-Schiaffino, G., Dopico, E., Garcia-Vazquez, E., 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture* 264, 59-65.
- Martinelli, L.A., da Silva, A.M., de Camargo, P.B., Moretti, L.R., Tomazelli, A.C., da Silva, D.M.L., Fischer, E.G., Sonoda, K.C., Salomão, M.S.M.B., 2002. Levantamento das cargas orgânicas lançadas nos rios do estado de São Paulo. *Biota Neotrop.* 2, 1-18.
- Martins, C., Wasko, A. P., Oliveira, C., Foresti, F., 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genet. Mol. Biol.* 26, 33-38.



- Mateus, L.A. de F., Estupiñán, G.M.B., 2002. Fish stock assessment of piraputanga *Brycon microlepis* in the Cuiabá river basin, Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Braz. J. Biol.*, 62, 165-170.
- Matoso, D.A., Artoni, R.F., Galetti Jr, P.M., 2004. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia* 527, 223-225.
- McDougall, P.T., Réale, D., Sol, D., Reader, S.M., 2006. Wildlife conservation and animal temperament: causes and consequences of evolutionary change for captive, reintroduced, and wild populations. *Anim. Conserv.* 9, 39-48.
- Metzger, J.P., Casatti, L., 2006. Do diagnóstico à conservação da biodiversidade: o estado da arte do programa BIOTA/FAPESP. *Biota Neotrop.* 6, 1-23.
- Monteiro, D.A., Almeida, J.A., Rantin, F.T., Kalinin, A.L., 2006. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 141-149.
- Moreira, H.L.M., 2001. Genética e Melhoramento de Peixes. In: Moreira, H.L.M., Vargas, L., Ribeiro, R.P., Zimmermann, S. (Eds.), *Fundamentos da moderna aquicultura*. ULBRA, Canoas, p. 135-147.
- Murgas, L.D.S., Miliorini, A.B., Franciscatto, R.T., Maria, A.N., 2004. Viabilidade espermática do sêmen de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) resfriado a 4°C. *Rev. Bras. Zootec.* 33, 1361-1365.
- Myers, R.A., Levin, S.A., Lande, R., James, F.C., Murdoch, W.W., Paine R.T., 2004. *Ecology. Hatcheries and endangered salmon*. Science, 303, 1980.
- Nagarajan, M., Haniffa, M.A., Gopalakrishnan, A., Basheer, V.S., Muneer, A., 2006. Genetic variability of *Channa punctatus* populations using randomly amplified polymorphic DNA. *Aquac. Res.* 37, 1151-1155.
- Nam, Y.K., Park, J.E., Kim, K.K., Kim, D.S., 2003. A rapid and simple PCR-based method for analysis of transgenic fish using a restricted amount of fin tissue. *Transgenic Res.* 12, 523-525.
- Ninhaus-Silveira, A., Foresti, F., Veríssimo-Silveira, R., Senhorini, J.A., 2006. Seminal Analysis, Cryogenic preservation, and fertility in Matrinxã Fish, *Brycon cephalus* (Günther, 1869). *Braz. arch. biol. technol.* 49, 651-659.
- Nogueira, M.G., Jorcin, A., Vianna, N.C., Britto, Y.C.T., 2006. Reservatórios em cascata e os efeitos na limnologia e organização das comunidades bióticas (Fitoplâncton, zooplâncton e zoobentos)-Um estudo de caso no rio Paranapanema (SP/PR). In: Nogueira M.G., Henry, R., Jorcin, A. (Eds.), *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. São Carlos: RiMA. pp. 83-125.
- Oliveira, A.M.B., Conte, L., Cyrino, J.E.P., 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. TecArt, São Paulo, 533 p.
- Oliveira, A.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., Pavanelli, C.S., Júlio Jr, H.F., Panarari, R.S., 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genética* 115, 259-267.
- Ortega-Villaizán Romo, M.M., Aritaki, M., Taniguchi, N., 2006. Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fish. Sci.* 72, 48-52.

- Paiva, S.R., Dergam, J.A., Machado, F., 2006. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 560, 393-404.
- Parker, N.C., Giorgi, A.E., Heidinger, R.C., Jester, D.B., Prince, E.D., Winans, G.A., 1990. Fish marking techniques (American Fisheries Society Symposium) 7, pp 514-520.
- Pearse, D.E., Eckerman, C.M., Janzen, F.J., Avise, J.C., 2001. A genetic analogue of "mark-recapture" methods for estimating population size: an approach based on molecular parentage assessments. *Mol. Ecol.* 10, 2711-2718.
- Pineda-Santis, H.R., 2004. Estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17, 62-63.
- Pineda-Santis, H.R., Pareja-Molina, D., Olivera-Ángel, M., Builes-Gómez, J., 2004. Contribución a la relación taxonómica entre cuatro especies de peces de la familia Characidae mediante el Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar (RAPD). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 17, 30-37.
- Porto-Foresti, F., Foresti, F., 2004. Genética e biotecnologia em piscicultura: usos na produção, manejo e conservação dos estoques de peixes In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), *Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva*. TecArt, São Paulo, 533 p.
- Povh, J.A., 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 75p.
- Povh J.A., Moreira, H.L.M., Ribeiro, R.P., Prioli, A.P., Vargas, L., Blanck, D.V., Gasparino, E., Streit Jr, D.P., 2005. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Sci. Anim. Sci.* 27, 1-10.
- Povh, J.A., Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Lupchinski Jr., E., Gomes, P.C., Lopes, T da S., 2008. Conservación de la diversidad genética de peces a través del monitoramiento por marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.* 35, (prelo).
- Qin, Y., Liu, X., Zhang, H., Zhang, G., 2007. Effect of parental stock size on F1 genetic structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Aquac. Res.* 38, 174-181.
- Ramella, M.S., Kroth, M.A., Meurer, S., Nuñez, A.P. de O., Zaniboni-Filho, E., Arisi, A.C.M., 2006. Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Braz. arch. biol. technol.* 49, 589-598.
- Rengmark, A.H., Slettan, A., Skaala, Ø., Lie, Ø., Langaas, F., 2006. Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. *Aquaculture* 253, 229-237.
- Reynalte-Tataje, D.A., Esquivel, D.M., Esquivel, J.R., Zaniboni-Filho, E., 2002b. Reprodução indizada do piauçu, *Leporinus macrocephalus*, (Characiformes, Anostomidae). *B. Inst. Pesca* 28, 11-18.
- Reynalte-Tataje, D.A., Luz, R.K., Meurer, S., Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A.P. de O., 2002a. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849)(Osteichthyes, Characidae). *Acta Sci. Anim. Sci.* 24, 439-443.
- Sá, M.V., Fracalossi, D.M., 2002. Exigência protéica e relação energia/proteína para alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). *Rev. Bras. Zootec.* 31, 1-10.

- Sampaio de O.A.M.B de M., Conte, L., Cyrino, J.E.P., 2004. Produção de Characiformes autóctones. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnoli, N. (Eds.), Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. TecArt, São Paulo, 533 p.
- Sanches, A., Galetti Jr, P.M., 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon Hilarii*. Mol. Ecol. Notes 6, 1045-1046.
- Santos, C.M., Ferreira, R.A.R., Henry, R., 2006. Alterações na organização da comunidade bentônica no complexo Canoas (Rio Paranapanema-SP) durante as fases pré e pós-enchimento. In: Nogueira M.G., Henry, R., Jorcín, A. (Eds.), Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. RiMA, São Carlos, pp. 183-204.
- Saura, M., Caballero, P., Caballero, A., Morán, P., 2006. Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. ICES J. Mar. Sci. 63, 1290-1296.
- SEAP - Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca., 2007. Estatística da Aquicultura e Pesca do Brasil Ano 2005. 115 pag. Disponível em [http://www.presidencia.gov.br/estrutura\\_presidencia/seap/estatistica](http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/estatistica).
- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M., 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., 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., Taniguchi, N., 2002. 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.
- Sire, J. Y., Girondot, M., Babiari, O., 2000. Marking zebrafish, *Danio rerio* (cyprinidae), using scale regeneration. J. Exp. Zool., 286, 297-304.
- Sirol, R.N., Britto, S.G., 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira M.G., Henry, R., Jorcín, A. (Eds.), Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. RiMA, São Carlos, pp. 275-284.
- Sirol, R.N., Streit Jr, D.P., Povh, J.A., 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., Martinez, C.B.R., 2006. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. Hydrobiologia 553, 245-254.
- S nsteb , J.H., Borgstr m, R., 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.
- Streit Jr., D.P., 2005. Embri es de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) tratados com metanol e DMSO e submetidos ao resfriamento. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 80 p.
- Taniguchi, N., 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. Rev. Fish Biol. Fish. 13 175-185.
- Tong, J., Yu, X., Liao, X., 2005. Characterization of a highly conserved microsatellite marker with utility potentials in cyprinid fishes. J. Appl. Ichthyol. 21, 232-235.
- Tundisi, J.G., 2003.  gua no século XXI: enfrentando a escassez. RiMa/IIIE. São Carlos, Brasil.

- Velasco-Santamaría, Y.M., Medina-Robles, V.M., Cruz-Casallas, P.E., 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. *Aquaculture* 256, 264-271.
- Vieira, V.P., Ribeiro, R.P., Vargas, L., Moreira, H.L.M., Povh, J.A., Lopera-Barrero, N.M., 2005. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com o uso de marcador de RAPD. *Rev. Acad. Curitiba* 3, 41-49.
- Wang, S., Hard, J. J., Utter, F., 2002. Salmonid inbreeding: a review. *Rev. Fish Biol. Fish.* 11, 301-319.
- Wang, J., Ryman, N., 2001. Genetic effects of multiple generations of supportive breeding. *Conserv. Biol.* 15, 1619-1631.
- Wasko, A.P., 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., Foresti, F., 2003. Nondestructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Hereditas* 138, 161-165.
- Wasko, A.P., Martins, C., Wright, J.M., Galetti Jr., P.M., 2001. Molecular organization of 5S rDNA in fishes of the genus *Brycon*. *Genome* 44, 893-902.
- Wasko, A.P., Galetti Jr., P.M., 2003. PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. *J. Appl. Ichthyol.* 19, 109-113.
- Wasko, A.P., Martins, C., Oliveira, C., Senhorini, J.A., Foresti, F., 2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinxã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmers. *J. Appl. Ichthyol.* 20, 48-52.
- Wasko, A.P., 2005. A importância do monitoramento genético em estoques cultivados de matrinxã e piracanjuba. *Panorama da Aqüicultura* 15, 47-49.
- Weber, L.P., Higgins, P.S., Carlson, L.I., Janz, D.M., 2003. Development and validation of methods for measuring multiple biochemical indices of condition in juvenile fishes. *J. Fish Biol.* 63, 637-658.
- Welsh, J., McClelland, M., 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18, 7213-7218.
- Wesmajervi, M.S., Westgaard, J.I., Delghandi, M., 2006. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua*L.). *Aquac. Res.* 37, 1195-1201.
- Williams, J.G.K., Rafalski, J.A., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Tingey, S.V., 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18, 6531-6535.
- Yokota, M., Harada, Y., Iizuka, M., 2003. Genetic drift in hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fish. Sci.* 69, 101-109.
- Yue, G.H., Orban, L., 2001. Rapid Isolation of DNA from Fresh and Preserved Fish Scales for Polymerase Chain Reaction. *Mar. Biotechnol.* 3, 199-204.
- Yue, G.H., David, L., Orban, L., 2007. Mutation rate and pattern of microsatellites in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Genetica* 129, 329-331.
- Zaniboni-Filho E., Schulz UH., 2003. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust, 1era. Ed., Victoria, Canada. pp. 157-194.

- Zaniboni-Filho, E., Nuñez, A.P.O., 2004. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva. TecArt, São Paulo, 533 p.
- Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M., 2006. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. Rev. Col. Cienc. Pec. 19, 233-240.
- Zaniboni-Filho, E., Weingartner, M., 2007. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. Rev. Bras. Reprod. Anim. 31, 367-373.

## II. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar através do emprego de RAPD o efeito do acasalamento sobre a diversidade genética de progênie de *Brycon orbignyanus*, quando nos programas de repovoamento são utilizadas diferentes proporções de sexo e o sistema reprodutivo seminatural.

Analisar a diversidade genética da progênie de *Brycon orbignyanus* obtida a partir do acasalamento em proporções iguais de sexo, usando o marcador molecular microssatélite.

Analisar a paternidade e a contribuição reprodutiva da progênie de *Brycon orbignyanus* obtida no acasalamento em proporções iguais de sexo, usando o marcador molecular microssatélite.

**III. EFEITO DO SISTEMA SEMINATURAL E DO  
ACASALAMENTO EM PROPORÇÕES IGUAIS DE SEXO NA  
DIVERSIDADE GENÉTICA DO *Brycon orbignyanus***

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: Agrociencia**

**“Effect of the semi-natural system and the mating in equal sex  
proportions in the genetic diversity of *Brycon orbignyanus*”**

**Efeito do sistema seminatural e do acasalamento em proporções iguais de sexo na diversidade genética do *Brycon orbignyana***

**RESUMO**

Os programas de repovoamento estão sendo utilizados com maior frequência como métodos de conservação de peixes, porém, o monitoramento genético e a avaliação de procedimentos reprodutivos são necessários para obter resultados viáveis e confiáveis. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do sistema seminatural e do acasalamento em proporções iguais de sexo na diversidade genética de um estoque de *Brycon orbignyana* utilizado em programas de repovoamento, com o marcador molecular RAPD. Depois da indução hormonal, 24 reprodutores (12♂/12♀) foram acasalados através do sistema reprodutivo seminatural, sendo coletadas 95 larvas da progênie. Os nove *primers* utilizados produziram 90 fragmentos, dos quais 70,59% foram polimórficos. Foi encontrado um aumento da diversidade genética na progênie (I. Shannon = 0,258 e 0,314; % fragmentos polimórficos = 41,11% e 52,22%; divergência genética = 0,162 e 0,172 para reprodutores e progênie, respectivamente) devido possivelmente ao número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) utilizado no acasalamento e ao sistema reprodutivo seminatural. Assim, a utilização de acasalamentos formados a partir de um número similar de reprodutores de *B. orbignyana* utilizando o sistema seminatural, pode diminuir a possibilidade de perda da variabilidade genética durante a reprodução, o que para progênies destinadas para programas de repovoamento pode significar um aumento da sua adaptabilidade e sobrevivência ao ambiente.

**Palavras chave:** *Brycon orbignyana*, divergência genética, piracanjuba, programas de repovoamento, RAPD, variabilidade genética.

**Efecto del sistema seminatural e del cruzamiento en proporciones iguales de sexo en la diversidad genética del *Brycon orbignyana***

**RESUMEN**

Los programas de repoblamiento están siendo usados con mayor frecuencia como métodos de conservación de peces, sin embargo, el monitoramiento y la evaluación de procedimientos reproductivos son necesarios para obtener resultados viables e confiables. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del sistema seminatural y del



cruzamiento en proporciones iguales de sexo en la diversidad genética de un lote de *Brycon orbignyanus* utilizado en programas de repoblamiento, con el marcador molecular RAPD. Después de la inducción hormonal, 24 reproductores (12♂/12♀) fueron cruzados a través del sistema reproductivo seminatural, siendo colectadas 95 larvas de la progenie. Los nueve iniciadores utilizados produjeron 90 fragmentos, de los cuales 70,59% fueron polimórficos. Fue verificado un aumento de la diversidad genética en la progenie (I. Shannon = 0,258 y 0,314; porcentaje fragmentos polimórficos = 41,11% y 52,22%; divergencia genética = 0,162 y 0,172 para reproductores y progenie, respectivamente) debido posiblemente al número efectivo de reproductores ( $N_e$ ) utilizado durante el cruzamiento y por el sistema reproductivo seminatural. Así, la utilización de cruzamientos formados a partir de un número semejante de reproductores de *B. orbignyanus* utilizando el sistema seminatural, puede disminuir la posibilidad de pérdida de la variabilidad genética durante la reproducción, lo que para progenies destinadas para programas de repoblamiento puede significar un aumento de su adaptabilidad y supervivencia al ambiente.

