

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA E REPRODUTIVA DE  
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyanus*) SUBMETIDOS AOS  
SISTEMAS DE REPRODUÇÃO SEMINATURAL E  
EXTRUSÃO

Autor: Pedro Luiz de Castro  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro – 2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA E REPRODUTIVA DE  
PIRACANJUBA (*Brycon orbignyana*) SUBMETIDOS AOS  
SISTEMAS DE REPRODUÇÃO SEMINATURAL E  
EXTRUSÃO

Autor: Pedro Luiz de Castro  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
fevereiro – 2015

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

C355c	<p>Castro, Pedro Luiz</p> <p>Contribuição genética e reprodutiva de Piracanjuba (<i>Brycon orbignyanus</i>) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão / Pedro Luiz Castro. -- Maringá, 2015.</p> <p>42 f. : il. color.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2015.</p> <p>1. <i>Brycon orbignyanus</i> - Variabilidade genética. 2. <i>Brycon orbignyanus</i> - Contribuição parental. 3. <i>Brycon orbignyanus</i> - Repovoamento. 4. Piracanjuba. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.</p> <p>CDD 22.ed.639.31</p>
-------	---

“Se vocês já assistiram à peça, se lembrarão de como o chefe dos piratas estava sempre fazendo seu discurso de despedida, temendo que ao chegar sua hora de morrer, não tivesse tempo, talvez, de tirar do peito o que havia planejado dizer. Passa-se o mesmo comigo, assim, embora não esteja morrendo neste momento, isto irá acontecer qualquer dia destes e desejo deixar-lhes uma última palavra de adeus. Lembrem-se, isto será a última coisa que ouvirão de mim, portanto meditem sobre o que vou lhes dizer. Eu tive uma vida cheia de felicidades, e desejo que cada um de vocês tenha também uma vida igualmente feliz. Creio que Deus nos pôs neste delicioso mundo para sermos felizes e saborearmos a vida. Felicidade não vem da riqueza nem de meramente ter sucesso profissional, nem do comodismo da vida regalada e satisfação dos próprios apetites. Um passo para a felicidade é, quando jovem tornar-se saudável e forte, para ser útil e gozar a vida quando adulto. O estudo da natureza mostrará a vocês o quão cheio de coisas lindas e maravilhosas Deus fez no mundo para o nosso deleite. Fiquem contentes com o que possuem e tirem disto o melhor proveito. Vejam o lado iluminado da vida ao invés do escuro. Mas a verdadeira maneira de se atingir a felicidade é proporcionando aos outros a felicidade. Procurem deixar este mundo um pouco melhor que o encontraram e quando chegar a sua vez de morrer, poderão morrer felizes sentindo que pelo menos não desperdiçaram seu tempo e fizeram o seu melhor possível.”

Robert Stepherson Smyth Baden-Powell

Agradeço à minha namorada Letícia Viana Costa, que de forma muito especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades. Quero agradecer também aos meus amigos e familiares, que embora não tivessem conhecimento disto, iluminaram os meus pensamentos me levando a buscar mais conhecimentos, assim como meus pais, Sonia Maria da Silva de Castro e Celso Luiz de Castro, pela força, companheirismo e exemplo a mim passados.

Esta conquista  
dedico a vocês

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá, por todas as oportunidades a mim proporcionadas;

à Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização da pesquisa;

ao professor Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pelo período de orientação, amizade, confiança, dedicação e colaboração para meu crescimento profissional e pessoal;

ao professor Dr. Nelson Mauricio Lopera-Barrero, pela contribuição, disponibilidade, amizade e confiança empregados a mim;

aos meus colegas do grupo de pesquisa Peixegen: Aline Mayra, Maria del Pilar, Daniele Menezes, Melanie Digmayer, Ed Christian, Michel Ito, Isabela Martins, Emanuele Lima, Bruna Pontillo e todos os outros que contribuíram para realização deste trabalho, pela amizade e dedicação;

à técnica Dilma Botter pela extrema solícitude durante as análises laboratoriais;

à doutoranda Elenice pelos ensinamentos, dedicação e colaboração durante as análises.

ao técnico Vitor Moisés Honorato, pela parceria, dedicação e trabalho duro nas coletas a campo, sem você o sucesso desta pesquisa estaria comprometido.

aos funcionários José Geraldo e Cleiton, pela ajuda em diversas ocasiões;

aos meus amigos, Vladson, Pedro, Guilherme, Jhony, Leandro, e todos os outros pela parceria de toda a vida.

à toda a minha família, pelos conselhos, apoio e incentivo nos momentos de maiores dificuldades durante esta longa e atribulada jornada;

e a todos os outros que contribuíram para a realização deste trabalho.

**Muito obrigado a todos vocês**

## BIOGRAFIA

PEDRO LUIZ DE CASTRO, filho de Celso Luiz de Castro e Sonia Maria da Silva de Castro, nasceu em Maringá, Estado do Paraná, no dia 02 de março de 1990.

Em fevereiro de 2008, ingressou no curso de Zootecnia pela Universidade Estadual de Maringá. Em agosto desse mesmo ano iniciou sua jornada na pesquisa, como bolsista do CNPq em projetos de iniciação científica na área de Reprodução Animal, permanecendo até junho de 2011, quando adquiriu uma bolsa de extensão na área de extensão rural até junho de 2012.

Em dezembro 2012, obteve o título de Zootecnista, iniciando em seguida o curso de Pós-graduação em Zootecnia, área de concentração Produção Animal, nível de Mestrado, pela Universidade Estadual de Maringá, realizando estudos na área de piscicultura e reprodução de peixes.

## INDÍCE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
FIGURAS DO APÊNDICE.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Taxonomia e características da piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> ).....	02
1.2 O rio Tietê-SP e os impactos da instalação das barragens hidrelétricas.....	04
1.3 Histórico do repovoamento brasileiro e a soltura da Piracanjuba no rio Tietê.....	06
1.4 Indução hormonal e os sistemas reprodutivos para peixes reofílicos.....	08
1.4.1 Sistema reprodutivo por extrusão.....	08
1.4.2 Sistema reprodutivo seminatural.....	09
1.5 Análises de biologia molecular.....	10
1.5.1 Marcadores moleculares microssatélites.....	11
1.5.2 <i>Loci</i> heterólogos.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	12
OBJETIVOS GERAIS.....	16
CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA E REPRODUTIVA DE PIRACANJUBA SUBMETIDOS AOS SISTEMAS DE REPRODUÇÃO SEMINATURAL E EXTRUSÃO.....	17



Resumo.....	17
Abstract.....	17
Introdução.....	18
Material e Métodos.....	20
Resultados e Discussão.....	25
Conclusão.....	32
Agradecimentos.....	33
Referências.....	33
Lista de tabelas.....	37
APÊNDICE.....	40

## LISTA DE TABELAS

	Página
CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA E REPRODUTIVA DE PIRACANJUBA SUBMETIDOS AOS SISTEMAS DE REPRODUÇÃO SEMINATURAL E EXTRUSÃO.....	17
TABELA 1. Características dos <i>loci</i> microssatélites estudados para a variabilidade genética na progênie de <i>Brycon orbignyanus</i> nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, em diferentes acasalamentos.....	37
TABELA 2. Número, tamanho e alelo de maior frequência nos parentais e na progênie de <i>Brycon orbignyanus</i> nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural com diferentes acasalamentos.....	38
TABELA 3. Heterozigose observada ( $H_o$ ), heterozigose esperada ( $H_e$ ), índice de Shannon ( $H'$ ) e teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_w$ ).....	38
TABELA 4. AMOVA para os oito grupos de <i>Brycon orbignyanus</i> (reprodutores x Progênie).....	39
TABELA 5. Análises dos parâmetros seminais de machos de piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> ) submetidos ao sistema reprodutivo por extrusão.....	39

## LISTA DE FIGURAS

	Página
INTRODUÇÃO.....	01
FIGURA 1. Piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> ).....	02
FIGURA 2. Localização do Rio Tietê – SP.....	04
FIGURA 3. Sistema reprodutivo por extrusão.....	09
FIGURA 4. Sistema de reprodução seminatural.....	09
CONTRIBUIÇÃO GENÉTICA E REPRODUTIVA DE PIRACANJUBA SUBMETIDOS AOS SISTEMAS DE REPRODUÇÃO SEMINATURAL E EXTRUSÃO.....	17
FIGURA 1. Localização da estação de hidrobiologia AES Tietê Promissão – SP.....	21
FIGURA 2. Contribuição dos machos na progênie dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural 1x3.....	28
FIGURA 3. Composição das famílias formadas no sistema reprodutivo por extrusão 2x6.....	29
FIGURA 4. Composição das famílias formadas no sistema reprodutivo seminatural 2x6.....	29
FIGURA 5. Taxa de fecundação e eclosão de reprodutores <i>Brycon orbignyanus</i> submetidos aos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural em diferentes acasalamentos.....	32

## FIGURAS DO APÊNDICE

	Página
APÊNDICE.....	40
FIGURA 1. Análises dos alelos produzidos a partir da amplificação de marcador microssatélite ( <i>primer</i> Bh13), para larvas de piracanjuba ( <i>Brycon orbignyanus</i> ), separados por gel de poliacrilamida 10%.....	40

## RESUMO

A instalação de barragens hidrelétricas no curso dos rios brasileiros é constantemente associada à grande redução das populações de peixes nativos. Essa ação, além de alterar toda a dinâmica aquática, constitui uma barreira física que dificulta a reprodução de peixes migradores, como a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), espécie fortemente impactada e que atualmente figura na lista de peixes que correm perigo de extinção. Para mitigação desses prejuízos, uma série de políticas públicas foram implantadas, exigindo-se a compensação biológica pela utilização de águas continentais para produção de energia elétrica, sendo o repovoamento, restabelecimento de populações naturais a partir da liberação de alevinos, a prática mais adotada. Contudo, se não realizada com cautela, essa prática representa riscos genéticos e reprodutivos às populações ainda presentes nos rios, dado à comum perda de variabilidade genética na produção de alevinos dentro das pisciculturas. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a influência dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, em diferentes acasalamentos (uma fêmea para três machos e duas fêmeas para seis machos), na variabilidade genética e reprodutiva da progênie obtida. Foram realizadas amostragens de 360 larvas (90 larvas para cada tratamento), assim como um fragmento da nadadeira dos 24 reprodutores utilizados, sendo as análises de variabilidade genética realizadas pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) com a amplificação de oito *primers* microssatélites heterólogos. Identificou-se 30 alelos, que variaram de três a quatro por *locus*, de forma que 75% dos alelos de maior frequência nos parentais também os foram na prole, evidenciando a manutenção das frequências alélicas em todos os tratamentos. Os índices de heterosigozidade esperada e Shannon constataram a manutenção da variabilidade genética, observando-se o aumento de seus valores em todas as progênies com relação a seus pais. Por outro lado, as análises de contribuição parental evidenciaram melhores resultados para os tratamentos do sistema reprodutivo por

extrusão, já que foram observadas evidentes relações de dominância reprodutiva entre os machos do sistema seminatural, e que sendo assim, o aumento do número de reprodutores nesse sistema foi responsável pela intensificação desse comportamento. Por outro lado observou-se melhores taxas de fertilização, eclosão e mortalidade dos reprodutores utilizados no sistema seminatural, resultado associado às lesões causadas pela massagem abdominal na extrusão. Desta forma é indicada a redução da proporção macho x fêmea na produção de alevinos de piracanjuba no sistema seminatural em pisciculturas voltadas ao repovoamento, enquanto que em sistemas por extrusão o aumento dessa proporção favorece uma contribuição parental mais homogênea, mas isso está condicionado à participação efetiva de todos os machos, fator garantido pelas análises qualitativas seminais de cada um deles.

## ABSTRACT

Building hydroelectric dams in the course of Brazilian rivers is constantly associated with the large reduction in native fish populations. This action in addition to changing the entire water dynamics, is also a physical barrier that hinders the reproduction of migratory fish, such as piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), strongly impacted species which is currently on the list of fish that are in danger of extinction. To mitigate the damages, a series of public policies were implemented, requiring biological compensation for the use of inland waters for electricity production and restocking, restoring natural populations from the release of alevins, is the most commonly adopted practice. However, if not carefully performed, this practice represents genetic and reproductive risk to populations still present in rivers, given the common loss of genetic variability in the production of alevins in the fish farms. The purpose of this study was to evaluate the influence of extrusion or semi-natural reproductive systems in different breeding (a female to three males and two females to six males), on the genetic and reproductive variability of the obtained progeny. 360 larvae samples were taken (90 larvae for each treatment) as well as a fin fragment from the 24 breeders used, and the genetic variability analyzes performed by PCR (Polymerase Chain Reaction) with amplification of eight microsatellite heterologous primers. 30 alleles were identified ranging from three to four per locus, so that 75% of higher frequency in the parental alleles were also in the offspring, demonstrating the maintenance of allelic frequencies in all treatments. The rates of expected heterozygosity and Shannon found the maintenance of genetic variability, observing the increase of its values in all progenies in relation to their parents. On the other hand, the parental contribution analyzes showed better results for treatments of the reproductive system by extrusion, since apparent relations of reproductive dominance were observed among the males in the semi-natural system, thus the increased number of breeders in

the system was responsible for the intensification of this behavior. Moreover, better fertilization, hatching and mortality rates of breeders were observed in the semi-natural system, result associated to injuries caused by abdominal massage in extrusion. Thus, a reduction in the male x female ratio is indicated in the production of piracanjuba alevins in semi-natural system in fish farms aimed at restocking, while in extrusion systems increasing this ratio favors a more homogeneous parental contribution, but it is conditioned to effective participation of all males which can be guaranteed by semen quality analysis.



## INTRODUÇÃO

O território brasileiro detém cerca de 12% de todo o reservatório de água doce do planeta, além de mais de 8.000 km de faixa marítima, características essas que o credencia a ser o país com maior potencial aquícola do mundo. Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2014), o Brasil melhorou de forma significativa seu ranking nos últimos anos, obtendo um crescimento produtivo visível, 43,8% entre 2007 e 2009, estimando-se ainda uma produção potencial de até 20 milhões de toneladas no ano de 2030, mas que até lá, um longo caminho deve ser percorrido, já que com cerca de dois milhões de toneladas produzidas em 2013, ainda encontra-se atrás de países como a Índia, Vietnã e Indonésia (Lopera-Barrero et al., 2011; MPA, 2012).

Aliado à elevação da produtividade, o consumo brasileiro de carne de pescado também cresce exponencialmente, observando-se um aumento superior a 100% entre os anos de 2003 e 2013, atingindo a média de 14,5 kg/habitante/ano, valor que atendeu pela primeira vez às recomendações da FAO de 12 kg/habitante/ano (MPA, 2014). No mundo, em 2012, a produção de organismos aquáticos atingiu 158 milhões de toneladas, representando 16,7% do consumo humano de proteína animal. Embora a pesca ainda domine, a aquicultura é responsável por um crescente aumento da oferta de carne de pescado, passando de 13% em 1990 para 42% em 2012, sendo 86% do total de peixes para consumo humano (FAO, 2014). Por outro lado, os grandes estoques pesqueiros mundiais, marinhos e de água doce, diminuem rapidamente, causa de uma série de fatores, como a pesca excessiva, poluição, assoreamento e construção de barragens, havendo a necessidade de avanços tecnológicos, relacionados à reprodução, alimentação e sistemas de produção de peixes em cativeiro, fato que elege a aquicultura como o futuro da produção mundial de organismos aquáticos.

A carne do pescado é considerada a proteína animal mais saudável, constituindo uma excelente fonte de nutrientes, com proteínas de alta digestibilidade, rica em aminoácidos essenciais, baixo teor de gordura saturada, elevada quantidade de ácidos graxos poli-insaturados do tipo ômega-3, vitaminas e minerais. Seu consumo ainda é relacionado com a

redução no risco de uma série de doenças, como a hipertensão e a diabetes (Lima & Kirschnik, 2013).

Segundo Moro et al. (2013), a produção brasileira de peixes caracteriza-se predominantemente pelo cultivo de espécies exóticas, como tilápias, bagres e trutas, porém por determinações legais, em alguns Estados, bem como características de mercado, o cultivo de espécies nativas vem ganhando espaço, principalmente com o surgimento dos animais melhorados e dos híbridos, mais produtivos e adaptados. Ainda de acordo com os mesmos autores, 52 espécies nativas brasileiras vêm sendo produzidas em cativeiro, destacando-se as famílias Serrasalminidae (Tambaqui, pacu e pirapitinga), Anostomidae (Piau-açu), Pimelodidae (Surubins, pintado, cacharas e mandis) e Characidae (Matrinxã e piracanjuba). Embora o número de espécies exploradas seja relativamente grande, poucas são as que possuem tecnologia de produção totalmente desenvolvida e consolidada.

### 1.1 Taxonomia e características da piracanjuba (*Brycon orbignyanus*)

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Characidae

Subfamília: Briconinae

Gênero: Brycon

Espécie: *Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849



**Figura 1.** Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).

A piracanjuba (Figura 1) é um peixe com ampla distribuição geográfica, encontrada principalmente nas bacias dos rios Paraná e Uruguai, talvez por isso seus nomes populares sejam tão variados; na Argentina é conhecida como pirá-pirá, piracanjuba, pirápitanga,

salmón-del-Paraná, salmón-del-rio ou salmonete, no Uruguai piraputá, e no Brasil piracanjuba, piracanjuva, bracanjuva, bracanjuba, pracanjuva, pirapitonga, piraputanga ou salmão-crioulo (Milliorini, 2012).

É um peixe de escamas, alongado e robusto, com boca relativamente ampla e dentes molariformes, semelhantes aos peixes redondos (Moro et al., 2013). 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 avermelhada bifurcada com faixa mediana bem escura e nadadeira anal longa da mesma cor (Lopera-Barrero, 2005).

Segundo Ceccarelli et al. (2005) a piracanjuba é uma das espécies nativas com maior valor comercial no Brasil, pela sua excelente qualidade de carne e pigmentação avermelhada característica do filé, devido ao acúmulo de compostos carotenóides no músculo, alto rendimento de carcaça, e na pesca esportiva; é famosa por sua voracidade. Essa espécie possui hábito alimentar onívoro, consumindo frutos, sementes, insetos e peixes, além de apresentar também rastros branqueais bem desenvolvidos, característica que lhes conferem a habilidade de captura do plâncton. Em cativeiro observa-se grande aceitabilidade de ração e rápido crescimento (Freato et al., 2005; Sá & Fracalossi, 2002).