**Palabras clave:** *Brycon orbignyanus*, divergencia genética, piraicanjuba, programas de repoblamiento, RAPD, variabilidad genética.

**Effect of the semi-natural system and the mating in equal sex ratio in the genetic diversity of *Brycon orbignyanus***

**ABSTRACT**

The stock enhancement programs are being used more frequently as methods of fish conservation, however, the genetic monitoring and the reproductive procedures evaluation are necessary to achieve viable and reliable results. The purpose of this study was to evaluate the effect of the semi-natural system and the mating in equal sex proportions in the genetic diversity of *Brycon orbignyanus* stock used in stock enhancement programs, with the RAPD molecular marker. After the hormonal induction, 24 broodstocks (12♂/12♀) were crossed through the semi-natural reproductive system, being collected 95 larvae of the offspring. The nine primers used yielded 90 fragments, of which 70.59% were polymorphic. An increase of the genetic diversity was verified in the offspring (I. Shannon = 0.258 and 0.314; percentage fragments polymorphic = 41.11% and 52.22%; genetic divergence = 0.162 and 0.172

for broodstocks and offspring, respectively), due possibly to the effective broodstock number ( $N_e$ ) used in the mating and to the semi-natural reproductive system. This way, the mating use formed starting from an equal number of *B. orbignyanus* broodstocks using the semi-natural system, can reduce the possibility of loss of the genetic variability during the reproduction what to offspring which are designated for stock enhancement programs may mean an increase of their adaptability and survival to the environment.

**Key words:** *Brycon orbignyanus*, genetic divergence, genetic variability, piracanjuba, RAPD, stock enhancement programs.

## INTRODUÇÃO

Apesar da grande importância dos peixes para o homem, pouco se conhece da sua diversidade e estima-se que 20% da ictiofauna de água doce do mundo esteja extinta ou ameaçada de extinção (Hilsdorf e Petrere Jr, 2002). Nos últimos anos o interesse dos aqüiculturadores na utilização de espécies nativas com apreciáveis características zootécnicas tem aumentado, objetivando a produção, melhoria dos índices econômicos, o melhoramento genético e conservação genética e ambiental.

*B. orbignyanus* (Valenciennes, 1849), conhecido regionalmente no Brasil como piracanjuba ou bracanjuba (Ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae), é uma espécie migratória nativa das bacias formadas pelos rios Uruguai (Zaniboni-Filho e Schulz, 2003) e Paraná (Ganeco *et al.*, 2001). É um peixe apreciado por suas excelentes características nutricionais e sua notável condição de adaptabilidade ao manejo em ambientes controlados (Borba *et al.*, 2006).

Em resposta às modificações ambientais geradas por mudanças climáticas e principalmente por ações humanas, nos últimos anos populações naturais desse peixe têm desaparecido (Zaniboni-Filho *et al.*, 2006), sendo catalogada como espécie em risco de extinção (Machado, 2005; Lopera Barrero *et al.*, 2006). Por esse motivo, programas visando sua conservação estão sendo desenvolvidos em várias regiões do Brasil, com o repovoamento destacando-se como estratégia utilizada para atingir esse objetivo.

Os programas de repovoamento têm destaque por serem estratégias de conservação viáveis para a maioria dos piscicultores (Sirol e Britto, 2006), porém, é necessário um respaldo científico, onde áreas como a genética, ecologia, reprodução e

outras áreas permitam determinar objetivamente quais sistemas reprodutivos, técnicas e estratégias devem ser usados ou recomendados.

As análises genéticas de estoques de pisciculturas representam informações de grande importância para conseguir ganhos expressivos na produção e na conservação de peixes (Povh *et al.*, 2008), já que a perda da variabilidade genética dos estoques nas pisciculturas em função do inadequado manejo genético e descrito por Frost *et al.* (2006) como um problema que leva a endogamia, diminui a adaptabilidade e a sobrevivência de progênies usadas nestes programas (Povh, 2007). Esses problemas podem conseqüentemente afetar as populações naturais de peixes (Sønstebø *et al.*, 2007) e o ecossistema em geral, podendo até mesmo conduzir a espécie à extinção (Oliveira *et al.*, 2002). Para analisar a variabilidade genética, o marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem se mostrado efetivo e vem sendo utilizado com sucesso (Lopera Barrero *et al.*, 2006).

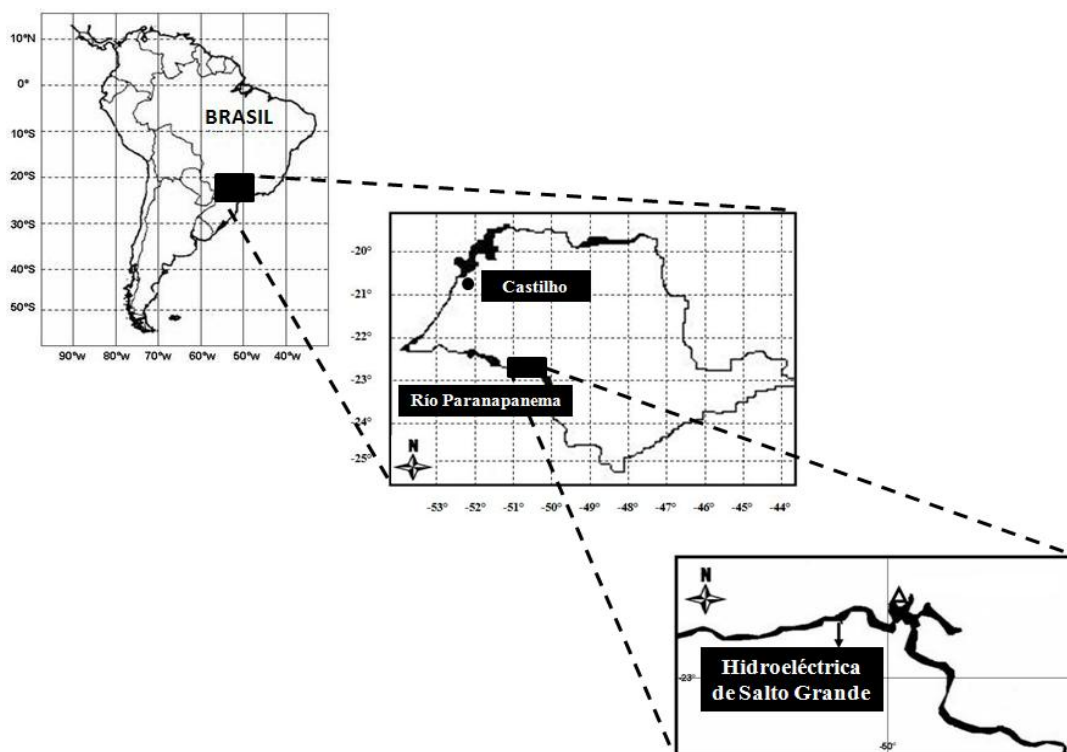
Em conjunto com as análises genéticas, o melhoramento dos processos de manejo reprodutivo deve ser realizado, já que um manejo inadequado resultado de práticas de acasalamentos realizados com um número insuficiente de reprodutores pode trazer problemas promovendo a perda da variabilidade genética (Aho *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do sistema seminatural e do acasalamento em proporções iguais de sexo na diversidade genética de um estoque de *B. orbignyanus* utilizado em programas de repovoamento do rio Paranapanema, utilizando o marcador molecular RAPD.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material Biológico**

Foram utilizados 24 reprodutores (12♂ e 12♀) de *B. orbignyanus* selecionados de um estoque de 136 indivíduos, estocados há seis anos nas instalações da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema), localizada na cidade de Salto Grande – SP, Brasil. Esses indivíduos são originários da primeira geração de um estoque pertencente a uma piscicultura localizada na cidade de Castilho, SP (Figura 1).



**Figura 1. Localização da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da *Duke Energy International* (Geração Paranapanema) e da cidade de Castilho, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.**

### **Formação de acasalamentos e reprodução**

O experimento foi realizado em novembro de 2006 nas instalações da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da *Duke Energy International* (Geração Paranapanema). Os 24 reprodutores foram conduzidos para o laboratório e induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa. As fêmeas receberam  $5,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira aplicação e 12 h depois os 90% restantes. Os machos receberam  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  em dose única. De todos os indivíduos foram coletadas amostras de nadadeira caudal ( $0,5 \text{ cm}^2$  aproximadamente), armazenadas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 100% para a posterior extração e amplificação do DNA.

Após a indução hormonal, os reprodutores foram colocados num tanque circular com um raio de 5,1 e 1,85 m de profundidade média e abastecido por um fluxo de água contínuo ( $131 \text{ L s}$ ) em dois sentidos de vazão. O escoamento da água na porção central mediante um cano de seis polegadas permitiu o direcionamento dos ovos para uma

estação coletora, onde os ovos ficaram vertidos numa incubadora cilindro-cônica de captação de 200 L com fluxo contínuo de água (7 L s). A função desta incubadora de captação foi reter os ovos obtidos na reprodução para em seguida estes serem levados a incubadoras individuais do tipo cilindro cônicas.

Aproximadamente seis horas depois da última indução (160 horas-grau, 27 °C) foi dado início a coleta de ovos. Estabeleceu-se um período de coleta de no máximo seis horas, com a retirada dos ovos da incubadora de captação a cada hora sendo em seguida, conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônicas onde ocorreu a incubação dos ovos. A porcentagem de mortalidade dos reprodutores (fêmea/macho) usados nos acasalamentos foi definida um dia depois da reprodução.

Três dias depois da eclosão dos ovos, aproximadamente 200 larvas foram coletadas de forma aleatória de todas as incubadoras em todos os horários, sendo armazenadas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 100%. Dessas larvas, 95 foram coletadas aleatoriamente para posterior extração e amplificação do DNA.

### **Extração de DNA**

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Lopera-Barrero *et al.* (2008). Em microtubos contendo separadamente as larvas e as nadadeiras, foram adicionados 550 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) e 7 µL de proteinase K (200 µg mL<sup>-1</sup>). As amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C por 12 h. O DNA foi precipitado com 600 µL de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos, precipitado com 700 µL de álcool etílico absoluto e incubado por uma hora a -20 °C. O DNA foi centrifugado, lavado com 700 µL de álcool etílico 70%, ressuspendido em tampão TE - 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA (80 µL para nadadeira e 35 µL para larva), e tratado com 7 µL de RNase (30 µg mL<sup>-1</sup>) em banho-maria a 37 °C por uma hora, e em seguida estocado no freezer a -20°C.

### **Quantificação e Amplificação do DNA**

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260 nm. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng µL<sup>-1</sup>

(reprodutores) e  $5 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$  (larvas). Para conferir a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico e 83 mM EDTA) por uma hora a 70 V.

O DNA genômico foi amplificado para 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 (Invitrogen®, EUA), 10 ng de DNA molde para os reprodutores e 5 ng para as larvas. O DNA foi desnaturado a 94 °C por quatro minutos e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de: um min de desnaturação a 94 °C, 90 s de anelamento do *primer* a 40 °C e dois min para extensão a 72 °C. Após realizou-se uma extensão final a 72 °C por cinco min. As reações de RAPD foram realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (EUA).

Foi avaliada a amplificação de 60 *primers* de 10 bases dos Kits OPA OPX e OPW (Operon Technologies Ltd., EUA) sendo escolhidos os que apresentaram melhor definição e reprodutibilidade. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 15  $\mu\text{L}$  do produto amplificado e 2  $\mu\text{L}$  de tampão de amostra (40% sacarose e 0,25% azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-Borato e 1 mM EDTA) por quatro horas a 70 V. Os géis de quantificação e amplificação foram visualizados sob radiação UV, depois da coloração em banho de brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por uma hora. A imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EUA).

### **Análise Estatística**

O tamanho dos fragmentos obtidos a partir das amplificações foi estimado por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®, EUA). A presença ou ausência de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo no coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmento e 0 como sua ausência.

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). Os valores de divergência genética foram obtidos e calculados usando o teste de Mantel pelo método de Monte Carlo, através do programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 60 *primers* testados, nove foram escolhidos para amplificar o DNA genômico. Na Tabela 1, pode-se observar a seqüência dos *primers* selecionados, a porcentagem de G+C, o número de fragmentos e o tamanho dos fragmentos amplificados para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyanus*.

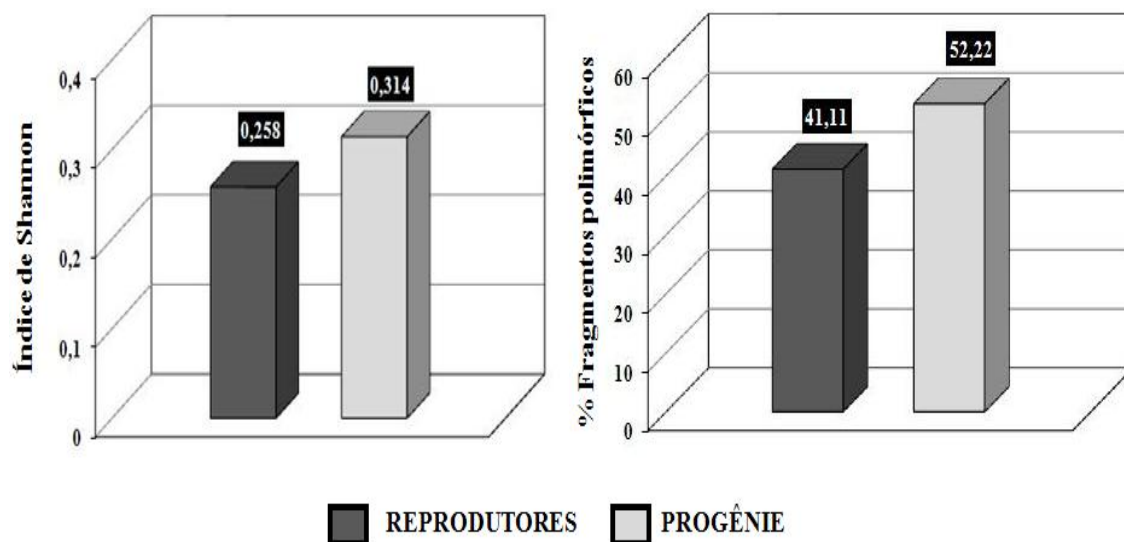
**Tabela 1. Seqüências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de G+C e número e tamanho dos fragmentos amplificados para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyanus*.**

<i>Primer</i>	Seqüência	G + C	No. Fragmentos	Tamanho Fragmentos
OPA01	CAG GCC CTT C	70	10	350 – 2000
OPA02	TGC CGA GCT G	70	12	350 – 1600
OPW01	CTC AGT GTC C	60	9	500 – 1600
OPW02	ACC CCG CCA A	70	14	400 – 2200
OPW03	GTC CGG AGT G	70	8	400 – 1500
OPW04	CAG AAG CGG A	60	9	500 – 2000
OPW08	GAC TGC CTC T	60	8	300 – 2000
OPW13	CAC AGC GAC A	60	9	500 – 1600
OPX01	CTG GGC ACG A	70	11	300 – 1600
<b>Total</b>	---	---	<b>90</b>	<b>300 – 2200</b>

A amplificação dos nove *primers* produziu 90 fragmentos, com tamanho entre 300 e 2200 pb. O número total de fragmentos que foram selecionados para serem usados nas análises variou de oito (OPW03 e OPW08) a 14 (OPW02). O maior fragmento (2200 pb) foi obtido pela amplificação do *primer* OPW02 e o menor (300 pb)

foi obtido pela amplificação dos *primers* OPW08 e OPX01. Dos 90 fragmentos obtidos 85 (94,44%) foram polimórficos.