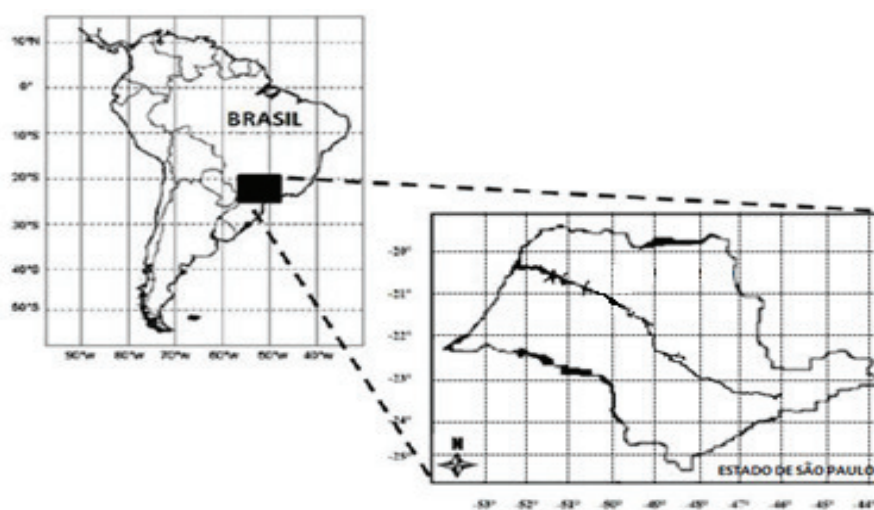
Quanto ao comportamento reprodutivo, a piracanjuba realiza migrações reprodutivas, com desova total, normalmente no período de novembro a janeiro, época em que o alimento é mais abundante, com altas temperaturas e produções elevadas de zooplâncton, fatores que permitem maior sobrevivência da progênie (Lopera-Barreiro, 2007). As larvas de Piracanjuba são carnívoras, principalmente após o segundo dia de vida, quando a reserva vitelínica se esgota e abrem a boca, a partir daí, passam a selecionar seu alimento vivo (Reynalte-Tataje et al., 2002). Quando produzidas em incubadoras, faz-se necessário o fornecimento de pós larvas de outras espécies como tambaqui ou curimba para redução da mortalidade causada pelo canibalismo. A mudança do hábito alimentar, carnívoro para onívoro, ocorre nos peixes juvenis.

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura, o Censo Aquícola Nacional de 2008 relatou a existência de 55 unidades produtivas de piracanjuba, com unidades concentradas principalmente nas regiões centro-oeste, sudeste e sul, em especial nos Estados de São Paulo e Paraná. Em 50% das unidades, o sistema produtivo se baseava em viveiros escavados e 65% deles adotavam o policultivo. Apesar de não ter entrado em pauta nesse senso, a piracanjuba vem sendo produzida em larga escala para fins de repovoamento, principalmente em pisciculturas parceiras de usinas hidrelétricas.

Atualmente o *Brycon orbignyanus* está na lista de peixes que correm o risco de extinção, apresentando uma redução drástica dos seus estoques naturais (Rosa & Lima, 2008). Esta redução está intimamente relacionada às ações antropogênicas, como o desmatamento e assoreamento dos rios, redução das fontes de alimento, poluição, mas principalmente pela construção de barragens hidrelétricas que impossibilitam as migrações reprodutivas (Piracema).

## 1.2 O rio Tietê-SP e os impactos da instalação das barragens hidrelétricas

O Rio Tietê (Figura 2) nasce a uma altitude de 1.030 metros do nível do mar, no município de Salesópolis, serra do mar paulista, a 22 km do oceano Atlântico e 96 km da cidade de São Paulo. Com uma característica interessante, esse rio ao invés de desaguar no mar, corre 1.100 km rumo ao interior do continente, encontrando sua foz no rio Paraná, na cidade de Itapurá. Banha 62 municípios, e é dividido em seis sub-bacias hidrográficas: Alto Tietê, onde está inserida a Região Metropolitana de São Paulo; Piracicaba; Sorocaba/Médio Tietê; Tietê/Jacaré; Tietê/Batalha e Baixo Tietê (DAEE, 2013).



**Figura 2.** Localização do Rio Tietê – SP.

Historicamente esse rio foi o grande responsável pela interiorização do Brasil, e acompanhou o progresso do Estado de São Paulo. Foi nele, que em 1910 foram instalados os primeiros grandes geradores de energia hidrelétrica do país. Porém, a partir dos anos 1950 sofreu um processo intenso de deterioração, resultado de uma industrialização desordenada, principalmente no trecho da capital, onde se transformou em um verdadeiro canal receptor de

poluição. Poluição que não se limita apenas à região metropolitana da cidade de São Paulo, mas afeta também todas suas bacias em diferentes escalas (Borges, 2004).

Após sair da maior metrópole da América do sul, as águas do Tietê, extremamente poluídas, encontram novamente regiões rurais e áreas de preservação ambiental, recebendo água de afluentes limpos, além de passarem por corredeiras que permitem sua re-oxigenação, com isso o rio recupera sua vida, podendo, novamente serem encontrados os peixes.

O Tietê se destaca pela sua alta capacidade de produção energética através de usinas hidrelétricas, aumentando ainda mais sua importância, já que considerando sua posição geográfica, esse rio encontra-se na região mais populosa e industrializada do Brasil, que necessita de um enorme aporte energético. Oliveira (2014) relatou a existência de onze unidades produtoras de energia hidrelétrica instaladas em seu curso.

Por outro lado, a construção de barragens vem sendo motivo de muitas críticas, uma vez que sua instalação resulta em enormes impactos ambientais no curso dos rios. A diminuição da correnteza causada pelo represamento altera diretamente a dinâmica do ambiente aquático, já que o fluxo de sedimentos é modificado, favorecendo a deposição destes no ambiente lótico prejudicando as espécies adaptadas aos ambientes reofílicos. A temperatura do rio também é alterada, sendo comum a divisão do lago da represa em dois ambientes: um onde a temperatura é mais baixa (o fundo do lago) e outro onde a temperatura é mais alta (superfície do lago), uma vez que com essa disposição há pouca mistura na água do ambiente represado, sendo criadas condições anóxicas que favorecem a eutrofização (Souza, 2000; Agostinho et al., 2007).

Além disso, as barragens representam uma barreira física para as espécies aquáticas, constituindo um fator de isolamento entre populações, impedindo ou dificultando a piracema da maioria das espécies de peixe. Outros exemplos de danos causados pela instalação das hidrelétricas são apontados por Batista et al. (2012), como a modificação da paisagem, manejo inadequado dos resíduos sólidos e líquidos, geração de campos magnéticos pelas torres de alta tensão, contaminação sonora, desmatamento das matas ciliares e os riscos de deslizamento.

A fim de mitigar os impactos ambientais negativos na instalação de barragens hidrelétricas nos rios brasileiros, já a partir de 1938 com a criação do primeiro código de Pesca (Decreto-Lei N°794 de 19/10/1938), iniciaram-se as discussões a cerca deste tema, exigindo a construção de estações de piscicultura dentro das usinas. A lei federal 6.938 de 31 de agosto de 1981 que dispõe sobre a política nacional do meio ambiente, tratou profundamente da necessidade de compensação biológica a partir dos impactos ambientais.

No Estado de São Paulo, a lei estadual 13.542 de 8 de maio de 2009 estabeleceu a necessidade de propostas de ações estratégicas para a conservação de espécies de relevância ecológica da fauna regional, para a aquisição da licença ambiental de operação e regularização, incluindo no programa de manejo e conservação do reservatório a soltura de espécies de peixes nativos através do repovoamento.

### **1.3 Histórico do repovoamento brasileiro e a soltura da piracanjuba no rio Tietê**

O repovoamento de peixes representa a soltura de alevinos provenientes de outros sistemas naturais ou de cultivo em um corpo d'água, sendo considerado o responsável pelo aumento dos recursos pesqueiros em diversos rios do mundo, e quando bem conduzido, auxilia no restabelecimento de populações de interesse. No Brasil essa prática teve início na primeira metade do século XX, com a liberação de tilápias e corvinas em açudes nordestinos. A partir daí, em um curto período de tempo, sem que seus resultados tivessem sido realmente avaliados, difundiu-se por todo o país. Porém, até o início da década de 1990, o repovoamento praticado era baseado em conceitos errôneos, promovendo a introdução de espécies de outras bacias ou continentes e alevinos com baixa qualidade genética, necessitando-se a implementação de ações de conscientização que divulgassem os prejuízos causados pela liberação desses animais. Com uma nova mentalidade, aliada ao surgimento de técnicas reprodutivas eficazes, o repovoamento passou a ser realizado na maioria das vezes com espécies nativas (Agostinho et al., 2007).

White et al. (1995), classificaram as metodologias de repovoamento em três. São elas:

a) Introdução: Soltura de alevinos de espécies não nativas, visando o estabelecimento de novas populações auto-sustentáveis;

b) Manutenção: Soltura de uma espécie, repetida anualmente, com a finalidade de manter uma população de peixes que não conseguem se reproduzir naquele ambiente;

c) Suplementação: Repovoamento que visa aumentar a população de uma determinada espécie ou sua variabilidade genética, com caráter conservacionista e preservacionista.

Atualmente, o repovoamento de suplementação é o mais realizado, principalmente por pisciculturas ligadas a concessionárias hidrelétricas para mitigação dos seus impactos.

Os resultados dos programas de repovoamento brasileiros são muitas vezes inexistentes ou insipientes e sugerem que não estão obtendo sucesso, tanto em relação ao aumento dos estoques, quanto à preservação da biodiversidade. Por outro lado, nos últimos dez anos, grandes avanços na melhoria desses programas foram alcançados, principalmente, por esse

tema ter sido foco de diversas pesquisas, destacando-se os trabalhos realizados pelo grupo de pesquisa Peixegen da Universidade Estadual de Maringá, nas áreas de conservação da variabilidade genética e sistemas reprodutivos em pisciculturas voltadas para esse fim.

Esses avanços nos permitiram relacionar a ineficácia dos programas de repovoamento com a comum perda de variabilidade genética em estoques mantidos em cativeiro, pelo acasalamento de indivíduos geneticamente similares ou inadequado manejo reprodutivo, favorecendo o aparecimento da endogamia (Aho et al., 2006). A endogamia diminui as taxas de sobrevivência da prole, causado pela perda de um *pool* genético adaptativo àquele ambiente, além de ser responsável pelo aparecimento de deformidades e susceptibilidade a doenças (Lopera-Barrero, 2007).

O isolamento de reprodutores por algumas gerações dentro da piscicultura possibilita a seleção artificial, que causa alterações morfológicas e comportamentais nos animais, passando a diferir-se significativamente das populações naturais, características que são repassadas às próximas gerações (Kincad, 1995). O repovoamento de suplementação com o uso da mesma espécie, mas provindos de outras bacias, também podem acarretar problemas, já que quando se reproduzirem em ambiente natural, é possível que a prole também não possua o *pool* genético adaptativo daquele ambiente (Agostinho et al., 2007).

Sendo assim, o repovoamento deve ser realizado com cautela, observando-se fatores como a espécie, sistemas reprodutivos utilizados, locais e períodos de soltura, tamanho dos peixes e sanidade, promovendo a manutenção da variabilidade genética daquele ambiente, procedendo-se obrigatoriamente o monitoramento genético dos reprodutores e dos peixes que serão soltos, assegurando um programa ambiental responsável (Sirol & Brito, 2006; Ortega-Villaizán Romo et al., 2006).

Um exemplo de programa de repovoamento bem sucedido é o da empresa AES-Tietê, baseado na cidade de Promissão - São Paulo, que iniciou suas atividades no ano de 1999, a partir da captura de reprodutores de várias espécies no Rio Paraná, como pacu guaçu, curimbatá, piapara, dourado, tabarana e piracanjuba. Até o ano de 2015, no total, estima-se que foram soltos aproximadamente 40.000.000 de alevinos em diversas localidades. A piracanjuba foi uma das espécies com os melhores resultados obtidos, já que esteve extinta por 30 anos no rio Tietê. A partir do início do seu repovoamento, com alevinos produzidos no ciclo reprodutivo 2001/2002, e a soltura de mais de 2.700.000 de alevinos até o ano de 2015, essa espécie começa a reaparecer, observando-se novamente a presença de cardumes e constantes capturas.

## **1.4 Indução hormonal e os sistemas reprodutivos para peixes reofílicos**

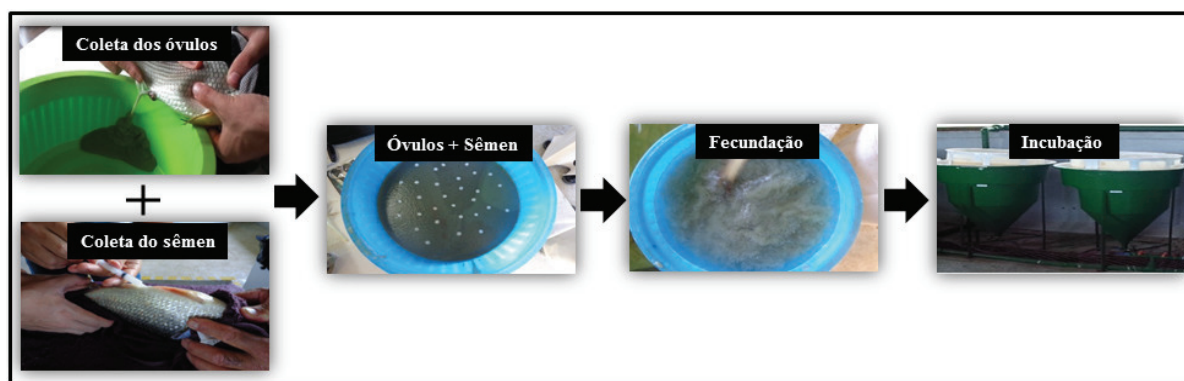
A grande maioria das espécies de peixes nativos brasileiros são reofílicas, e necessitam da migração em seu período reprodutivo. Ação necessária, pois é através dela que uma série de alterações hormonais ocorrem no corpo do animal, estimulando a maturação gonadal e a desova ou espermiacão (Baldisserotto & Gomes, 2010). Segundo Zaniboni-Filho & Nuñez (2004), a utilização da reserva energética corporal devido ao grande esforço físico durante a subida dos rios, é outro fator que contribui para a desova ao fim da migração. Com isso, se as alterações no ambiente não forem suficientemente fortes para provocar o desenvolvimento dos ovócitos, o animal permanecerá em uma fase de dormência até que ocorra a reabsorção (Woynarovich & Horváth, 1989).

Portanto, quando confinamos essas espécies, a migração não ocorre, os estímulos hormonais não aparecem, e a reprodução fica impossibilitada. Para contornar esse problema, Rodolpho Von Ihering em 1935, deu início às pesquisas acerca da reprodução dos peixes nativos brasileiros em cativeiro, obtendo sucesso na indução à maturação final e desova, a partir da aplicação de hormônios naturais presentes na hipófise de peixes maduros. Essa técnica, conhecida como hipofiseação continua sendo uma das alternativas mais utilizadas para a indução da reprodução de peixes migradores em todo mundo (Zaniboni-Filho & Weingartner, 2007). Hoje em dia uma série de hormônios comerciais também foram sintetizados para esse fim, como as gonadotropinas (FSH e LH) e os hormônios liberadores de gonadotropinas (GnRH) que também apresentam resultados satisfatórios. Após a aplicação hormonal, a desova pode ocorrer de duas diferentes formas, seminatural e por extrusão.

### **1.4.1 Sistema reprodutivo por extrusão**

A técnica de desova por extrusão consiste na retirada dos ovócitos das fêmeas imediatamente após a ovulação, através de uma pressão abdominal, induzindo-se a saída destes pela papila urogenital. O mesmo procedimento é utilizado para a retirada do sêmen, sendo ambos os gametas recolhidos em recipientes, misturados na presença de água e os ovos incubados (Figura 3). Esse sistema é o mais utilizado no Brasil, já que reduz a mão de obra, dispensando-se a utilização de tanques de reprodução, permitindo ainda o fácil manejo de gametas destinados ao melhoramento genético (Zaniboni-Filho & Nuñez, 2004).

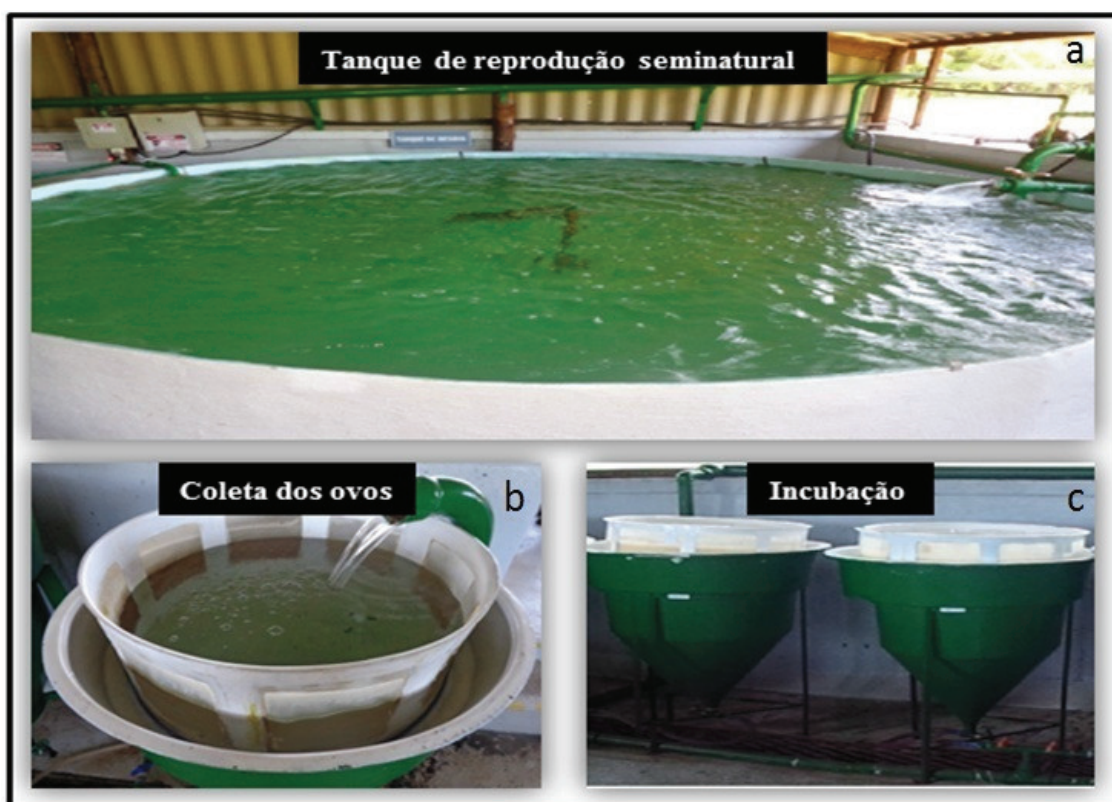




**Figura 3.** Sistema reprodutivo por extrusão.

### 1.4.2 Sistema reprodutivo seminatural

No sistema seminatural (Figura 4), após a indução hormonal, os reprodutores, machos e fêmeas, são colocados juntos em um tanque, geralmente redondo, com circulação forçada de água que simula a correnteza dos rios, e que fará os peixes se movimentarem dentro do tanque, possibilitando a maturação final dos ovócitos. Esse sistema é caracterizado pela pouca interferência do manejador no processo, de forma que a fecundação ocorra de maneira direta e aleatória.



**Figura 4.** Sistema de reprodução seminatural. a) Tanque de reprodução seminatural com recirculação de água; b) Incubadora de coleta de ovos; c) Incubadora definitiva.