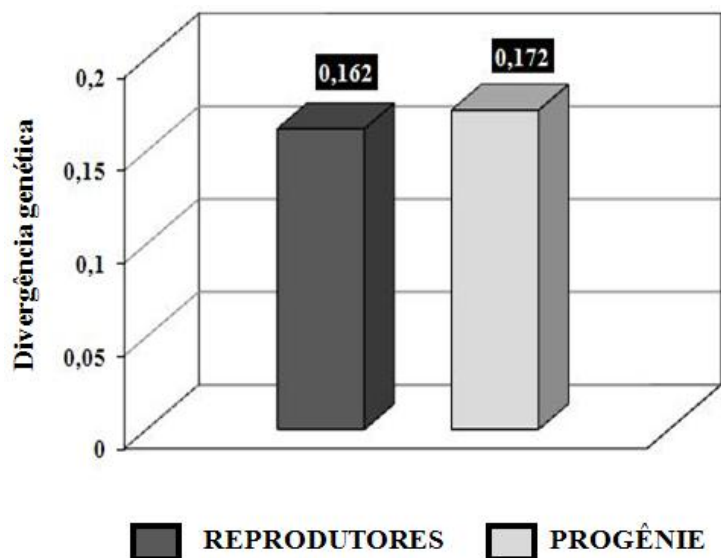
Os resultados de variabilidade genética estimados pelo índice de diversidade genética de Shannon (IS) e pela porcentagem de fragmentos polimórficos (%FP) mostraram um aumento da variabilidade genética na progênie (Figura 2).



**Figura 2. Índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyana*.**

Os valores estimados de divergência genética (DG) mostraram igualmente que a variabilidade genética foi preservada ( $<0,001$ ), demonstrado através do aumento da divergência na progênie (Figura 3).





**Figura 3. Divergência genética obtida para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyanus*.**

A porcentagem de fragmentos polimórficos (Leuzzi *et al.*, 2004; Paiva *et al.*, 2006; Sofia *et al.*, 2006), o índice de diversidade de Shannon (Oliveira *et al.*, 2002; Prioli *et al.*, 2002; Povh *et al.*, 2005) e a divergência genética (Lopera-Barrero *et al.*, 2006), são parâmetros que têm sido utilizados com sucesso na estimativa de níveis de diversidade genética em diferentes estoques e em populações naturais de peixes neotropicais. Neste estudo essas estimativas mostraram-se eficientes na determinação da diversidade genética dos parentais e da progênie.

Os resultados de variabilidade e divergência genética encontrados neste estudo podem ser explicados pelo efeito da proporção sexual utilizada no acasalamento. Isto pode interferir no número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) que participaram na reprodução, onde o acasalamento em proporções iguais de sexo (12♂ e 12♀) pode ter permitido uma maior oportunidade de acasalamento para todos os indivíduos utilizados, acontecendo uma fertilização mais uniforme dos ovócitos. Segundo Sekino *et al.* (2003), uma fertilização uniforme dos ovócitos pode proporcionar um aumento do  $N_e$ , o que diretamente poderia viabilizar melhores porcentagens de eclosão e altas porcentagens de sobrevivência dos indivíduos nos diferentes estádios de desenvolvimento. Este fato foi demonstrado pela alta variabilidade e divergência genética encontrada na progênie (IS = 0,314; %LP = 52,22%; DG = 0,172) que pode presumir a participação reprodutiva da maioria dos reprodutores durante o acasalamento.

Segundo e Moreira (2001) e Frost *et al.* (2006), o sistema reprodutivo (formação de acasalamentos e relação de sexos) e flutuações no tamanho das populações podem reduzir o número de animais em idade de reprodução que tenham capacidade de deixar uma descendência viável ( $N_e$ ), sendo recomendado equilibrar o número de fêmeas e machos usados durante a reprodução e manter o  $N_e$  tão grande quanto possível para assim obter uma alta variação e contribuição reprodutiva entre os indivíduos e suas progênes, reduzir o aparecimento de endogamia (Qin *et al.*, 2007) e conseqüentemente preservar a variabilidade genética. Estas premissas concordam com os resultados deste estudo, onde a variabilidade genética foi preservada na progênie.

Alguns trabalhos têm demonstrado a influência do sistema de acasalamento na variabilidade genética de estoques na piscicultura. Povh (2007) comparando o sistema de reprodução seminatural e por extrusão em um estoque de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), encontrou um aumento da variabilidade genética quando utilizado o sistema seminatural (IS = 0,365 e %FP = 60,5%), utilizando um acasalamento em proporções iguais de sexo. Da mesma forma, Oota e Matsuishi (2005) utilizando um modelo baseado no histórico individual de vida, encontraram que ao acasalar 10 machos e 90 fêmeas, o coeficiente de endogamia aumentou cinco vezes mais na 50ª geração do que quando utilizada uma proporção de sexos 50:50. Estes autores concluem que quando a proporção de fêmeas utilizada no acasalamento é de 10% a 30% o coeficiente de endogamia aumenta, diferentemente quando utilizada uma proporção de 40% a 50%, onde esse coeficiente tem um pequeno efeito.

Segundo Moreira *et al.* (2007), a perda de variabilidade genética na piscicultura é esperada quando existe um manejo reprodutivo inadequado devido ao cruzamento de indivíduos aparentados, o que conseqüentemente aumenta o coeficiente de endogamia (Kang *et al.*, 2006), reduzindo o número efetivo de reprodutores (Frost *et al.*, 2006). Esta situação é bastante comum em pisciculturas, já que o método mais utilizado na formação de novos estoques é a seleção de indivíduos com características visuais favoráveis. Normalmente os reprodutores com melhores características reprodutivas são selecionados, podendo promover o efeito gargalo (*bottleneck effect*) devido a seleção intencional, apresentando problemas de endogamia pelo grande relacionamento parental, ocasionando perda de variabilidade genética nos reprodutores (Aho *et al.*, 2006) e conseqüentemente em suas progênes.

Nos resultados do presente estudo observou-se que o efeito gargalo não influenciou o estoque de reprodutores o qual apresentou uma alta diversidade genética (IS = 0,258; %LP = 41,11%; DG = 0,162). Isso caracteriza que houve um adequado manejo reprodutivo, onde a formação de estoques com suficiente variabilidade genética (efeito fundador) e a utilização de sistemas reprodutivos e cruzamentos eficientes (Povh, 2007), possivelmente, permitiram manter o *pool* genético do estoque de reprodutores e utilizá-lo corretamente com a finalidade de repovoamento.

Além do sistema de acasalamento, o sistema reprodutivo seminatural utilizado no presente estudo também pode ter influenciado na variabilidade genética da progênie, já que reduz a seleção não intencional no processo reprodutivo que acontece normalmente no sistema reprodutivo por extrusão (Povh, 2007) e diminui significativamente a mortalidade causada pelo estresse. Isto possibilita que um maior número de reprodutores se reproduza durante os acasalamentos (Sirol e Britto, 2006), permitindo que o *pool* genético de um estoque pequeno ou de um acasalamento com poucos indivíduos seja representado com maior heterogeneidade na progênie (Cacho *et al.*, 2007), devido ao menor efeito seletivo do sistema e a maior taxa de sobrevivência dos reprodutores. Além disso, nesse sistema os indivíduos sincronizam a liberação dos gametas, garantindo assim uma alta taxa de fertilização (Reynalte-Tataje *et al.*, 2002).

No presente estudo, mediante a utilização do sistema reprodutivo seminatural, não houve mortalidade dos reprodutores utilizados e todos eles apresentaram desova/espermiação no acasalamento, demonstrando a efetividade desse sistema reprodutivo na preservação dos reprodutores. Conseqüentemente, essa preservação permite a participação reprodutiva de todos os indivíduos durante o acasalamento, o que pode viabilizar a manutenção da variabilidade genética na progênie.

Outros estudos confirmam os resultados de sobrevivência e fertilização encontrados para o *B. orbignyana*. Reynalte-Tataje *et al.* (2002) trabalhando na reprodução do *Leporinus macrocephalus* não encontraram mortalidade dos reprodutores (100% de sobrevivência) e observaram uma alta porcentagem de fertilização (94,5%), ao utilizar o sistema seminatural, diferente no sistema por extrusão onde esses resultados chegaram a 66,7% e 25,8% respectivamente. Povh (2007) analisando estoques de *P. mesopotamicus* nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural encontraram que ao utilizar o sistema por extrusão, só 60% das fêmeas desovaram, entretanto na utilização do sistema seminatural 82,5% delas participaram na reprodução.

A partir dessas evidências e dos resultados de diversidade genética dos reprodutores e da progênie de *B. orbignyana*, pode-se sugerir que o sistema reprodutivo seminatural e o sistema de acasalamento em proporções iguais de sexo, são os mais indicados para a reprodução desta espécie em ambientes controlados, já que diminuem a mortalidade dos reprodutores durante o processo reprodutivo e permitem a manutenção da variabilidade genética. Estes resultados concordam com Povh (2007) o qual concluiu que quando o objetivo da alevinocultura é a produção de juvenis para programas de repovoamento, deve-se preconizar o sistema reprodutivo seminatural.

Uma estratégia comum para evitar a redução da variabilidade genética mediante a utilização de *pools* de reprodutores, pode ser a utilização de um grande número deles no acasalamento. A utilização de um grande número de reprodutores normalmente é inviabilizada devido à falta de infra-estrutura nas pisciculturas que permitam o manejo de um grande número de reprodutores e das progênies obtidas durante a reprodução. Porém, pode-se sugerir que durante a formação de acasalamentos destinados para produção, formação de novos estoques ou programas de repovoamento do *B. orbignyana* é necessário utilizar a maior quantidade de reprodutores possível (como mínimo 15♂ e 15♀) durante todo o período reprodutivo. Esta recomendação concorda com os resultados encontrados por Yokota *et al.* (2003), os quais constataram que o aumento do  $N_e$  de 20 (10♂ e 10♀) para 50 (25♂ e 25♀) proporcionou uma maior variabilidade genética na progênie.

Os resultados observados neste estudo são de grande importância, já que a partir deles o manejo reprodutivo dos estoques de *B. orbignyana* utilizados em programas de repovoamento pode ser orientado corretamente e com maior objetividade. A diminuição da variabilidade genética pode tornar um programa de repovoamento ineficiente (baixa sobrevivência de juvenis no ambiente aquático) e proporcionar impactos genéticos irreversíveis nas populações naturais (Sønstebø *et al.*, 2007; Povh *et al.*, 2008) que podem levar à extinção das espécies.

As espécies de importância comercial e especialmente aquelas ameaçadas de extinção, como é o caso da analisada neste estudo, requerem um constante monitoramento dos seus estoques, das suas progênies e das suas populações naturais. Nesse contexto, o marcador RAPD permitiu determinar com sucesso a variabilidade genética presente nos reprodutores e nas progênies após o acasalamento utilizando o sistema seminatural. Pelo caráter dominante do marcador não foi possível determinar

quantos reprodutores realmente contribuíram com a formação da progênie nos dois sistemas de acasalamento. Contudo, a falta de mortalidade e a alta desova/espermiacão observados nos reprodutores, podem fundamentar que possivelmente todos os machos ou a maioria deles participaram na reprodução durante o acasalamento.

## CONCLUSÕES

Nos resultados encontrados neste estudo fica evidenciado como a utilização de acasalamentos formados a partir um número igual de reprodutores de *B. orbignyana* utilizando o sistema seminatural, diminuiu a possibilidade de perda da diversidade genética durante a reprodução, o que em progênies destinadas para programas de repovoamento pode significar um aumento da adaptabilidade e sobrevivência ao ambiente.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a empresa de geração de energia hidrelétrica Duke Energy Internacional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio ao presente trabalho.

## LITERATURA CITADA

- Aho, T., J. Rönn, J. Piironen and M. Björklund M. 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253: 244-248.
- Borba, M.R., D.M. Fracalossi and L.E. Pezzato. 2006. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyana*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquac. Nut.* 12: 183-191.
- Cacho, M.S.R.F., M.E. Yamamoto and S. Chellappa. 2007. Mating system of the amazonian cichlid angel fish, *Pterophyllum scalare*. *Braz. J. Biol.* 67: 161-165.
- Frost, L.A., B.S. Evans and D.R. Jerry. 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261: 1056-1064.

- Ganeco, L., L. Nakaghi, E. Urbinati, R. Dumont-Neto e L.H. Vasques. 2001. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante o ciclo reprodutivo. B. Inst. Pesca. 27: 131-138.
- Hilsdorf, A. e M. Petrere Jr. 2002. Conservação de peixes na bacia do rio do Paraíba do Sul. Ciência Hoje 30: 62-65.
- Kang, J.H., J.K. Noh, J.H. Kim, J.H. Lee, H.C. Kim, K.K. Kim, B.S. Kim and W.J. Lee. 2006. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. Aquac. Res. 37: 701-707.
- Leuzzi, M.S.P., F.S. Almeida, M.L. Orsi and L.M.K. Sodré. 2004. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. Genet. Mol. Biol. 27: 355-362.
- Lopera-Barrero, N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo e T.S. Lopes. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). Cien. Inv. Agr. 35: (prelo).
- Lopera-Barrero, N.M., R.P. Ribeiro, R.N. Sirol, J.A. Povh, P.C. Gomes, L. Vargas, and D.P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. In: Annual Meeting of American Dairy Science Association and American Society of Animal Science. July 11. Minneapolis, EE.UU., p: 170-170.
- Machado, A.B.M. 2005. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinci o: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. In: Lista da Fauna Brasileira ameaçada de extinci o. Machado, A.B.M., C.S. Martins e G.M. Drummond (eds). Funda o Biodiversitas, Belo Horizonte. 160 p.
- Melo, D.C., D.A.A. Oliveira, L.P. Ribeiro, C.S. Teixeira, A.B. Souza, E.G.A. Coelho, D.V. Crepaldi e E.A. Teixeira. 2006. Caracteriza o genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 58: 87-93.
- Miller, M. 1999. Mantel-Struct: a program for the detection of population structure via mantel tests. Journal Hered. 90: 258-259.

- Moreira, A.A., A.W.S. Hilsdorf, J.V. Silva e V.R. Souza. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. *Pesqui. Agropecu. Bras.* 42: 521-526.
- Moreira, H.L.M. 2001. Genética e Melhoramento de Peixes. *In: Fundamentos da moderna aquicultura.* Moreira, H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro e S. Zimmermann (eds). ULBRA, Canoas. p. 135-147.
- Oliveira, A.V., A.J. Prioli, S.M.A.P. Prioli, C.S. Pavanelli, H.F. Júlio Jr and R.S. Panarari. 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná River floodplain. *Genética* 115: 259-267.
- Oota, T. and Matsuishi, 2005. T. Increase of inbreeding by stocking on wild population assessed by using individual-based life history model. *Fish. Sci.* 71: 73-78.
- Paiva, S.R., J.A. Dergam and F. Machado. 2006. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). *Hydrobiologia* 560: 393-404.
- Povh, J.A. 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 75 p.
- Povh, J.A., H.L.M. Moreira, R.P. Ribeiro, A.P. Prioli, L. Vargas, D.V. Blanck, E. Gasparino and D.P. Streit Jr. 2005. Estimativa da variabilidade genética em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Sci. Anim. Sci.* 27: 1-10.
- Povh, J.A., N.M. Lopera Barrero, R.P. Ribeiro, E. Lupchinski Jr, P.C. Gomes y T.S. Lopes. 2008. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr.* 35: (prelo).
- Prioli, S.M.A.P., A.J. Prioli, H.F. Júlio Jr, C.S. Pavanelli, A.V. Oliveira, H. Carrer, D.M. Carraro and L.M. Prioli. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.* 25: 421-430.
- Qin, Y., X. Liu, H. Zhang and G. Zhang. 2007. Effect of parental stock size on F1 genetic structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Aquac. Res.* 38: 174-181.

- Reynalte-Tataje, D.A., B.M. Esquivel, J.R. Esquivel, E. Zaniboni-Filho. 2002. Reproducción inducida del piauçu, *Leporinus macrocephalus* Garavello y Britski, 1988 (Characiformes, Anostomidae). B. Inst. Pesca. 28: 11-18.
- Sekino, M., K. Saitoh, T. Yamada, A. Kumagai, M. Hara and Y. Yamashita. 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.
- Sirol, R.N. e S.G. Britto. 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. Nogueira, M.G., R. Henry e A. Jorcin (eds) RiMA, São Carlos. pp 275-284.
- Sofia, S.H., C.R.M. Silva, B.A. Galindo, F.S. Almeida, L.M.K. Sodr e and C.B.R. Martinez. 2006. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. Hydrobiologia 553: 245-254.
- Sønstebø, J.H., R. Borgstr m and M. Heun. 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.
- Yeh, F.C., T.Y.Z. Boyle and J.M. Xiyan. 1999. PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research. Alberta. 29 p.
- Yokota, M., Y. Harada and M. Iizuka. 2003. Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. Fish. Sci. 69: 101-109.
- Zaniboni-Filho, E., D. Reynalte-Tataje and M. Weingartner. 2006. Potencialidad del g nero *Brycon* en la piscicultura brasileña. Rev. Col. Cienc. Pec. 19: 233-240.
- Zaniboni-Filho, E. and U.H. Schulz. 2003. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status. Carolsfeld, J., B. Harvey, C. Ross and A. Baer (eds). World Fisheries Trust, Victoria. pp. 253-271.



**IV. DIVERSIDADE GENÉTICA DE UMA PROGÊNIE DE  
PIRACANJUBA NO SISTEMA SEMINATURAL EM  
PROPORÇÕES DESIGUAIS DE SEXO**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: Pesquisa Agropecuária Brasileira**

**“Genetic diversity of a piracanjuba offspring in the semi-natural  
system in unequal sex proportions”**

## **Diversidade genética de uma progênie de piracanjuba no sistema seminatural em proporções desiguais de sexo**

**Resumo** - Na implantação de programas de manejo e repovoamento como estratégias de conservação de peixes, o monitoramento genético e a avaliação de procedimentos reprodutivos são necessários para obter uma correta manutenção e uma maior objetividade nesses programas. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do sistema seminatural e do acasalamento em proporções desiguais de sexo na diversidade genética de um estoque de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) utilizado em programas de repovoamento, com o marcador molecular RAPD. Depois da indução hormonal, 15 reprodutores (10♂/5♀) foram acasalados, sendo coletadas 95 larvas da progênie. Os nove iniciadores utilizados produziram 90 fragmentos, dos quais 55,45% foram polimórficos. Foi encontrada uma diminuição da diversidade genética na progênie (I. Shannon = 0,215 e 0,188; % fragmentos polimórficos = 34,44% e 33,33%; divergência genética = 0,118 e 0,077 para reprodutores e progênie, respectivamente). Estes resultados podem ter sido influenciados pelo sistema seminatural e pela proporção sexual utilizada no acasalamento. Assim, a utilização de acasalamentos formados a partir de um número desigual de reprodutores de *B. orbignyanus* utilizando o sistema seminatural, pode diminuir a variabilidade genética durante a reprodução, o que em progênies destinadas para programas de repovoamento pode significar uma diminuição da adaptabilidade e sobrevivência no ambiente.

**Termos para indexação:** *Brycon orbignyanus*, divergência genética, marcador molecular, programas de repovoamento, RAPD, variabilidade genética.

## **Genetic diversity of a piracanjuba offspring in the semi-natural system in unequal sex proportions**

**Abstract** - In the implantation of management and stock enhancement programs as strategies of fish conservation, the genetic monitoring and the reproductive procedures evaluation are necessary to achieve a correct maintenance and a greater objectivity of such programs. The purpose of this study was to evaluate the effect of the semi-natural system and the mating in unequal sex proportions in the genetic diversity of piracanjuba

(*Brycon orbignyanus*) stock used in stock enhancement programs, with the RAPD molecular marker. After the hormonal induction, 15 broodstocks (10♂/5♀) were crossed, being collected 95 larvae of the offspring. The nine primers used yielded 90 fragments, of which 55.45% were polymorphic. It was found a decrease of the genetic diversity in the offspring (I. Shannon = 0.215 and 0.188; % polymorphic fragments = 34.44% and 33.33%; genetic divergence = 0.118 and 0.077 for broodstocks and offspring, respectively). These results might have been influenced by the semi-natural system and the sexual proportion used in mating. Like this, the use of mating formed starting from an unequal number of *B. orbignyanus* broodstocks using the semi-natural system, can reduce the genetic variability during the reproduction, which in offspring's designated to stock enhancement programs may mean a decrease of adaptability and survival in the environment.

**Index terms:** *Brycon orbignyanus*, genetic divergence, genetic variability, molecular marker, RAPD, stock enhancement programs.

## Introdução

O desmatamento ciliar, redução das fontes de alimento, construção de hidrelétricas e de sistemas de drenagens para aproveitamento agrícola (Hatanaka et al., 2006), degradação da qualidade da água em função da poluição (Hori et al., 2006), ecoturismo mal planejado e a falta de conhecimento taxonômico (Agostinho et al., 2005) são algumas das principais causas que têm levado à diminuição e extinção de várias espécies de peixes nas últimas décadas.

Entre essas espécies, a piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae), que é uma espécie migratória nativa das bacias formadas pelos rios Uruguai (Zaniboni-Filho & Schulz, 2003) e Paraná (Ganeco et al., 2001), tem despertado grande interesse de pesquisadores e produtores, pois nos últimos anos tem apresentado uma redução drástica nas populações naturais (Zaniboni-Filho et al., 2006) apresentando risco de extinção (Machado, 2005; Borba et al., 2006).

Das diversas ferramentas utilizadas para reduzir os impactos provocados sobre as populações de peixes, a prática do repovoamento dos rios vem se tornando cada vez mais comum (Hilsdorf et al., 2006; Agostinho & Gomes, 2006). Porém, sem um apoio

científico que permita sua correta orientação, estes programas podem tornar-se uma ameaça maior para os ecossistemas e para as populações naturais de peixes (Agostinho et al., 2005; Gomes, 2007).

Constantes estudos da biologia e comportamento do *B. orbignyanus*, em conjunto com uma abordagem genética de populações naturais e de estoques mantidos em cativeiro monitorado por marcadores moleculares, por exemplo, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), representa informações de grande importância para conseguir ganhos expressivos na sua produção e na sua conservação. Segundo Aho et al. (2006), devido ao inadequado manejo reprodutivo tem ocorrido perda de variabilidade genética dos estoques de peixes utilizados na piscicultura, intensificando seu efeito de forma que o componente genético dos descendentes vai se homogeneizando, até diferir das populações naturais (Pineda-Santis, 2004). A perda de variabilidade genética pode levar a problemas de adaptabilidade e sobrevivência de progênes usadas em programas de repovoamento (Povh et al., 2008). Esses problemas podem conseqüentemente afetar as populações naturais de peixes (Sønstebø et al., 2007) e o ecossistema em geral, podendo conduzir a espécie a extinção (Agostinho et al., 2005).

Assim, a primeira providência a ser tomada na implantação de uma piscicultura ou qualquer programa de melhoramento genético e repovoamento é monitorar a variabilidade genética dos estoques, a fim de selecionar aqueles que efetivamente possam contribuir com a formação de um estoque com base genética suficientemente ampla para tais objetivos (Lopera-Barrero et al., 2008a).

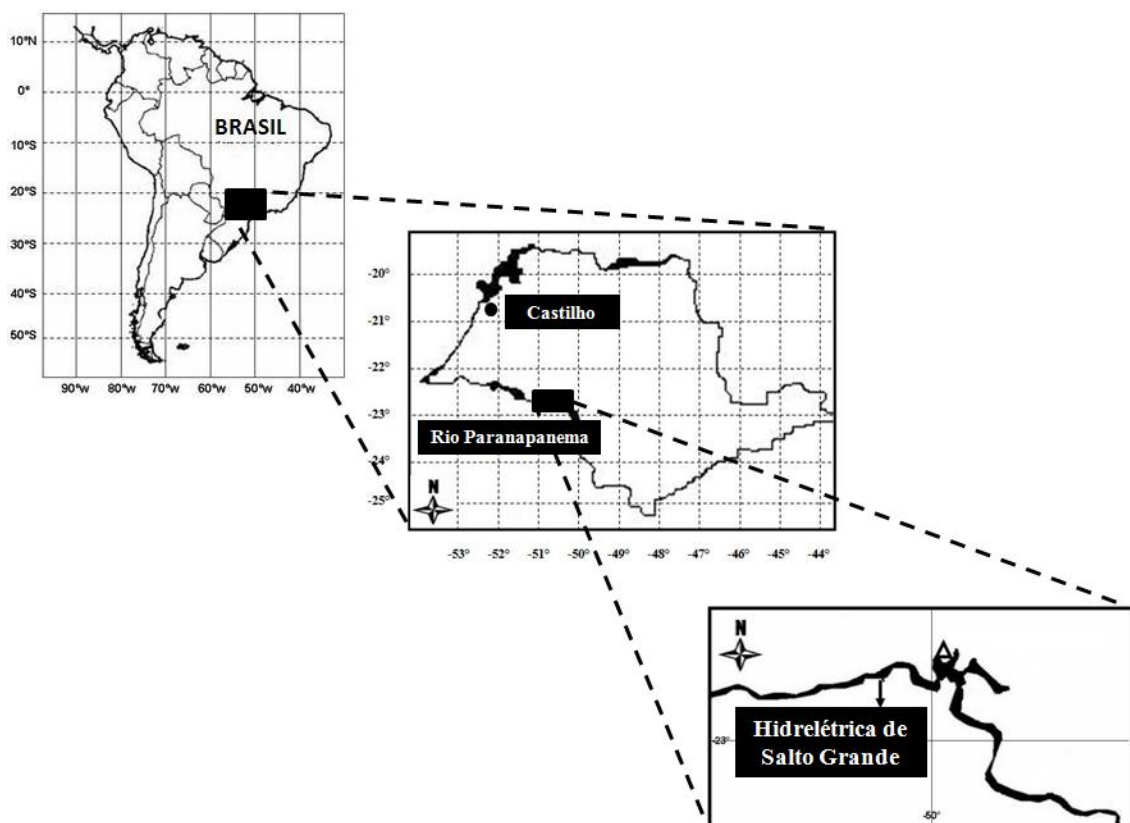
Em adição às análises genéticas, a melhora do manejo reprodutivo deve ser também realizada, já que um manejo inadequado resultado de práticas de acasalamentos com um número insuficiente de reprodutores pode trazer problemas ao promover a perda da variabilidade genética (Aho et al., 2006; Melo et al., 2006).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do sistema seminatural e do acasalamento em proporções desiguais de sexo na diversidade genética de um estoque de piracanjuba (*B. orbignyanus*) utilizado em programas de repovoamento do rio Paranapanema, com o marcador molecular RAPD.

## Material e Métodos

### Material Biológico

Foram utilizados 15 reprodutores (10♂ e 5♀) de *B. orbignyanus* selecionados de um estoque de 136 indivíduos, estocados há seis anos nas instalações da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema), localizada na cidade de Salto Grande – SP, Brasil. Esses indivíduos são originários da primeira geração de um estoque pertencente a uma piscicultura localizada na cidade de Castilho, SP (Figura 1).



**Figura 1.** Localização da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da *Duke Energy International* (Geração Paranapanema) e da cidade de Castilho, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.

## **Formação de acasalamentos e reprodução**

O experimento foi realizado em novembro de 2006 nas instalações da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema). Os 15 reprodutores foram conduzidos para o laboratório e induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa. As fêmeas receberam  $5,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira aplicação e 12 horas depois os 90% restantes. Os machos receberam  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  em dose única. De todos os indivíduos foram coletadas amostras de nadadeira caudal ( $0,5 \text{ cm}^2$  aproximadamente), armazenadas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 100% para a posterior extração e amplificação do DNA.

Após a indução hormonal, os reprodutores foram colocados num tanque circular com um raio de 5,1 m e 1,85 m de profundidade média e abastecido por um fluxo de água contínuo (131 L s) em dois sentidos de vazão. O escoamento da água na porção central mediante um cano de seis polegadas permitiu o direcionamento dos ovos para uma estação coletora, onde os ovos ficaram vertidos numa incubadora cilindro-cônica de captação de 200 litros com fluxo contínuo de água (7 L s). A função desta incubadora de captação foi reter os ovos obtidos na reprodução para em seguida estes serem levados a incubadoras individuais do tipo cilindro cônicas.

Aproximadamente seis horas depois da última indução (160 horas-grau,  $27^\circ\text{C}$ ) foi dado início a coleta de ovos. Estabeleceu-se um período de coleta de no máximo seis horas, com a retirada dos ovos da incubadora de captação a cada hora sendo em seguida, conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônicas onde ocorreu a incubação dos ovos. A porcentagem de mortalidade dos reprodutores (fêmea/macho) usados nos acasalamentos foi definida um dia depois da reprodução.

Três dias depois da eclosão dos ovos, aproximadamente 200 larvas foram coletadas de forma aleatória de todas as incubadoras em todos os horários, sendo armazenadas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 100%. Dessas larvas, 95 foram coletadas aleatoriamente para posterior extração e amplificação do DNA.

## Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008b). Em microtubos contendo separadamente as larvas e as nadadeiras, foram adicionados 550  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 7  $\mu\text{L}$  de proteinase K ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 12 horas. O DNA foi precipitado com 600  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos, precipitado com 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico absoluto e incubado por uma hora a -20 °C. O DNA foi centrifugado, lavado com 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 70%, ressuscitado em tampão TE - 10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA -(80  $\mu\text{L}$  para nadadeira e 35  $\mu\text{L}$  para larva), e tratado com 7  $\mu\text{L}$  de RNase ( $30 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em banho-maria a 37 °C por uma hora, e em seguida estocado no freezer a -20 °C.