Após a desova, por ação da gravidade, os ovos são recolhidos no fundo do tanque e levados diretamente para uma incubadora de coleta, sendo transferidos posteriormente para as incubadoras definitivas, onde ficarão até a eclosão. Zaniboni-Filho & Nuñez (2004) citaram que a principal desvantagem do sistema reprodutivo seminatural, está relacionada com a necessidade de retirada dos ovos do tanque para a transferência às incubadoras, podendo prejudicar a evolução dos embriões e aumentar a incidência de infecção por fungos.

Contudo, muitos trabalhos têm demonstrado vantagens do sistema seminatural sobre a extrusão. Reynalte-Tataje et al. (2013), Lopera-Barrero et al. (2014) e Povh et al. (2010) observaram melhores taxas de fertilização, eclosão e conservação da variabilidade genética quando utilizado esse sistema. Os mesmos autores relatam o aumento da mortalidade dos reprodutores utilizados no sistema por extrusão, e que isso está relacionado com o estresse do manuseio durante os procedimentos. Sendo assim, a escolha do sistema reprodutivo adotado deve levar em consideração a espécie utilizada, já que algumas são mais dóceis e não apresentam problemas na manipulação, como o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o curimba (*Prochilodus lineatus*), mas que por outro lado as espécies do gênero *Brycon*, como a piracanjuba, são animais muito mais sensíveis ao grande estresse dos processos no sistema reprodutivo por extrusão (Lopera-Barrero, 2007).

## 1.5 Análises de biologia molecular

A descoberta da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) na década de 80 (Mullis, 1990), possibilitou o desenvolvimento de pesquisas genéticas com a utilização de um grande número de indivíduos e representou uma revolução na biologia (Ali et al., 2004). Esta técnica baseia-se na síntese *in-vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, realizada através da ação da enzima DNA polimerase e permite a quantificação e análise da variabilidade genética dentro e entre populações, com base nas diferenças e semelhanças de sequências de bases de segmentos no DNA (Ribolli, 2007).

A partir daí, foram desenvolvidos uma série de marcadores moleculares, sequências de DNA que se repetem pelo genoma e revelam polimorfismos, permitindo a avaliação genética de um indivíduo, de uma comunidade ou população, através do estabelecimento de hipóteses sobre as relações de parentescos ou de filogenias entre eles. Os marcadores moleculares microsatélites são atualmente os mais utilizados em estudos genéticos de peixes, se tornando referência no monitoramento genético de estoques mantidos em cativeiro e de populações naturais (Lopera-Barrero, 2007; Liu & Cordes, 2004).

### 1.5.1 Marcadores moleculares microssatélites

Os marcadores moleculares microssatélites também conhecidos como sequência simples repetida (SSRs – *Simple Sequence Repeats*) ou repetições curtas em *tandem* (STRs - *Short Tandem Repeats*), são compostos por sequências de um a oito nucleotídeos repetidos em *tandem*, sendo cada bloco de repetição menor que 100 pares de base. Esse tipo de marcador é o mais abundantes no genoma eucarioto, e distribuídos ao acaso, permite sua ampla cobertura.

Os microssatélites possuem característica co-dominantes, que permitem um alto conteúdo polimórfico e atualmente são os mais utilizados em estudos de variabilidade genética de populações de peixes (Alam & Islam, 2005). Essa característica possibilita ainda a verificação do comprimento de cada um dos alelos herdados, facilitando a identificação de indivíduos homozigotos e heterozigotos e permitindo que os dados obtidos por este marcador sejam analisados pelos métodos estatísticos da genética populacional clássica (Chistiakov et al., 2006; Lopera-Barrero, 2007).

As informações fornecidas por esses marcadores são muito importantes, pois aliadas as técnicas de reprodução em cativeiro e criopreservação, possibilitam a formulação de estratégias para a conservação da diversidade genética, recuperação das populações naturais de peixes e na tomada de decisões na gestão de uma piscicultura (Abdul-Muneer, 2014).

### 1.5.2 *Loci* heterólogos

Embora a utilização dos marcadores microssatélites seja extremamente eficiente e representou um grande avanço às análises genéticas, sobretudo as de variabilidade, quando o foco do trabalho são espécies ainda não sequenciadas, como a maioria dos peixes nativos brasileiros, esse processo é dificultado, já que muitas vezes os *primers* espécie-específico de sequências microssatélites são inexistentes e sua confecção representa um processo caro e demorado.

Com a constatação da ocorrência da conservação de sítios em genomas de espécies relacionadas, esse problema foi resolvido, tornando possível em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies ou gêneros, observando-se maior transferibilidade de *loci* heterólogos, quanto mais próximo forem as espécies ou gêneros taxonomicamente. (Mia, 2005).

Muitos autores comprovaram a eficácia da transferibilidade de microssatélites entre espécies. Sanches & Galetti (2006) realizaram com sucesso ensaios de transferibilidade de

*primers* específicos de *Brycon hilarii*, para cinco diferentes espécies do gênero (*Brycon orthotaenia*, *Brycon falcatus*, *Brycon cephalus*, *Brycon insignis* e *Brycon orbignyanus*). Lima et al. (2008), testaram 52 *locus* microssatélites de diversas espécies para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), sendo que 16 *locus* apresentaram resultados satisfatórios na amplificação.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**, v.2014, p.1-11, 2014.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. Estocagem. In: AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. (Ed.). **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Universidade Estadual de Maringá; Maringá: Eduem, 2007. p.253-274.

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.

ALAM, M. S.; ISLAM, M. S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. **Aquaculture**, v.246, p.151-160, 2005.

ALI, B. A.; HUANG, T. H.; QIN, D. N.; WANG, X. M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Journal of Fish Biology**, v.14, p.443-453, 2004.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. 608p.

BATISTA, B. M. F.; SÁNCHEZ, D. C. M.; DA SILVA, J. V.; MARTINEZ, D. T.; PASA, M. C. Revisão dos impactos ambientais gerados na fase de instalação das hidrelétricas: uma análise da sub-bacia do alto Juruena- MT. **Biodiversidade**, v. 11, p.69-85, 2012.

BORGES, M. L. **Observando o Tietê**. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 2004. p.112.

CECCARELLI, P. S.; SENHORINI, J. A.; REGO, R. F. Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Ed.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. p.121-147.

CHISTIAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v.255, p.1-29, 2006.

DAEE. **Histórico do rio Tietê**. São Paulo: Departamento de águas e energia elétrica, 2013. Disponível em: [http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com\\_content&id=793:histórico-do-rio-tiete&Itemid=53](http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com_content&id=793:histórico-do-rio-tiete&Itemid=53). Acesso em: 12 jan. 2015.

FAO. **The state of world fisheries and aquaculture 2014**. Roma: FAO Fisheries department, 2014. p. 288.

FREATO, T. A.; FREITAS, R. T. F.; SANTOS, V. B. dos; OST, P. R.; VIVEIROS, A. T. M. Efeito do peso de abate nos rendimentos do processamento da Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, valenciennes, 1849). **Ciência e Agrotecnologia**, v.41, p.676-682, 2005.

KINCAID, H. L. An evaluation of inbreeding and effective population size in salmonid broodstocks in federal and state hatcheries. In: SCHRAMM, Jr., H. L.; PIPER, R. G. (Ed.). **Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems**. Bethesda: American Fisheries Society, 1995. p.193-204.

LIMA, J. S.; TELLES, M. P. C.; RESENDE, L. V.; GOUVEIA, F. O.; BONI, T. A. amplificação cruzada e padronização de marcadores microssatélites em *colossoma macropomum* (tambaqui). **Revista Biologia Neotropical**, v.5, p.41-49, 2008

LIMA, L. K. F.; KIRSCHNIK, P. G. Composição, alterações pós-morte e métodos de conservação do pescado. In: RODRIGUEZ, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; DOS SANTOS, V. R. V. (Ed.). **Piscicultura de água doce, multiplicando conhecimentos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura; Brasília: Embrapa, 2013. p. 401-421.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker Technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v.238, p.1-37, 2004.

LOPERA-BARRERO, N. M. **Diversidade genética de populações de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com a técnica de RAPD**. 2005. 45p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Maringá.

LOPERA-BARRERO, N. M. **Diversidade genética e manejo reprodutivo da Piracanjuba, *Brycon orbignyanus***. 2007. 89p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; MENDEZ, L. D. V.; POVEDA-PARRA, A. R. A aquicultura no mundo. In: LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; MENDEZ, L. D. V.; POVEDA-PARRA, A. R. (Ed.). **Produção de organismos aquáticos - uma visão geral no Brasil e no mundo**. Guaíba: Agrolivros, 2011. p. 13-95.

LOPERA-BARRERO, N. M.; ALVAREZ, C. A. R.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina: Ciências agrárias**, v.35, p.541-554, 2014.

MIA, M. Y. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. **Aquaculture**, v.247, p.267-273, 2005.

MILIORINI, A. B. **Resfriamento e congelamento de embriões de dourado (*Salminus brasiliensis*), Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e piapara (*Leporinus obtusidens*)**. 2012. 138p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

MORO, G. V.; REZENDE, F. P.; ALVES, A. L.; HASHIMOTO, D. T.; VARELA, E. S.; TORATI, L. S. Espécies de peixe para a piscicultura. In: RODRIGUEZ, A. P. O.; LIMA, A. F.; ALVES, A. L.; ROSA, D. K.; TORATI, L. S.; DOS SANTOS, V. R. V. (Ed.). **Piscicultura de água doce, multiplicando conhecimentos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura; Brasília: Embrapa, 2013. p. 29-70.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2012**. Brasília: Ministério da pesca e aquicultura, 2012. 128p.

MPA. **Censo aquícola nacional 2008**. Brasília: Ministério da pesca e aquicultura, 2013. 318p.

MPA. **Potencial brasileiro de produção de pescados**. Brasília: Ministério da Pesca e Aquicultura, 2014. Disponível em: <http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/potencial-brasileiro>. Acesso em: 10 jan. 2015.

MULLIS, K. B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Scientific American**, v.262, p.36-42, 1990.

OLIVEIRA, A. B. K. O rio Tietê: O processo histórico e sua importância para São Paulo. In: SIMPÓSIO MINEIRO DE GEOGRAFIA, 1., Alfenas. **Anais**. Alfenas: UFA, 2014. p. 271-285.

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

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JR, D. P.; MOREIRA, H. L. M.; SIEWERDT, F.; LOPERA-BARRERO, N. M.; MANGOLIN, C. A.; VARGAS, L. Microsatellite Analysis of the Parental Contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the Production of Offspring in the Semi-natural System of Reproduction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.389-396, 2010.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; LUZ, R. K.; MEURER, S.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. O. Influência do fotoperíodo no crescimento e sobrevivência de pós-larvas de Piracanjuba *Brycon orbignyanus* (Valenciennes, 1849) (Osteichthyes, Characidae). **Acta Scientiarum Animal Sciences**, v.24, p.439-443, 2002.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; LOPES, C. A.; ÁVILA-SIMAS, S.; GARCIA, J. R. E.; ZANIBONI-FILHO, E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning?. **Natural Science**, v.5, p.1-6, 2013.

RIBOLLI, J. **Contribuição individual de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) em fertilizações com pool de sêmen.** 2007. p.42. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Brasília: Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 8-286.

SANCHES, A.; GALETTI jr, P. M. Microsatellites loci isolated in the fresh water fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.1045-1046, 2006.

SÁ, M. V.; FRACALOSSO, D. M. Exigência protéica e relação energia/proteína para alevinos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, p.1-10, 2002.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira, M. G.; Henry, R.; Jorcin, A. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas.** São Carlos: RiMA, 2006. p.275-284.

SOUZA, W. L. **Impacto ambiental de hidrelétricas: uma análise comparativa de duas abordagens.** 2000. 160p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

WHITE, R. J.; KARR, J. R.; NEHLSSEN, W. Better roles for fish stocking and aquatic resource management. In: SCHRAMM, Jr., H. L.; PIPER, R. G. (Ed.). **Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems.** Bethesda: American Fisheries Society, 1995. p.527-547.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais.** Brasília: CODEVASF, 1989. 225p.

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

ZANIBONI-FILHO, E.; WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.31, p.367-373, 2007.

## **OBJETIVOS GERAIS**

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, em diferentes acasalamentos, na contribuição genética e reprodutiva de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*).



## **Contribuição genética e reprodutiva de piracanjuba submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão**

**Resumo** - Objetivando-se avaliar a influência dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, em diferentes acasalamentos (uma fêmea para três machos e duas fêmeas para seis machos), na contribuição genética e reprodutiva de piracanjuba (*Brycon orbignyianus*), foram amostradas 90 larvas por tratamento e fragmentos da nadadeira caudal dos 24 reprodutores, avaliando-se a variabilidade genética pela técnica de PCR (*Polymerase chain reaction*) a partir da amplificação de oito *primers* microssatélites heterólogos. As frequências alélicas e a variabilidade genética, através dos índices de heterozigosidade esperada e Shannon, foram mantidas em todos os tratamentos. As análises de contribuição parental apresentaram resultados mais homogêneos para o sistema por extrusão a partir do aumento do número de machos utilizados, já que ficaram evidenciadas relações de dominância reprodutiva entre os machos no sistema seminatural. Por outro lado, a menor carga estressante resultou em melhores taxas de fertilização, eclosão e mortalidade para o sistema seminatural. Dessa forma, quando se opta pela extrusão na produção de alevinos dessa espécie destinados ao repovoamento, é indicado o aumento do número de machos utilizados. Pelo contrário, em sistema seminatural a redução deste número diminui as relações de dominância, além de permitir a melhoria dos índices reprodutivos e manutenção do estoque de reprodutores.

Termos para indexação: *Brycon orbignyianus*, repovoamento, variabilidade genética

## **Genetic and reproductive contribution of Piracanjuba subjected to semi-natural reproduction systems and extrusion**

**Abstract** - With the purpose of evaluating the influence of the extrusion or semi-natural reproductive systems in different breedings (a female to three males and two females to six males), on genetic and reproductive contribution of piracanjuba (*Brycon orbignyianus*), 90 larvae and caudal fin fragments of 24 breeders were sampled by treatment, assessing the

genetic variability by PCR (polymerase chain reaction) from amplification of eight microsatellite heterologous primers. Allele frequencies and genetic variability through the expected heterozygosity and Shannon rates were maintained in all treatments. Parental contribution analysis showed more homogeneous results for the extrusion system by increasing the number of males used, since reproductive dominance relationships were observed between the males in the semi-natural system. On the other hand, the lowest stressed load resulted in better fertilization, hatching and mortality rates for the semi-natural system. Thus, when choosing the extrusion in alevin production for restocking of this species, increasing the number of males used is indicated. On the contrary, in semi-natural system, the reduction of males decreases the dominance relationships, and allows improving reproductive performance and breeders stock maintenance.

Index terms: *Bricon orbignyianus*, restocking, genetic variability

### **Introdução**

O Brasil é detentor da maior reserva de água doce do planeta, característica essa que o elege como o país de maior potencial produtivo de energia hidrelétrica. Segundo dados do Ministério de Minas e Energia (MME), em 2014, já existiam 1.107 unidades geradoras instaladas, que produziram cerca de 75% de toda a energia elétrica consumida, contudo, estima-se que somente 30% do potencial ainda é utilizado, sendo necessária a instalação de novas unidades produtoras.

A instalação de qualquer unidade de produção de energia hidrelétrica representa um enorme impacto ambiental, sendo apontado como um dos principais fatores da notável diminuição dos estoques e desaparecimento de diversas espécies de peixes dos rios. Segundo Souza (2000), a diminuição da correnteza do rio, causada pela construção das barragens, altera diretamente a dinâmica do ambiente aquático, favorecendo a deposição dos sedimentos no ambiente lótico, além de modificar a temperatura do rio, criando-se condições anóxicas

que favorecem a eutrofização. Por outro lado as barragens também representam barreiras físicas para as espécies aquáticas, constituindo um fator de isolamento das populações antes em contato, além de impedir ou dificultar a piracema da maioria das espécies de peixe.

Para amenizar os impactos, uma série de medidas de compensação ambiental são utilizadas, sendo a principal delas o estabelecimento de programas de repovoamento, que consiste no restabelecimento de populações naturais a partir da liberação de alevinos (Lopera-Barrero et al., 2008a). Contudo, a produção de alevinos para o repovoamento deve ser realizada com cautela, pois pode representar riscos genéticos e reprodutivos às populações selvagens, em função da comum perda de variabilidade genética em estoques mantidos em cativeiro, pelo acasalamento de indivíduos geneticamente similares ou pelo inadequado manejo reprodutivo (Aho et al., 2006). A redução das frequências alélicas afeta os níveis de variabilidade genética de uma população, favorecendo o aparecimento da endogamia que conseqüentemente reduz a adaptabilidade da prole nos ambientes naturais (Lopera-Barrero et al., 2008a).

Atualmente a maneira mais difundida para avaliação da variabilidade genética, são os marcadores moleculares, sendo os microssatélites (pequenas sequências de um a oito nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem*) os mais utilizados em estudos genéticos de peixes. Esses marcadores fornecem informações essenciais para a formulação de estratégias de conservação dos ambientes impactados e para tomada de decisões na gestão de uma piscicultura (Abdul-Muneer, 2014).

Aliado às análises de diversidade genética, a melhoria dos processos reprodutivos também deve ser realizada, pois influencia diretamente na perda de variabilidade genética. A técnica de desova por extrusão consiste na retirada dos ovócitos e do sêmen dos reprodutores, através de uma pressão abdominal, induzindo-se a saída destes pela papila urogenital, ambos os gametas misturados na presença de água e os ovos incubados. No sistema seminatural,

após a indução hormonal, machos e fêmeas são colocados em um tanque com circulação forçada de água, onde a desova e a fecundação acontecerão aleatoriamente. Alguns trabalhos têm demonstrado a existência de menor mortalidade, maior fertilização e maior conservação da variabilidade genética quando é utilizado o sistema reprodutivo seminatural em comparação com o sistema por extrusão (Reynalte-Tataje et al., 2013; Povh et al., 2010; Lopera-Barrero et al., 2014).

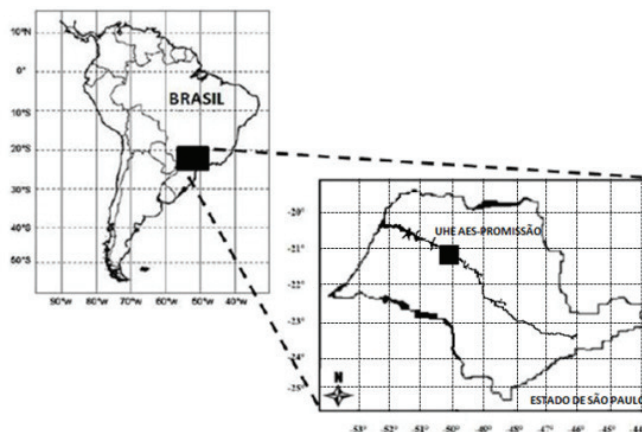
A piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), é uma espécie migratória nativa da bacia do Prata, e atualmente está na lista de espécies que correm perigo de extinção (Rosa & Lima, 2008). Esse peixe é muito apreciado por pescadores amadores e profissionais, pelo seu alto valor comercial e pela pigmentação avermelhada característica de seu filé, consequência do acúmulo de compostos carotenóides no músculo. (Zaniboni-Filho et al., 2006; Agostinho et al., 2005).