## Quantificação e Amplificação do DNA

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260nm. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (reprodutores) e 5 ng  $\mu\text{L}^{-1}$  (larvas). Para conferir a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA) por uma hora a 70 volts.

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 (Invitrogen®, EUA), 10 ng de DNA para os reprodutores e 5 ng para as larvas. 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, 90 segundos de anelamento do *primer* a 40 °C e dois minutos para extensão a 72 °C. Após realizou-se uma extensão final a 72 °C por cinco minutos. As reações de RAPD foram realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (EUA).

Foi avaliada a amplificação de 60 *primers* de 10 bases dos Kits OPA OPX e OPW (Operon Technologies Ltd., EUA) sendo escolhidos os que apresentaram melhor

definição e reprodutibilidade. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 15  $\mu$ L do produto amplificado e 2  $\mu$ L de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. 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. Os géis de quantificação e amplificação foram visualizados sob radiação UV, depois da coloração em banho de brometo de etídio (0,5  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) por uma hora. A imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EUA).

### **Análise Estatística**

O tamanho dos fragmentos obtidos a partir das amplificações foi estimado por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®, EUA). A presença ou ausência de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo no coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmento e 0 como sua ausência.

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). Os valores de divergência genética foram obtidos e calculados usando o teste de Mantel pelo método de Monte Carlo, através do programa Mantel-Struct (Miller, 1999).

## **Resultados e Discussão**

Dos 60 *primers* avaliados nove foram escolhidos para amplificar o DNA dos parentais e da progênie de *B. orbignyanus*. Na Tabela 1, pode-se observar a seqüência dos iniciadores selecionados, a porcentagem de G+C, o número de fragmentos e o tamanho dos fragmentos amplificados utilizando o marcador molecular RAPD para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyanus*.

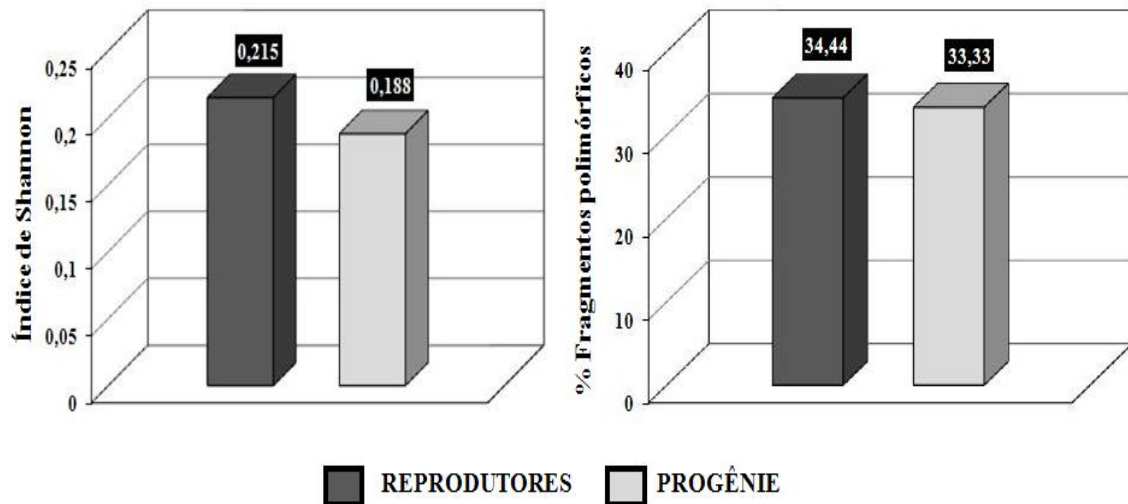


**Tabela 1.** Seqüências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de G+C e número e tamanho dos fragmentos amplificados para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyana*.

<i>Primer</i>	Seqüência	G + C	No. Fragmentos	Tamanho Fragmentos
OPA01	CAG GCC CTT C	70	10	350 – 2000
OPA02	TGC CGA GCT G	70	12	350 – 1600
OPW01	CTC AGT GTC C	60	9	500 – 1600
OPW02	ACC CCG CCA A	70	14	400 – 2200
OPW03	GTC CGG AGT G	70	8	400 – 1500
OPW04	CAG AAG CGG A	60	9	500 – 2000
OPW08	GAC TGC CTC T	60	8	300 – 2000
OPW13	CAC AGC GAC A	60	9	500 – 1600
OPX01	CTG GGC ACG A	70	11	300 – 1600
<b>Total</b>	---	---	<b>90</b>	<b>300 – 2200</b>

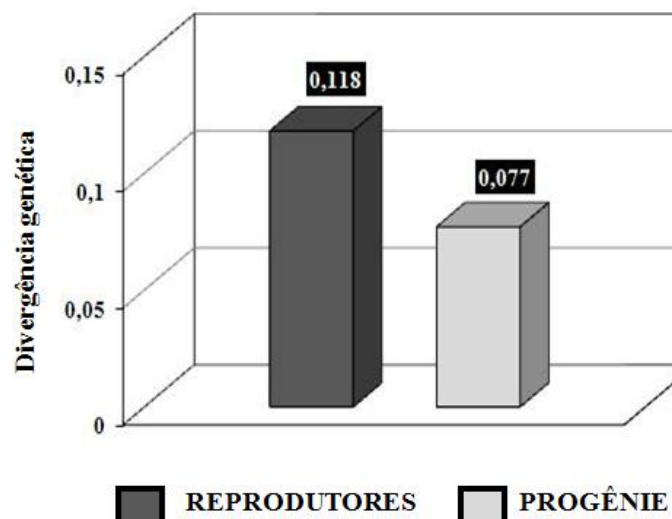
A amplificação utilizando os nove *primers* selecionados gerou 90 fragmentos, com tamanho entre 300 e 2200 pb. O número total de fragmentos que foram selecionados para serem usados nas análises variou de oito (OPW03 e OPW08) a 14 (OPW02). O maior fragmento (2200 pb) foi obtido pela amplificação do *primer* OPW02 e o menor (300 pb) foi obtido pela amplificação dos *primers* OPW08 e OPX01. Dos 90 fragmentos obtidos, 66 (73,33%) foram polimórficos.

Os resultados de variabilidade genética estimados pelo índice de diversidade genética de Shannon (IS) e pela porcentagem de fragmentos polimórficos (%FP) mostraram uma diminuição da variabilidade genética na progênie (Figura 2).



**Figura 2.** Índice de diversidade genética de Shannon e porcentagem de fragmentos polimórficos obtidos para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyus*.

Os valores estimados de divergência genética (DG) mostraram igualmente que a variabilidade genética diminuiu na progênie ( $<0,001$ ). Essa significativa diminuição da divergência na progênie (0,077) mostra como em uma única geração, a variabilidade genética de progênies usadas em programas de repovoamento pode ser reduzida significativamente, como resultado de práticas reprodutivas inadequadas no manejo dos estoques de reprodutores (Figura 3).



**Figura 3.** Divergência genética obtida para os parentais e a progênie do acasalamento de *B. orbignyus*.

Os resultados de variabilidade e divergência genética encontrados neste estudo podem ser explicados pelo efeito do sistema seminatural e da proporção de sexo utilizada no acasalamento já que podem interferir no número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) que participaram na reprodução.

Segundo Moreira (2001) e Frost et al. (2006), o sistema de reprodução (formação de acasalamentos e relação de sexos) pode reduzir o número de animais em idade de reprodução que estão em capacidade de deixar uma descendência viável ( $N_e$ ). No presente estudo, a utilização do sistema reprodutivo seminatural permitiu a obtenção de uma baixa mortalidade dos reprodutores utilizados no acasalamento (100% de sobrevivência) e todos eles apresentaram desova/espermição, demonstrando a efetividade desse sistema na preservação dos reprodutores (Povh, 2007). Ao ser utilizado um *pool* de sexos (10♂/5♀), a oportunidade de acasalamento de todos os machos nesse sistema pode ter sido menor devido a existência de competição reprodutiva (Andersson, 2005), onde os machos mais fortes (Barbosa & Magurran, 2006) e menos sensíveis ao estresse (Povh, 2007) alcançaram possivelmente maiores porcentagens de fertilização dos ovócitos.

A proporção desigual de sexos utilizada no sistema seminatural, então, pode gerar uma diminuição da diversidade genética na progênie, com um conseqüente aumento do coeficiente de endogamia e diminuição do  $N_e$ . Esta situação poderia levar a baixas porcentagens de eclosão e a uma baixa porcentagem de sobrevivência dos indivíduos nos diferentes estádios de desenvolvimento (Sønstebø et al., 2007). Nos resultados encontrados para *B. orbignyianus*, pode-se observar esta tendência com uma perda da variabilidade genética na progênie e uma acentuada diminuição da sua divergência genética (Figura 2 e 3). Esta condição segundo Coward et al. (2002) e Moran (2002) é melhorada com a participação equilibrada de sexos, produzindo uma fertilização mais uniforme e mais eficiente dos ovócitos, o que conseqüentemente aumentaria o  $N_e$  (Sekino et al., 2003). Povh (2007) comparando o sistema de reprodução seminatural e por extrusão em um estoque de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), encontrou um aumento da variabilidade genética quando utilizado o sistema seminatural (IS = 0,365 e %FP = 60,5%), utilizando um acasalamento em proporções iguais de sexo. Este procedimento será importante para obter uma alta variação e contribuição reprodutiva entre os indivíduos e suas progênies (Qin et al., 2007).

Muitas pisciculturas durante a formação do acasalamento utilizam uma quantidade maior de machos ou sêmen de mais de um macho na fertilização dos ovócitos das fêmeas. Este procedimento é bastante utilizado com a finalidade de compensar a baixa qualidade e quantidade do sêmen que alguns dos machos oferecem após a indução hormonal, resultado possivelmente atribuído às condições de estresse que os animais passam durante o processo reprodutivo. A partir dos resultados de diversidade genética dos reprodutores e da progênie de *B. orbignyanus*, pode-se sugerir que o sistema de acasalamento em proporções desiguais de sexo não é o mais indicado para a reprodução desta espécie, já que pode diminuir a variabilidade genética na progênie apesar do efeito positivo do sistema seminatural na diminuição da mortalidade e no aumento da taxa de desova/espermiação dos reprodutores de *B. orbignyanus*.

Desta forma, quando utilizado o sistema seminatural, pode-se recomendar a utilização de acasalamentos com uma proporção igual de sexos, já que diminuem a mortalidade dos reprodutores durante o processo reprodutivo e permitem a manutenção da variabilidade genética. Estes resultados concordam com Povh (2007) o qual concluiu que quando o objetivo da alevinocultura é a produção de juvenis para programas de repovoamento, deve-se preconizar o sistema reprodutivo seminatural.

A utilização de um grande número de reprodutores normalmente é inviabilizada devido a falta de infra-estrutura nas pisciculturas que permitam o manejo de um grande número de reprodutores e das progênies obtidas durante a reprodução. Porém, pode-se sugerir que durante a formação de acasalamentos destinados para produção, formação de novos estoques ou programas de repovoamento do *B. orbignyanus* é necessário utilizar a maior quantidade de reprodutores possível (como mínimo 15♂ e 15♀) durante todo o período reprodutivo. Esta recomendação concorda com os resultados encontrados por Yokota et al. (2003), os quais constataram que o aumento do  $N_e$  de 20 (10♂ e 10♀) para 50 (25♂ e 25♀) proporcionou uma maior variabilidade genética na progênie.

Os resultados observados neste estudo são de grande importância, já que a partir deles o manejo reprodutivo dos estoques de *B. orbignyanus* utilizados em programas de repovoamento pode ser orientado corretamente e com maior objetividade. A diminuição da variabilidade genética pode tornar um programa de repovoamento ineficiente (baixa sobrevivência de juvenis no ambiente aquático) e proporcionar impactos genéticos irreversíveis nas populações naturais (Sønstebø et al., 2007; Povh et al., 2008) que podem levar a extinção das espécies.

As espécies de importância comercial e especialmente aquelas ameaçadas de extinção, como é o caso da analisada neste estudo, requerem um constante monitoramento dos seus estoques, das suas progênes e das suas populações naturais. Nesse contexto, o marcador RAPD permitiu determinar com sucesso a variabilidade genética presente nos reprodutores e nas progênes após o acasalamento utilizando o sistema seminatural. Pelo caráter dominante do marcador não foi possível determinar quantos reprodutores realmente contribuíram com a formação da progênie nos dois sistemas de acasalamento. Contudo, a falta de mortalidade e a alta porcentagem de desova observados nos reprodutores podem fundamentar que possivelmente todos os machos ou a maioria deles participaram na reprodução durante o acasalamento.

### **Conclusões**

1. Nos resultados encontrados neste estudo evidenciou como a utilização de acasalamentos formados a partir de um número desigual de reprodutores de *B. orbignyana* utilizando o sistema seminatural, provocou a perda da variabilidade genética durante a reprodução, o que em progênes destinadas para programas de repovoamento pode significar uma diminuição da adaptabilidade e sobrevivência ao ambiente.

### **Agradecimentos**

À empresa de geração de energia hidroelétrica Duke Energy Internacional por fornecer as amostras de *B. orbignyana* e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo.

### **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.; THOMAZ, S.M.; GOMES L.C. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. **Conservation Biology**, v.19, p.646-652, 2005.
- AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, v.253, p.244-248, 2006.
- ANDERSSON, M. Evolution of Classical Polyandry: Three Steps to Female Emancipation. **Ethology**, v.111, p.1-23, 2005.
- BARBOSA, M.; MAGURRAN, A.E. Female mating decisions: maximizing fitness? **Journal of Fish Biology**, v.68, p.636-1661, 2006.
- BORBA, M.R.; FRACALOSSO, D.M.; PEZZATO, L.E. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. **Aquaculture Nutrition**, v.12, p.183-191, 2006.
- COWARD, K.; BROMAGE, N.R.; HIBBITT, O.; PARRINGTON, J. Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. **Reviews of Fish Biology and Fisheries**, v.12, p.33-58, 2002.
- 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.
- GANECO, L.; NAKAGHI, L.; URBINATI, E.; DUMONT-NETO, R.; VASQUES, L.H. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante o ciclo reprodutivo. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.27, p.131-138, 2001.
- GOMES, P.C. Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. 2007. 31p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- 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. **Genética**, 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**. Embrapa Pantanal, Corumbá, 2006. 88p.

- HORI, T.S.F.; AVILEZ, I.M.; INOUE, L.K.; MORAES, G. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.143, p.67-72, 2006.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; VARGAS, L.; MANGOLIN, C.A. Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyianus* utilizados em programas de repoblamiento: manejo y conservación. **Acta Biológica Colombiana**, (prelo), 2008a.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T.S. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, 2008b.
- MACHADO, A.B.M.; MARTINS, C.S.; DRUMMOND, G.M. **Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2005. 220p.
- MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUZA, A.B.; COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.87-93, 2006.
- MILLER, M. Mantel-Struct: a program for the detection of population structure via mantel tests. **Journal Heredity**, v.90, p.258-259, 1999.
- MORAN, P. Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods. **Ecology of Freshwater Fish**, v.11, p.30-55, 2002.
- MOREIRA, H.L.M. Genética e Melhoramento de Peixes. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. (Ed.). **Fundamentos da moderna aqüicultura**. Canoas, ULBRA, 2001. p.135-147.
- PINEDA-SANTIS, H.R. Estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.17, p.62-63, 2004.
- POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; LUPCHINSKI JR., E.; GOMES, P.C.; LOPES, T DA S. Conservación de la diversidad genética de peces a través del monitoramiento por marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, (prelo), 2008.