O objetivo desse estudo foi avaliar a influência dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, em diferentes acasalamentos, na contribuição genética e reprodutiva de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), analisando ainda os parâmetros qualitativos seminais dos machos utilizados no sistema reprodutivo por extrusão.

### **Material e métodos**

Este trabalho foi desenvolvido na Estação de hidrobiologia AES Tietê (Figura 1) localizada na cidade de Promissão-SP, e no laboratório de biologia molecular do núcleo de pesquisa Peixegen/DZO da Universidade Estadual de Maringá (UEM), entre novembro de 2013 a novembro de 2014.

As metodologias empregadas durante esse projeto atenderam aos princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal, e foram aprovados pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL nº17156.2012.50).



**Figura 1.** Localização da estação de hidrobiologia AES Tietê Promissão – SP.

A partir do estoque de reprodutores já existentes na Estação de hidrobiologia AES Tietê foram selecionados 6 fêmeas e 18 machos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*). Os animais foram escolhidos a partir de seus escores corporais e condições reprodutivas, como o diâmetro abdominal e coloração da papila urogenital. Uma biometria inicial foi realizada, e com o peso individual (peso médio de 935g para os machos e 915g para as fêmeas) calculou-se a dose hormonal. Para a indução à reprodução foi utilizado extrato de hipófise de carpa, sendo que as fêmeas receberam  $5,5 \text{ mg kg}^{-1}$ , divididos em duas aplicações, 10% do total na primeira dose e 12 h depois os 90% restantes, e os machos  $2,5 \text{ mg kg}^{-1}$  em dose única, concomitantemente com a segunda aplicação da fêmea.

No sistema reprodutivo por extrusão, os acasalamentos realizados foram de uma fêmea para um *pool* de sêmen de três machos e duas fêmeas para *pool* de sêmen de seis machos. Os reprodutores desse sistema foram mantidos separadamente em tanques de concreto de  $2\text{m}^3$ , e aproximadamente 6 horas depois (160 horas/grau, com temperatura média da água durante o experimento de  $27,7^\circ\text{C}$ ), capturados, contidos com o auxílio de uma toalha, secando-se a papila urogenital para evitar contaminações por fezes, água e urina, e por fim, realizou-se uma massagem abdominal, pressionando-se no sentido encéfalo-caudal para liberação dos ovócitos nas fêmeas ou esperma nos machos. Em seguida, os gametas foram misturados na presença de água (10 vezes o volume de ovócitos) para dar início à fertilização e os ovos transferidos para

uma incubadora. Paralelamente à extrusão, dos machos, foram realizadas amostragens de sêmen para análises e criopreservação.

No sistema reprodutivo seminatural, os acasalamentos realizados foram de uma fêmea para três machos e duas fêmeas para seis machos. Após a indução, as matrizes e reprodutores, foram alojados em um tanque circular, de aproximadamente 4m de diâmetro e 1,5m de profundidade, com sistema de circulação forçada de água, a fim de simular condições ambientais satisfatórias, onde ocorreu a fertilização direta e aleatória pelos machos no momento da desova. A desova ocorreu após 160 horas/grau, e o escoamento da água na porção central mediante um cano permitiu o direcionamento dos ovos para uma estação coletora, onde ficaram vertidos em uma incubadora cilindro-cônica.

Foram amostradas nadadeiras (fragmento de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup>) dos 24 reprodutores utilizados e noventa larvas de cada um dos tratamentos (totalizando 360 larvas). As amostras foram conservadas em micro tubos de 1,5 mL contendo álcool etílico 70%, para a posterior extração e amplificação do DNA e análise da variabilidade genética.

A taxa de fecundação foi calculada pela contagem, em cada tratamento, da quantidade de ovos viáveis, em 200 ovos, após seis horas de fecundação, segundo recomendações de Godinho (2007), e a taxa de eclosão da mesma forma após 12 horas da fecundação.

A eclosão das larvas ocorreu aproximadamente 12 horas após a fecundação, e com cerca de 36 horas de vida, quando a reserva vitelínica se esgotou e as larvas começaram a abrir a boca, foram oferecidas larvas de curimba (*Prochilodus lineatus*) recém eclodidas para evitar o canibalismo. A temperatura e oxigênio dissolvido foram medidos durante todo o procedimento, e a porcentagem de mortalidade dos reprodutores utilizados definida um dia após a reprodução nos dois processos.

### **Análise dos parâmetros seminais**

Os procedimentos para análises seminais foram realizados de acordo com Sørensen (1979), adaptados para peixes. Devido ao grande volume ejaculado pela espécie e ao estresse causado aos reprodutores no momento da extrusão, padronizou-se a coleta de 2mL de sêmen de cada macho para análises e criopreservação. A coleta foi realizada em seringas plásticas de 3mL, devidamente identificadas, avaliando-se imediatamente a motilidade espermática progressiva (escore de 0 a 100%), vigor espermático (escore de 0 a 5 pontos), pH (papel de tornassol) e cor (1 a 3 pontos, sendo que 1 representa a coloração branco cremoso, 2 branco leitoso e 3 branco aquoso), consecutivamente realizou-se uma diluição em formol salina tamponado de 1:500 e dois esfregaços, para análises de concentração (câmara de Neubauer) e morfologia espermática. A coloração do sêmen para análise de morfologia espermática foi adaptada pelos autores, já que a metodologia tradicional não possuiu resultados satisfatórios para essa espécie. Para isso, os esfregaços foram imersos em álcool etílico absoluto por 10 minutos e corados com corante Rosa de Bengala por mais 10 minutos, lavando-se em água corrente para retirada do excesso, tendo sido contados 200 espermatozoides por esfregaço.

### **Extração e amplificação de DNA**

As análises de variabilidade genética foram realizadas no laboratório de biologia molecular do núcleo de pesquisa Peixegen/DZO da Universidade Estadual de Maringá. O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo de extração contendo NaCl descrito por Lopera-Barrero et al. (2008b), mensurando-se posteriormente, a concentração total de DNA, com o uso de um espectrofotômetro PICODROP® (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom), padronizando-se as amostras através de diluição para uma concentração final de 10ng/μL. A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), com a eletroforese conduzida em tampão TBE 0,5X (250mM Tris-HCl, 30mM ácido bórico e 41,5mM EDTA) por uma hora a 70V. O gel foi

visualizado em aparelho transluminador com luz ultravioleta, e a imagem fotografada com a utilização do programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

A amplificação foi realizada para um volume final de reação de 15 $\mu$ L, utilizando-se 1X do tampão Tris-KCl, 2,0mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 $\mu$ M de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 0,4mM de cada dNTP, uma unidade de Platinum *Taq* DNA Polimerase e 20ng de DNA. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida realizou-se 30 ciclos de 30 segundos de desnaturação a 94°C; 30 segundos de anelamento (temperatura variável para cada *primer*); e um minuto de extensão a 72°C; por fim realizou-se uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram avaliados 16 *loci* microssatélites com a utilização de *primers* heterólogos, sete descritos por Barroso et al. (2003) para *Brycon opalinus* (BoM1, BoM2, BoM5, BoM6, BoM7, BoM12 e BoM13), outros sete por Sanches & Galetti Jr (2006) para *Brycon hilarii* (Bh5, Bh6, Bh8, Bh13, Bh15, Bh16 e Bh17) e dois por Matsumoto & Hilsdorf (2009) para *Brycon insignis* (Bc-6 e Bc48-10), sendo suas respectivas unidades repetitivas e temperaturas de anelamento (°C) apresentados na Tabela 1. As reações foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA).

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

### **Análises estatísticas**



O tipo e o tamanho dos alelos observados nas populações foram organizados em matrizes de dados, e submetidas aos programas computacionais. A frequência alélica, o número de alelos, a heterozigose observada e esperada, o índice de fixação (*Fis*) de Wright e o equilíbrio de Hardy Weinberg foram calculados para cada *locus* utilizando-se o programa GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995). Para o índice de Shannon utilizou-se o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). Os valores de diferenciação genética (*Fst*) entre os parentais e a progênie foram estimados pelo método de Weir & Cockerham (1984) usando-se o programa FSTAT 2.9.3. A AMOVA foi obtida com o programa Arlequim 3.0 (Excoffier et al., 2005), enquanto a presença de alelos nulos foi testada pelo programa Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004). Por fim, a determinação da paternidade da progênie foi realizada através do programa PAPA 2,0 (Duchesne et al., 2002).

Os dados de heterozigosidade esperada e observada, *Fis* e índice de Shannon seguiram a distribuição normal, e o teste de médias foi realizado pelo programa estatístico R, utilizando-se Tukey a 5% de significância.

## **Resultados e discussão**

### **Parâmetros físicos e químicos da água**

Os parâmetros físicos e químicos da água se mantiveram estáveis durante toda a pesquisa, com pequenas variações de temperatura nos períodos noturnos, não influenciando na quantidade de horas necessárias para a desova das fêmeas entre os tratamentos, sendo que os valores médios de temperatura e oxigênio dissolvido para o tanque de armazenamento (utilizado para a estocagem dos reprodutores do sistema reprodutivo por extrusão até a desova) foram de  $27,35 \pm 0,49^\circ\text{C}$  e  $27,35 \pm 0,49 \text{mgL}^{-1}$ , para o tanque de reprodução seminatural,  $26,66 \pm 0,25^\circ\text{C}$  e  $6,11 \pm 1,00 \text{mgL}^{-1}$ , e para as incubadoras  $27,35 \pm 0,21^\circ\text{C}$  e  $7,17 \pm 0,21 \text{mgL}^{-1}$  respectivamente.