- POVH, J.A. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2007. 75p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- QIN, Y. ; LIU, X.; ZHANG, H. ; ZHANG, G. Effect of parental stock size on F1 genetic structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). **Aquaculture Research**, v.38, p.174-181, 2007.
- SEKINO, M.; SAITOH, K.; YAMADA, T.; KUMAGAI, A.; HARA, M.; YAMASHITA, Y. 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.
- SØNSTEBØ, J.H.; BORGSTRØM, R.; HEUN, M. 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**, v.8, p.33-44, 2007.
- YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. Alberta, University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999. 29p.
- 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.; SCHULZ, UH. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Eds.). **Migratory Fishes of South America**. Biology, Fisheries and Conservation Status, World Fisheries Trust, Victoria, 2003. p.253-271.
- ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, D.; WEINGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**, v.19, p.233-240, 2006.



**V. DIVERSIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DE  
UMA PROGÊNIE DE *Brycon orbignyanus* UTILIZADA EM  
PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO NO SISTEMA  
REPRODUTIVO SEMINATURAL**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: Aquaculture**

**“Genetic diversity and parental contribution of a *Brycon orbignyanus*  
offspring used in stock enhancement programs in the semi-natural  
reproductive system”**

**Diversidade genética e contribuição parental de uma progênie de *Brycon orbignyana* utilizada em programas de repovoamento no sistema reprodutivo seminatural**

**Resumo**

A conservação da variabilidade genética é prioritária em estoques de peixes utilizados em programas de repovoamento dos rios, especialmente para espécies ameaçadas de extinção como o *Brycon orbignyana*. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi estimar a diversidade genética e a contribuição parental de uma progênie de *B. orbignyana* utilizada em programas de repovoamento, no sistema reprodutivo seminatural, com o emprego do marcador molecular microssatélite. Parentais e progênie tiveram um número similar de dois alelos em quatro dos sete locos avaliados e uma heterozigose média de 0,470 e 0,510, respectivamente. Houve manutenção da diversidade genética na progênie e foi verificada a ocorrência de paternidade múltipla e dominância reprodutiva mediante a utilização do sistema reprodutivo seminatural e o acasalamento em proporções iguais de sexo.

*Palavras-Chave:* Conservação; Manejo reprodutivo; Microssatélite; Paternidade; Peixe; Programas de repovoamento

**Genetic diversity and parental contribution of a *Brycon orbignyana* offspring used in stock enhancement programs in the semi-natural reproductive system**

**Abstract**

The conservation of the genetic variability is a priority in fish stocks used in stock enhancement programs of rivers, especially for species threatened of extinction as the *Brycon orbignyana*. In this context, the purpose of this study was to evaluate the genetic diversity and the parental contribution of *B. orbignyana* offspring used in stock enhancement programs, in the semi-natural reproductive system, with the use of the microsatellite molecular marker. Parental and offspring had the similar number of two alleles in four of the seven evaluated primers and a heterozygosity average of 0.470 and

0.510, respectively. It was verified the occurrence of multiple paternity, reproductive dominance and the maintenance of the genetic diversity in offspring by the use of the semi-natural reproduction system and the mating in similar sex proportion.

*Keywords:* Conservation; Fish; Microsatellite; Paternity; Reproductive management; Stock enhancement programs

## 1. Introdução

O desmatamento ao longo das margens dos rios, redução das fontes de alimento, construção de barragens e drenagens para aproveitamento agrícola (Hatanaka et al., 2006), degradação da qualidade da água em função da poluição (Hori et al., 2006), ecoturismo mal planejado (Sabino e Andrade, 2003) e a falta de conhecimento taxonômico (Agostinho et al., 2005) têm levado ao desaparecimento de várias espécies de peixes nos últimos anos.

*B. orbignyanus* (Valenciennes, 1849), conhecido regionalmente no Brasil como piracanjuba ou bracanjuba (Ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Bryconinae), é uma espécie migratória nativa das bacias formadas pelos rios Uruguai (Zaniboni-Filho e Schulz, 2003) e Paraná (Ganeco et al., 2001). É um peixe apreciado devido a sua notável condição de adaptabilidade ao manejo em ambientes controlados (Borba et al., 2006). Porém, em resposta as modificações ambientais geradas por mudanças climáticas e principalmente por ações humanas, nos últimos anos populações naturais desse peixe têm desaparecido (Zaniboni-Filho et al., 2006), sendo catalogada como espécie em risco de extinção (Machado, 2005; Lopera-Barrero et al., 2006).

Das ações empregadas para reduzir esses impactos sobre os estoques de peixes, o repovoamento vem se tornando cada vez mais comum (Hilsdorf et al., 2006; Agostinho e Gomes, 2006). Os programas de repovoamento têm destaque por serem estratégias de conservação viáveis para a maioria dos piscicultores (Sirol e Britto, 2006), porém, essa prática existente há mais de três décadas no Brasil, tem sido realizada, em geral, sem respaldo científico (Agostinho et al., 2005). Por isso, é necessário o apoio de ferramentas como a genética, a ecologia, a reprodução e a participação de outras áreas que permitam determinar objetivamente quais sistemas reprodutivos, técnicas e estratégias devem ser adotadas ou recomendadas.

O monitoramento genético de estoques de pisciculturas representa informações de grande importância para conseguir ganhos expressivos na produção e na conservação de peixes (Feng et al., 2007), já que a perda da variabilidade genética desses estoques pelo inadequado manejo genético (Frost et al., 2006) e reprodutivo (Porta et al., 2006) pode produzir problemas de endogamia, adaptabilidade e sobrevivência de progênies utilizadas em programas de repovoamento (Povh et al., 2008). Esses problemas podem conseqüentemente afetar as populações naturais de peixes (Sønstebø et al., 2007) e o ecossistema em geral, podendo levar uma espécie a extinção (Oliveira et al., 2002). Para este monitoramento, o marcador molecular microssatélite tem se mostrado efetivo e é usado com sucesso (Machado-Schiaffino et al., 2007).

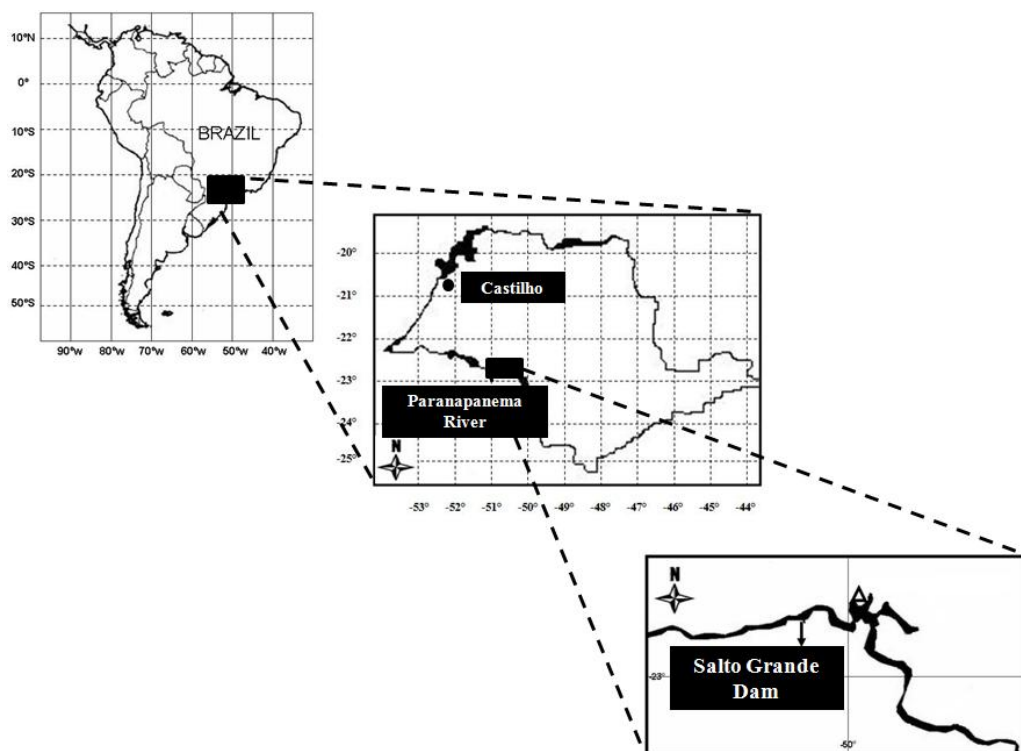
Em adição a análises genéticas, a melhora do manejo reprodutivo também deve ser realizada, já que um manejo inadequado resultado de práticas reprodutivas com um número insuficiente de reprodutores (Melo et al., 2006) pode trazer problemas ao promover perda da variabilidade genética (Aho et al., 2006).

O objetivo deste estudo foi estimar a diversidade genética e a contribuição parental de uma progênie de *B. orbignyanus* utilizada em programas de repovoamento do rio Paranapanema, no sistema reprodutivo seminatural, com o emprego do marcador molecular microssatélite.

## **2. Material e Métodos**

### *2.1. Material biológico*

Foram utilizados 24 reprodutores (12♂ e 12♀) de *B. orbignyanus* selecionados de um estoque de 136 indivíduos, estocados há seis anos nas instalações da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema), localizada na cidade de Salto Grande – SP, Brasil. Esses indivíduos são originários da primeira geração de um estoque pertencente a uma piscicultura localizada na cidade de Castilho, SP (Figura 1).



**Fig. 1.** Localização da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da *Duke Energy International* (Geração Paranapanema) e da cidade de Castilho, no Estado de São Paulo, Sudeste do Brasil.

## 2.2. Formação do acasalamento e reprodução

O experimento foi realizado em novembro de 2006 nas instalações da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da *Duke Energy International* (Geração Paranapanema). Os peixes foram conduzidos para o laboratório e induzidos a reprodução com extrato de hipófise de carpa. As fêmeas receberam  $5,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira aplicação e 12 horas depois os 90% restantes. Os machos receberam  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  em dose única. De todos os indivíduos foram coletadas amostras de nadadeira caudal ( $0,5 \text{ cm}^2$  aproximadamente), armazenadas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 100% para a posterior extração e amplificação do DNA.

Após a indução hormonal, os reprodutores foram colocados em um tanque circular com um raio de 5,1 m e 1,85 m de profundidade média e abastecido por um fluxo de água contínuo ( $131 \text{ l.s}^{-1}$ ) em dois sentidos de vazão. O escoamento da água na porção central mediante um cano de 6" permitiu o direcionamento dos ovos para uma estação

coletora, onde os ovos ficaram vertidos numa incubadora cilindro-cônica de captação de 200 litros com fluxo contínuo de água ( $7 \text{ l.s}^{-1}$ ). A função desta incubadora de captação foi reter os ovos obtidos na reprodução para em seguida estes serem levados a incubadoras individuais do tipo cilindro cônicas.

Aproximadamente seis horas depois da última indução (160 horas-grau,  $27^{\circ}\text{C}$ ) foi dado início a coleta de ovos. Estabeleceu-se um período de coleta de no máximo seis horas, com a retirada dos ovos a cada hora da incubadora de captação sendo em seguida, conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônicas onde ocorreu a incubação dos ovos.

A porcentagem de mortalidade dos reprodutores (fêmea/macho) usados no acasalamento foi definida um dia depois da reprodução. Três dias depois da eclosão dos ovos, aproximadamente 200 larvas foram coletadas de forma aleatória de todas as incubadoras, sendo armazenadas em microtubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 100%. Dessas larvas, 95 foram coletadas aleatoriamente para posterior extração e amplificação do DNA.

### *2.3. Extração de DNA*

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008). Em microtubos contendo as larvas e as nadadeiras, foram adicionados 550  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl e 1% SDS) e 7  $\mu\text{L}$  de proteinase K (200  $\mu\text{g/mL}$ ). As amostras foram incubadas em banho-maria a  $50^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. O DNA foi precipitado com 600  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos, precipitado com 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico absoluto e incubado por uma hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . O DNA foi centrifugado, lavado com 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 70%, ressuspendido em tampão TE - 10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA –(80  $\mu\text{L}$  para nadadeira e 35  $\mu\text{L}$  para larva), e tratado com 7  $\mu\text{L}$  de RNase (30  $\mu\text{g/mL}$ ) em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  por uma hora, e em seguida estocado no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4. Quantificação e Amplificação do DNA

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260 nm. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng/μl (reprodutores) e 5 ng/μl (larvas). Para conferir a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA) por uma hora a 70 volts.

O gel foi visualizado sob radiação UV, depois da sua exposição com brometo de etídio (0,5 μg/ml) por uma hora. Posteriormente, a imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

O DNA foi amplificado em um volume final de reação de 15 μL. Utilizou-se 1X do tampão 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 as nadadeiras.

Foram amplificados sete locos descritos para Barroso et al. (2003) para *Brycon opalinus* (No. Acesso GeneBank AF513621-BoM1, AF513622-BoM2, AF513623-BoM5, AF513624-BoM6, AF513626-BoM7, AF513627-BoM12 e AF513628-BoM13). As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida foram realizados 30 ciclos, cada um consistindo de um minuto de desnaturação a 94°C; um minuto de anelamento (48°C, 58°C, 52°C, 57°C, 52°C, 48°C, 50°C para cada loco respectivamente) e um minuto de extensão a 72°C. Após realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida - 29:1) desnaturante (6 M de uréia), e conduzida em tampão TBE 1X (90 mM de Tris-Borato e 2 mM de EDTA) com 300 volts por quatro horas.

Para a visualização dos alelos microssatélites, utilizou-se a coloração com nitrato de prata pelo método descrito por Bassam et al. (1991) modificado. O gel foi submetido a uma solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético) por 20 minutos; em seguida foi corado (6 mM de nitrato de prata) por 10 minutos; e posteriormente revelado (0,75 M de NaOH e 0,22% de formol-40%). Após a visualização das bandas, os géis foram fotografados com câmera digital da Nikon (E5200).

### 2.5. Análise dos dados

O número e frequência dos alelos, a heterozigose observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), o equilíbrio de Hardy-Weinberg, a deficiência ou excesso de heterozigotos e o coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) foram estimados usando o programa GENEPOP 3.3 (Raymond e Rousset, 1995). A determinação da paternidade da progênie foi realizada através do programa PAPA versão 2,0 (Duchesne et al., 2002).

### 3. Resultados

Os locos BoM6 e BoM12 não apresentaram uma amplificação nítida e mostraram pouca especificidade. Por esta razão não foram utilizados nas análises. Cinco loci produziram um total de nove alelos (dois alelos para os locos BoM1, BoM2, BoM7 e BoM13 e um alelo para o loco BoM5) com tamanhos entre 140 pb e 200 pb, observados tanto nos parentais como na progênie. O número de alelos, o tamanho em pares de bases e a frequência dos alelos para os diferentes locos de microsatélites são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1**

Número, tamanho em pares de bases (pb) e frequência dos alelos para os parentais e para a progênie de *B. orbignyana*, no sistema reprodutivo seminatural

Locos	No. Alelos/loco	Tamanho (pb)	Frequência dos alelos	
			Parentais	Progênie
BoM1	2	150-169	150 (0,158) - 169 (0,842)	150 (0,165) - 169 (0,835)
BoM2	2	170-200	170 (0,583) - 200 (0,417)	170 (0,516) - 200 (0,484)
BoM5	1	140	---	---
BoM7	2	192-198	192 (0,350) - 198 (0,650)	192 (0,240) - 198 (0,760)
BoM13	2	165-172	0,500	165 (0,477) - 172 (0,523)

Não foram encontrados desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg nos parentais e na progênie. Os valores estimados da heterozigosidade observada ( $H_o$ ) nos parentais não indicaram ocorrência de endogamia e tiveram excesso de heterozigotos para os locos BoM1, BoM7 e BoM13. O loco BoM2 apresentou deficiência de heterozigotos. Da



mesma forma, os resultados de  $F_{is}$  mostraram perda de heterozigose no loco BoM2 (0,452) (Tabela 2).

### Tabela 2

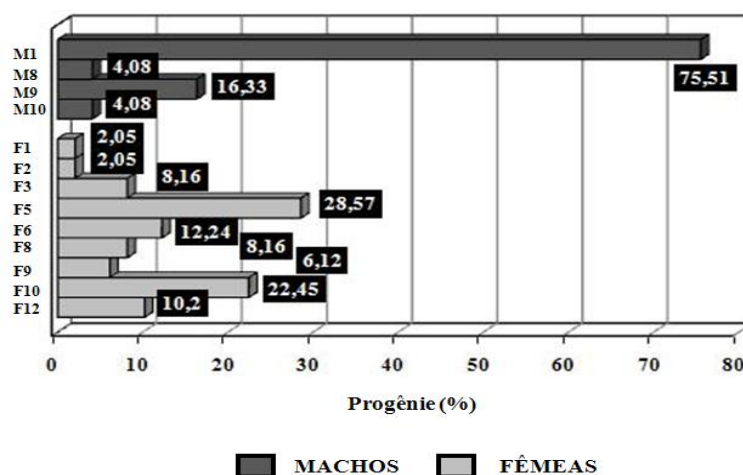
Heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) e teste de probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P_{WH}$ ) estimados nos parentais e na progênie de *B. orbignyanus*, no sistema reprodutivo seminatural

Parâmetros	Parentais				Médias
	Loci				
	BoM1	BoM2	BoM7	BoM13	
$H_o$	0,316	0,278	0,700	0,583	0,470
$H_e$	0,273	0,500	0,467	0,511	0,438
$F_{is}^*$	-0,161	0,452	-0,520	-0,146	-0,116
$P_{WH}$	1,000 <sup>NS</sup>	0,137 <sup>NS</sup>	0,062 <sup>NS</sup>	0,681 <sup>NS</sup>	---
	Progênie				
	BoM1	BoM2	BoM7	BoM13	
$H_o$	0,330	0,645	0,456	0,609	0,510
$H_e$	0,277	0,502	0,368	0,502	0,412
$F_{is}^*$	-0,192	-0,308	-0,254	-0,214	-0,242
$P_{WH}$	0,467 <sup>NS</sup>	0,667 <sup>NS</sup>	0,5313 <sup>NS</sup>	0,0522 <sup>NS</sup>	---

\*Valor Negativo = perda de homozigose (Weir e Cockerham, 1984); NS = Não significativo

Na progênie, os valores de heterozigosidade e o  $F_{is}$  mostraram que houve excesso de heterozigotos, indicando a não ocorrência de endogamia. A progênie obtida pelo sistema reprodutivo seminatural apresentou uma heterozigose média maior do que a encontrada nos parentais (0,510 e 0,470) demonstrando que a variabilidade genética foi preservada (Tabela 2).

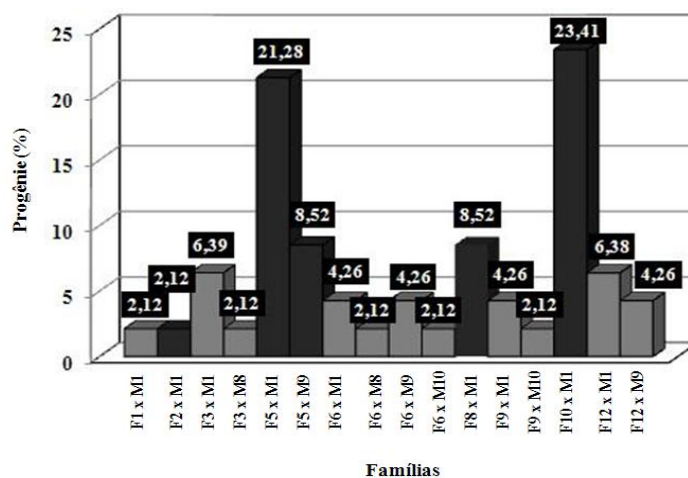
Foi determinada só 50% da paternidade (47 larvas da progênie). Quatro machos (M1, M8, M9 e M10) e nove fêmeas (F1, F2, F3, F5, F6, F8, F9, F10 e F11) foram responsáveis pela progênie (Fig. 2).



**Fig. 2.** Contribuição parental da progênie de *B. orbignyana* no sistema reprodutivo seminatural.

O macho 1 (M1) e a fêmea 5 (F5) foram responsáveis pela maior contribuição na progênie (75,51% e 28,57%, respectivamente). Como consequência, o número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) foi reduzido de 24 para 11,08 (Fig. 2).

Todos os machos que contribuíram com a progênie fertilizaram mais de uma fêmea, caracterizando paternidade múltipla. O M1 foi quem fertilizou a maior quantidade de fêmeas (100%), seguido do macho M9 (33,33%) e dos machos M8 e M10 (22,22%). Os acasalamentos F5xM1 e F10xM1 foram os que tiveram maior contribuição na progênie (44,69%) (Fig. 3).



**Fig. 3.** Composição das famílias na progênie de *B. orbignyana* no sistema reprodutivo seminatural.

## 4. Discussão

### 4.1. Diversidade genética

Vários são os fatores que têm levado a redução e ao desaparecimento de populações de peixes. Para reduzir esse impacto vem se realizando programas de repovoamento dos rios. Porém, esta prática pode aumentar o impacto ambiental e em muitos casos seus resultados são ineficientes. Desta forma, o monitoramento da diversidade genética de estoques de peixes mantidos em pisciculturas é fundamental para a conservação das espécies (Povh et al., 2008) e da ictiofauna (Barroso et al., 2005), sendo necessário para que os indivíduos liberados durante os programas de repovoamento sejam capazes de se adaptarem e reproduzirem sem provocar mudanças nas populações naturais já existentes no ambiente (Sønstebø et al., 2007).

A presença dos mesmos alelos obtidos nos parentais e na progênie e sua frequência semelhante (Tabela 1) sugere que houve manutenção da heteroziguidade na progênie. Segundo Innes e Elliott (2006), o desequilíbrio nas frequências pode influenciar na deficiência de heterozigotos, podendo provocar perda de variabilidade genética.

Os valores médios de heteroziguidade ( $H_o$  e  $H_e$ ) determinados para os parentais e para a progênie de *B. orbignyanus* (0,470 e 0,510, respectivamente), demonstraram que houve uma manutenção da variabilidade genética na progênie mesmo não havendo contribuição de todos os parentais na progênie produzida, possivelmente devido a utilização do sistema reprodutivo seminatural e a utilização do acasalamento em proporção iguais de sexo.

O sistema reprodutivo seminatural, se realizado corretamente, tende a reduzir o direcionamento e a seleção não intencional no processo reprodutivo que acontece normalmente no sistema reprodutivo por extrusão e diminui significativamente a mortalidade causada pelo estresse (Povh, 2007), possibilitando que um maior número de reprodutores se reproduza durante os acasalamentos (Sirol e Britto, 2006) e que exista uma maior manutenção da variabilidade genética.

Frost et al. (2006), recomendaram equilibrar o número de fêmeas e machos usados durante a reprodução e manter o  $N_e$  tão alto quanto possível para assim obter uma alta variação e contribuição reprodutiva entre os indivíduos e suas progênies (Qin et al., 2007) e reduzir o aparecimento de endogamia. Essa recomendação foi confirmada

por Povh (2007), que ao comparar o sistema de desova seminatural e por extrusão em um estoque de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), encontrou um aumento da variabilidade genética no estoque manejado pelo sistema seminatural (Índice de Shannon = 0,365 e % Fragmentos Polimórficos = 60,5%), utilizando um sistema de acasalamento em proporções iguais de sexo. Este autor conclui que quando o objetivo da alevinocultura é a produção de juvenis para programas de repovoamento, deve-se preconizar o sistema reprodutivo seminatural, mas enfatiza que maiores análises são necessárias para a confirmação da eficiência desse sistema na preservação da variabilidade genética para outras espécies migradoras. Os resultados deste autor são condizentes com os resultados encontrados neste estudo para o *B. orbignyanus*.

A deficiência de heterozigotos, observado nos parentais para o loco BoM2 (Tabela 2), pode ser devido a endogamia, presença de alelos nulos, amostragem não aleatória ou ao efeito Wahlund (Hassanien e Gilbey, 2005). Porém, pelo  $F_{is}$  negativo encontrado nos outros locos e a falta de desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, é improvável que o efeito Wahlund seja uma possível causa. Da mesma forma, apesar da redução do número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) de 24 para 11,08, este valor foi suficiente para manter a heterozigose e conseqüentemente, a variabilidade genética na progênie.

É comum que na formação de casais de reprodutores utilizados em programas de repovoamento sejam utilizados peixes da mesma piscicultura e em pequeno número, o que pode favorecer o aparecimento de endogamia (*Blottleneck effect*) e conseqüentemente, reduzirem a variabilidade genética da progênie (Aho et al., 2006). O efeito do  $N_e$  sobre a variabilidade genética também foi observado por Yokota et al. (2003), os quais constataram que o aumento no  $N_e$  de 20 para 50 numa proporção igual de sexo aumentou a variabilidade genética na progênie.

Nos resultados encontrados no presente estudo, observou-se que mediante a utilização de um  $N_e$  de 24 no sistema reprodutivo seminatural e numa proporção igual de sexos, foi possível manter a variabilidade genética de uma progênie utilizada em programas de repovoamento. Estes resultados concordaram com as recomendações de Pante et al. (2001), onde a manutenção de um adequado número efetivo de reprodutores ( $N_e$ ) junto com a formação correta de acasalamentos e a utilização de sistemas reprodutivos apropriados pode controlar o aparecimento de endogamia nas futuras gerações.

#### 4.2. Contribuição parental

A baixa determinação de paternidade (50%) encontrada neste estudo está correlacionada ao baixo número de alelos encontrados nos locos usados (nove alelos sendo que um loco foi monomórfico) e a dificuldade na utilização de locos heterólogos (desenvolvidos para *Brycon opalinus*) que não permitiram a correta amplificação dos locos BoM6 e BoM12 para *B. orbignyanus*. Contudo, os alelos obtidos foram informativos e permitiram vislumbrar claramente a participação dos parentais na progênie utilizando o sistema reprodutivo seminatural. Estes resultados discordam com o estudo realizado por Barroso et al. (2003) onde foram observados 12 e 31 alelos entre 78 a 212 pb. Porém, resultados similares foram encontrados por Sanches e Galetti Jr (2006), os quais isolaram sete locos para *Brycon hilarii* com a presença de poucos alelos (três a oito) entre 138 a 220 pb.

Pela redução do direcionamento e a seleção não intencional no processo reprodutivo, o sistema seminatural utilizado no presente estudo permitiu a dominância de reprodutores durante o acasalamento. A dominância reprodutiva, também conhecida como “hipótese da qualidade intrínseca do macho” ou “hipótese do bom esperma” (Sivinski, 1984) pode influenciar na variabilidade genética quando utilizados sistemas reprodutivos seminaturais, já que a dominância de alguns machos (supostamente os mais fortes e com melhores características reprodutivas) na fertilização dos ovócitos pode influenciar na variabilidade genética dos indivíduos da progênie (Nordeide, 2007). Este fenômeno, que já foi observado em pesquisas de peixes exóticos (Sekino et al., 2004; Ortega-Villaízan Romo et al., 2006; Porta et al., 2006) e nativos brasileiros (Povh, 2007), também foi observado no presente estudo para *B. orbignyanus*.

A múltipla paternidade demonstrada revelou a participação de apenas quatro dos 12 reprodutores na obtenção de 50% da progênie, onde um dos machos (M1) chegou fertilizar nove fêmeas, sendo responsável por 75,51% da progênie (Fig. 2). Resultados similares foram encontrados por Porta et al. (2006) para *Solea senegalensis*, onde dois machos de um total de 11 foram responsáveis em maior porcentagem pela progênie. Da mesma forma, Sekino et al. (2003) relataram que 99% da progênie foi originada pela participação reprodutiva de um macho, o que provocou uma diminuição da variabilidade genética.

Apesar da participação de apenas quatro machos, a variabilidade genética foi mantida na progênie de *B. orbignyanus*, o que mostra a efetividade da utilização do sistema seminatural em proporções iguais de sexo durante o acasalamento. Esta tendência foi verificada também por Povh (2007) em espécies migradoras nativas, onde em acasalamentos de *P. mesopotamicus* só dois reprodutores foram responsáveis por 43,3% da progênie e houve manutenção da variabilidade genética.

A composição das famílias foi influenciada diretamente pela maior participação do M1, sendo que os acasalamentos F5xM1 e F10xM1 foram os que tiveram maior contribuição na progênie (44,69%) (Fig. 3). Este fato não afetou a variabilidade genética da progênie, porém, a baixa determinação parental mediante a utilização de poucos locos, pode ter afetado a acurácia dessa contribuição na progênie.

A utilização de um grande número de parentais durante a reprodução, normalmente é inviabilizada devido a falta de infra-estrutura nas pisciculturas que permitam o manejo de um grande número de reprodutores e das progênies obtidas durante a reprodução. Porém, pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que durante a formação de acasalamentos destinados para produção, formação de novos estoques ou programas de repovoamento do *B. orbignyanus* é necessário utilizar a maior quantidade de reprodutores possível (como mínimo 15♂ e 15♀) durante todo o período reprodutivo, e assim preservar a diversidade genética das próximas gerações.

Esta recomendação concorda com os resultados encontrados por Oota e Matsuishi (2005) os quais utilizando um modelo baseado no histórico individual de vida, encontraram que ao acasalar 10 machos e 90 fêmeas, o coeficiente de endogamia aumentou cinco vezes mais na 50ª geração do que quando utilizada uma proporção de sexos 50:50. Estes autores igualmente concluem que quando a proporção de fêmeas utilizada no acasalamento é de 10% a 30% o coeficiente de endogamia aumenta, diferentemente quando utilizada uma proporção de 40% a 50%, onde esse coeficiente tem um pequeno efeito.

## 5. Conclusão

O sistema reprodutivo seminatural e o acasalamento em proporções iguais de sexo foram efetivos na conservação da variabilidade genética de uma progênie usada em

programas de repovoamento. Foi encontrada paternidade múltipla e uma contribuição parental diferenciada na composição das famílias na progênie.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a empresa de geração de energia hidroelétrica Duke Energy Internacional e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 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., Jorcin, A. (Eds.), *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. RiMA, São Carlos, pp. 23-55.
- Agostinho, A.A., Thomaz, S.M., Gomes, L.C., 2005. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conserv. Biol.* 19, 646-652.
- Aho, T., Rönn, J., Piironen, J., Björklund, M., 2006. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. *Aquaculture* 253, 244-248.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Mello, A.M., Guimarães, S.E.F., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2003. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia). *Mol. Ecol. Notes* 3, 297-298.
- Barroso, R.M., Hilsdorf, A.W.S., Moreira, H.L.M., Cabello, P.H., Traub-Cseko, Y.M., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia) using microsatellites. *Aquaculture* 247, 51-65.
- Bassam, B.J., Caetano-Anollés, G., Gresshoff, P.M., 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* 196, 80-83.
- Borba, M.R., Fracalossi, D.M., Pezzato, L.E., 2006. Dietary energy requirement of piracanjuba fingerlings, *Brycon orbignyanus*, and relative utilization of dietary carbohydrate and lipid. *Aquac. Nut.* 12, 183-191.

- Duchesne, P., Godbout, M.H., Bernatchez, L., 2002. PAPA (Package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Mol. Ecol. Notes* 2, 191-193.
- Feng, Y., Peijun, Z., Keling, W., Jianhai, X., 2007. Genetic variation of natural and cultured stocks of *Paralichthys olivaceus* by allozyme and RAPD. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* 25, 78-84.
- Frost, L.A., Evans, B.S., Jerry, D.R., 2006. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261, 1056-1064.
- Ganeco, L., Nakaghi, L., Urbinati, E., Dumont-Neto, R., Vasques, L.H., 2001. Análise morfológica do desenvolvimento ovocitário de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) durante o ciclo reprodutivo. *B. Inst. Pesca* 27, 131-138.
- Hassanien, H.A., Gilbey, J., 2005. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquac. Res.* 36, 1450-1457.
- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., 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.
- Hilsdorf, A.W.S., Resende, E.K., Marques, D.K.S., 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Embrapa Pantanal, Corumbá, 44 pp.
- Hori, T.S.F., Avilez, I.M., Inoue, L.K., Moraes, G., 2006. Metabolical changes induced by chronic phenol exposure in matrinxã *Brycon cephalus* (teleostei: characidae) juveniles. *Comp. Biochem. Physiol.* 143, 67-72.
- Innes, B.H., Elliott, N.G., 2006. Genetic diversity in a Tasmanian hatchery population of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) compared with its Canadian progenitor population. *Aquac. Res.* 37, 563-569.
- Lopera-Barrero, N.M., Povh, J.A., Ribeiro, R.P., Gomes, P.C., Jacometo, C.B., Lopes, T.S., 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN com muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). *Cien. Inv. Agr.* 35, (prelo).
- Lopera-Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Sirol, R.N., Povh, J.A., Gomes, P.C., Vargas, L., Streit Jr., D.P., 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polimorphic DNA) markers. *J. Anim. Sci.* 84, 170-170.



- Machado, A.B.M., 2005. Lista da fauna brasileira ameaçada de extinção: incluindo as espécies quase ameaçadas e deficientes em dados. In: Machado, A.B.M., Martins, C.S., Drummond, G.M., (Eds.), Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, pp. 160.
- Machado-Schiaffino, G., Dopico, E., Garcia-Vazquez, E., 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture* 264, 59-65.
- Melo, D.C., Oliveira, D.A.A., Ribeiro, L.P., Teixeira, C.S., Souza, A.B., Coelho, E.G.A., Crepaldi, D.V., Teixeira, E.A., 2006. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58, 87-93.
- Nordeide, J.T., 2007. Is there more in 'gamete quality' than quality of the gametes? A review of effects of female mate choice and genetic compatibility on offspring quality. *Aquac. Res.* 38, 1-16.
- Oliveira, A.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., Pavanelli, C.S., Júlio Jr, H.F., Panarari, R.S., 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica* 115, 259-267.
- Oota, T., Matsuishi, T., 2005. Increase of inbreeding by stocking on wild population assessed by using individual-based life history model. *Fish. Sci.* 71, 73-78.
- Ortega-Villaizán Romo, M.M., Aritaki, M., Taniguchi, N., 2006. Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fish. Sci.* 72, 48-52.
- Pante, M., Gjerde, B., McMillan, I., 2001. Inbreeding levels in selected populations in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture* 192, 213-224.
- Porta, J., Porta, J.M., Martínez-Rodríguez, G., Alvarez, M.C., 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251, 46-55.
- Povh, J.A., 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Estadual de Maringá, 75p.
- Povh, J.A., Lopera Barrero, N.M., Ribeiro, R.P., Lupchinski Jr, E., Gomes, P.C., Lopes, T.S., 2008. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Cien. Inv. Agr. (prelo)*.

- Qin, Y., Liu, X., Zhang, H., Zhang, G., 2007. Effect of parental stock size on F1 genetic structure in the bay scallop, *Argopecten irradians* (Lamarck, 1819). *Aquac. Res.* 38, 174-181.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *J. Heredity* 86, 248-249.
- Sabino, J., Andrade, L.P., 2003. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo na região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no rio Baía Bonita (Aquário natural de Bonito). *Biota Neotrop.* 3, 1-9.
- Sanches, A., Galetti Jr, P.M., 2006. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Mol. Ecol. Notes* 1, 1-2.
- Sekino, M., Saitoh, K., Yamada, T., Kumagai, A., Hara, M., 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., 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., Britto, S.G., 2006. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira M.G., Henry, R., Jorcin, A. (Eds.), *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. RiMA, São Carlos, pp. 275-284.
- Sivinski, J., 1984. Sperm in competition. In: *Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems*. Smith, R.L. (Ed.). Academic Press, London, pp.86-115.
- Sønstebo, J.H., Borgstrøm, R., 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.
- Yokota, M., Harada, Y., Izuka, M. 2003. Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. *Fish. Sci.* 69, 101-109.
- Zaniboni-Filho, E., Reynalte-Tataje, D., Weingartner, M., 2006. Potencialidad del género *Brycon* en la piscicultura brasileña. *Rev. Col. Cienc. Pec.* 19, 233-240.
- Zaniboni-Filho E., Schulz UH., 2003. Migratory Fishes of the Uruguay River. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust, Victoria, pp. 253-271.

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização de acasalamentos formados a partir de uma proporção igual de sexo de reprodutores de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural, pode diminuir a possibilidade de perda da variabilidade genética durante a reprodução, o que em progênes destinadas para programas de repovoamento pode significar um aumento da adaptabilidade e sobrevivência ao ambiente. Por outro lado, o acasalamento formado a partir de um número desigual de reprodutores de *B. orbignyanus* utilizando o sistema seminatural, provocou a perda da variabilidade genética da progênie durante a reprodução.

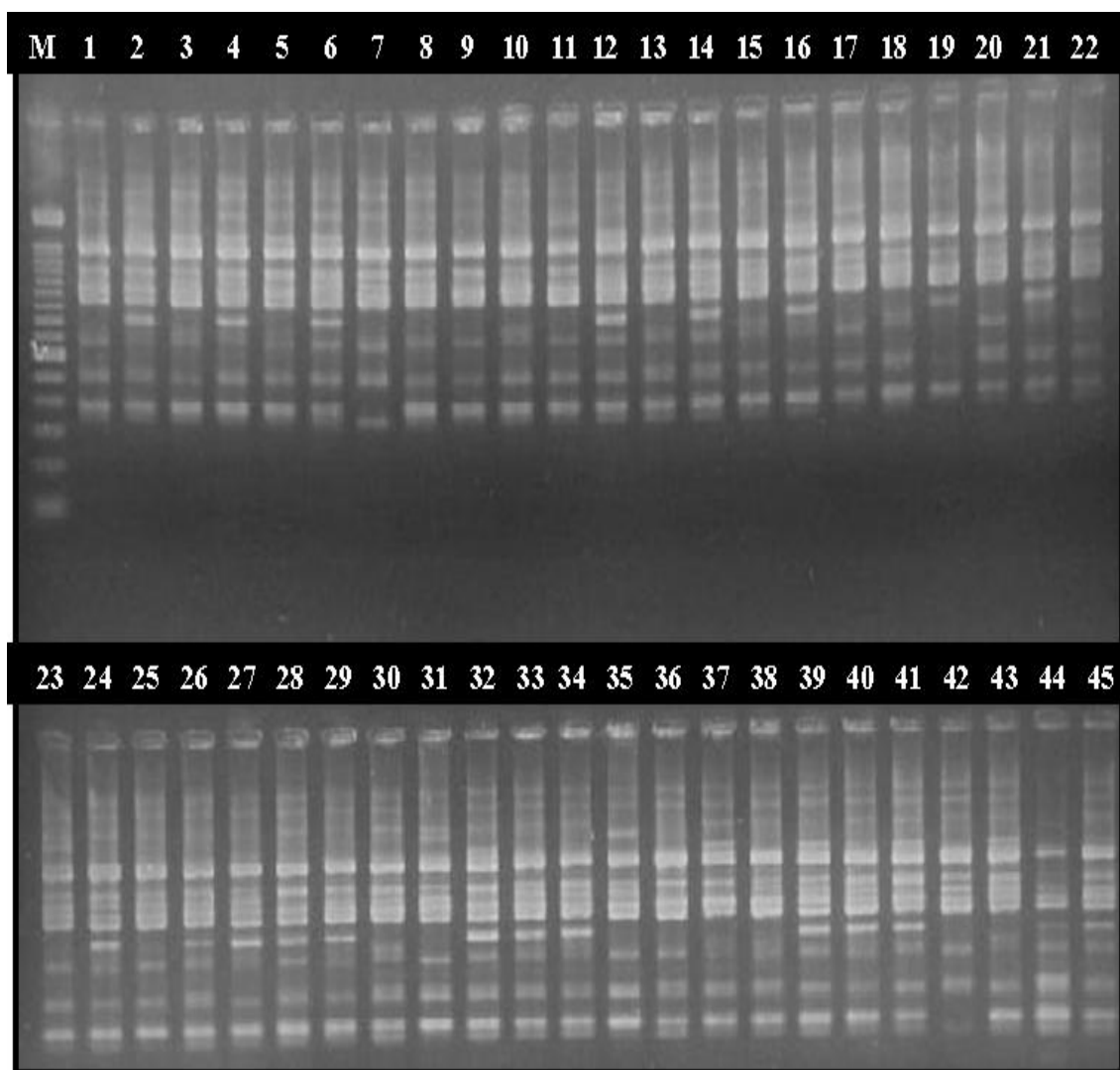
Foi encontrada paternidade múltipla e uma contribuição parental diferenciada na composição das famílias na progênie ao utilizar uma proporção igual de sexo de reprodutores de *Brycon orbignyanus* no sistema seminatural.

Pelos resultados obtidos neste estudo, pode-se sugerir que durante a formação de acasalamentos destinados para produção, formação de novos estoques ou programas de repovoamento do *B. orbignyanus* é necessário utilizar a maior quantidade de reprodutores possível (como mínimo 15♂ e 15♀) durante todo o período reprodutivo, e assim preservar a diversidade genética das próximas gerações

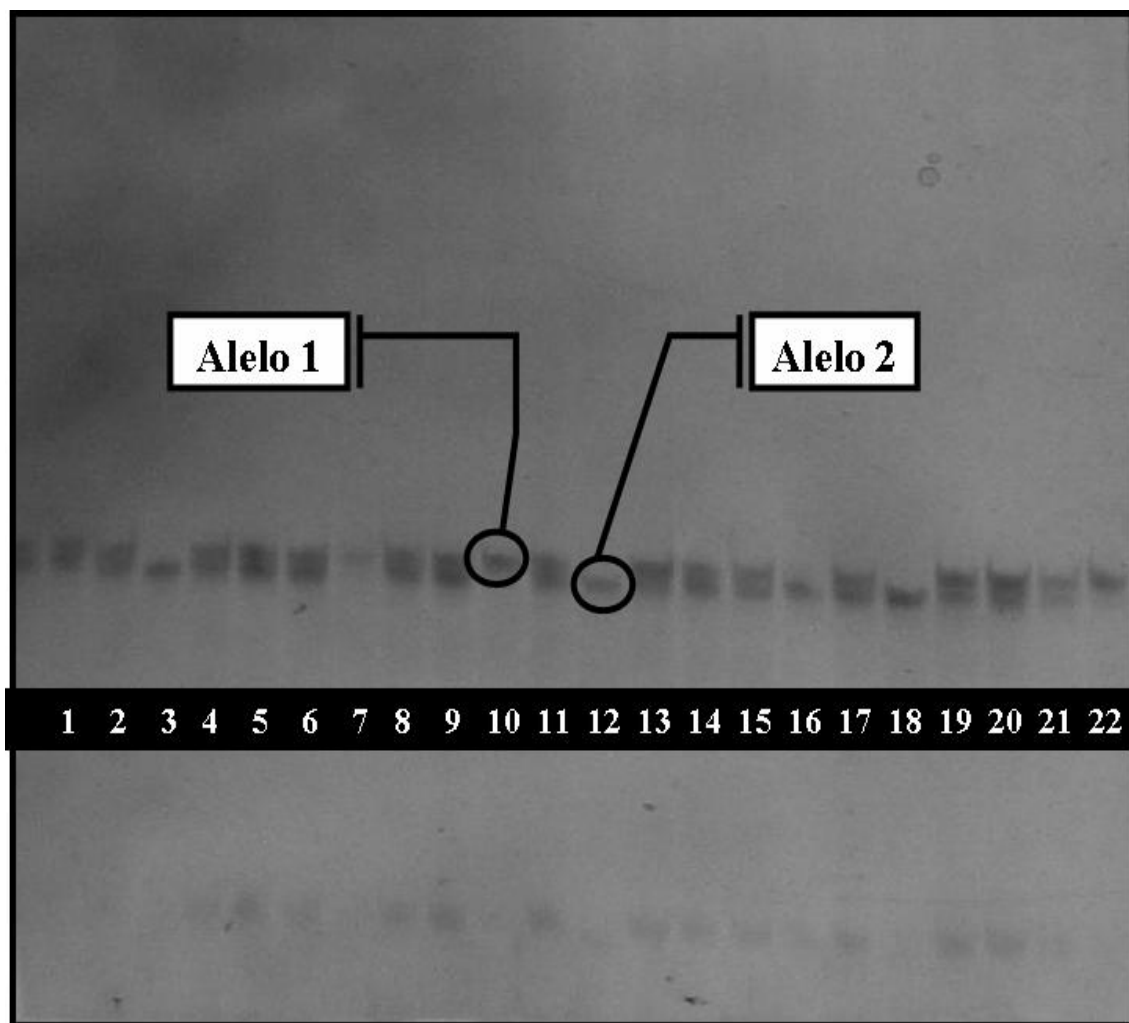
As informações referidas nestes artigos contribuirão para o desenvolvimento de sistemas de manejo de *B. orbignyanus*, garantindo um correto monitoramento genético e manejo reprodutivo que fornecerá uma segura manutenção e conservação das populações desta espécie e do ecossistema.

## **VII. APÊNDICES**

## Apêndice A



**Figura 1.** Análise dos fragmentos de RAPD produzidos a partir da amplificação com o *primer* OPW03, separados em gel de agarose 1,5%. “M” corresponde ao marcador de peso molecular de 100 pb. Amostras de 1 a 24 correspondem aos reprodutores. Amostras de 25 a 45 correspondem à progênie.

**Apêndice B**

**Figura 2.** Análise dos alelos de microssatélite produzidos a partir da amplificação com o loco BoM2, separados em gel de poliacrilamida desnaturante (10%). Amostras de 1 a 11 correspondem aos reprodutores. Amostras de 12 a 22 correspondem à progênie.