## Diversidade genética

Dos 16 *primers* testados, oito possuíram amplificação nítida, com alta especificidade, BoM5, BoM13, Bh5, Bh6, Bh8, Bh13, Bh16 e Bc48-10, e juntos produziram um total de 30 alelos, variando de três a quatro alelos por *locus*.

O número, tamanho e frequência dos alelos encontrados para os parentais e a progênie de cada tratamento, são apresentados na Tabela 2, onde observou-se a preservação das frequências alélicas em todos os tratamentos, já que 75% dos alelos de maior frequência nos reprodutores, também os foram na prole, não tendo sido observada a presença de alelos com baixa ou alta frequência, e portanto, embora poucos, os reprodutores utilizados representaram eficientemente a população geral.

Os índices de heterozigosidade, observada e esperada, são fundamentais para a análise dos níveis de endogamia de uma população, já que representam o seu grau de diversidade, contudo, muitos autores citam as vantagens da utilização da heterozigosidade esperada para a avaliação desse parâmetro, já que é uma previsão baseada nas frequências alélicas conhecidas, oriundas de amostras individuais já analisadas (McManus et al., 2011). Os valores de heterozigosidade observada, esperada, índice de Shannon e equilíbrio de Hardy-Weinberg são apresentados na Tabela 3.

O maior e o menor valor de heterozigosidade observada foram encontrados nos reprodutores do sistema seminatural 1x3 (0,5938) e na progênie do mesmo sistema (0,4500), já para a heterozigosidade esperada observou-se o aumento dos valores de todas as proles em relação a seus pais. Esse mesmo comportamento foi observado para o índice de Shannon, baseado na abundância proporcional das espécies, e considerado uma medida não paramétrica de heterogeneidade (Oliveira & Tejerina-Garro, 2010), já que seus valores variaram de 0,83 nos reprodutores do sistema seminatural 1x3, até 1,877 na progênie do sistema por extrusão 1x3, com as progênies possuindo sempre maiores valores do que seus parentais. Lopera-

Barrero et al. (2010) observaram resultados similares, com o aumento dos valores de índice de Shannon e heterozigosidade esperada da progênie em relação a seus parentais, em trabalho realizado com acasalamentos individuais, uma fêmea para um macho, de *Brycon orbignyanus* no sistema seminatural. Os resultados desses parâmetros indicaram a manutenção da variabilidade genética em todos os tratamentos

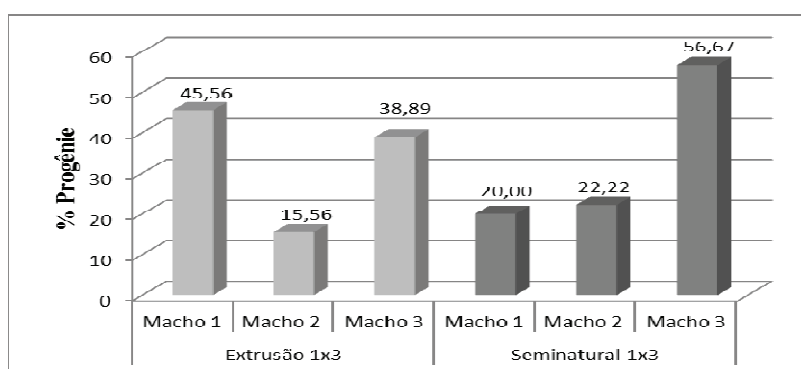
O desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P < 0,05$ ) encontrado para os reprodutores do sistema por extrusão 1x3 (Tabela 3), pode ser resultado da presença de alelos nulos para dois *primers*, BoM5 e BoM13, já que, segundo Pritchard et al. (2007), a presença desses alelos interfere diretamente nesse parâmetro. Chapuis & Estoup (2007) relataram que a presença de alelos nulos está relacionada com alterações na região de ligação dos *primers* iniciadores, impedindo seu anelamento durante a PCR, aumentando a detecção errônea da quantidade de genótipos homozigóticos, e que o aparecimento desses alelos aumenta com a utilização de *primers* heterólogos. Por outro lado Romana-Eguia et al. (2004) citaram que desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg em estoques mantidos em cativeiro podem ser ocasionados pela eventual deriva genética desses animais, que isolaram-se e diferenciaram-se nesses ambientes, em um efeito conhecido como Wahlund, que tende a ampliar-se ao passar das gerações. Por fim, outra possibilidade seria o aumento dos níveis endogâmicos pela não amostragem aleatória dos reprodutores, o que não foi observado nesta pesquisa.

A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que os resultados permitiram determinar objetivamente a variabilidade genética dentro de cada tratamento (Tabela 4), identificando-se uma baixa diferenciação genética entre a progênie e seus parentais, já que, com média de 96,77% a maior fonte de variação esteve dentro dos tratamentos. Resultado comprovado pelo índice de diferenciação genética ( $F_{st}$ ), que também demonstrou baixa diferenciação genética da progênie com relação a seus parentais, além de evidenciar a manutenção da variabilidade genética em todos os tratamentos.

## Contribuição Parental

Através da determinação de paternidade, observaram-se contribuições parentais desiguais em todos os tratamentos, mas no sistema por extrusão, a participação de cada macho se distribuiu mais uniformemente, enquanto que no sistema seminatural as relações de dominância de alguns machos sobre outros, interferiu para que os dominantes deixassem um maior número de filhos.

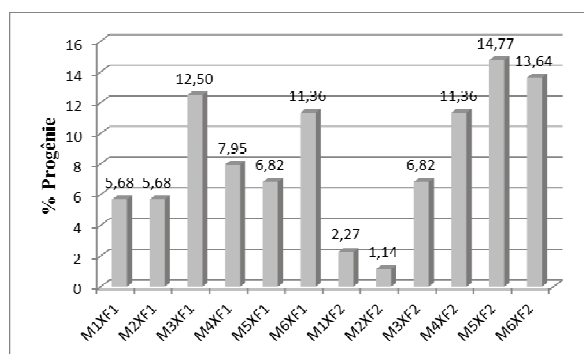
Em um cenário onde as relações de dominância entre machos fossem inexistentes, em acasalamentos 1x3, o esperado seria que cada macho contribuísse com 33,33% da progênie, porém neste trabalho, no tratamento extrusão 1x3 dois machos (1 e 3) contribuíram com 84,45% da progênie (Figura 2), enquanto que no sistema seminatural, apenas um macho (3), contribuiu com mais da metade da progênie (56,67%).



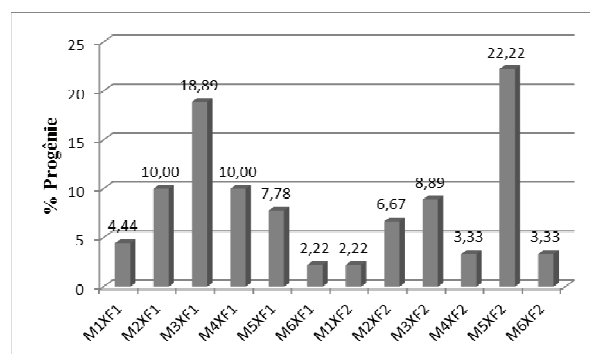
**Figura 2.** Contribuição dos machos na progênie dos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural 1x3.

Nos tratamentos com duas fêmeas para seis machos, as fêmeas contribuíram uniformemente para a formação da progênie, 50% para cada na extrusão, e 53,33% para uma e 46,67% para outra no seminatural. Por outro lado todos os machos foram capazes de fecundar as fêmeas, mas a contribuição, assim como nos acasalamentos 1x3, diferiram entre os tratamentos, distribuindo-se mais homogeneamente na extrusão, e com dominância de poucos machos (M3 e M5) no sistema seminatural (Figuras 3 e 4).

A contribuição desigual entre os machos, principalmente no sistema seminatural pode ser explicada pela dominância no momento da fecundação da fêmea, em que alguns machos por serem mais agressivos não permitem a aproximação dos outros. Povh et al. (2010), assim como Ribeiro et al. (2010), observaram essas mesmas relações para *Piaractus mesopotamicus* no sistema seminatural, mas que esse fato não influenciou a variabilidade genética da prole, obtendo os melhores resultados para esse sistema quando comparado à extrusão. Por outro lado, Ortega-Villaizan Romo et al. (2005) constataram que o sistema seminatural para espécies de linguado promoveu a redução da variabilidade genética, devido, principalmente à dominância, proporcionando a redução do número efetivo de reprodutores, e que apenas um macho, de um total de seis, foi responsável por 99% da progênie.



**Figura 3.** Composição das famílias formadas no sistema reprodutivo por extrusão 2x6.



**Figura 4.** Composição das famílias formadas no sistema reprodutivo seminatural 2x6.

O sistema por extrusão também não está livre da dominância do sêmen de alguns machos, Riboli & Zaniboni-Filho (2009), observaram uma importante redução no número efetivo de reprodutores em acasalamentos de jundiá (*Rhamdia quelen*) na proporção de uma fêmea para um *pool* de sêmen de quatro machos, em relação aos acasalamentos individuais, e que isso poderia estar relacionado com a qualidade do sêmen de cada macho, mas também pelo sistema e quantidade de reprodutores utilizados. Resultados similares foram encontrados neste trabalho, em que a contribuição parental utilizando-se um *pool* de sêmen nos dois acasalamentos (1x3 e 2x6) permitiu dominância de alguns machos, justamente os que

possuíram os melhores parâmetros seminais, principalmente concentração e vigor espermático (Tabela 5). Um exemplo foi o Macho 2 do tratamento extrusão 1x3, que possuiu piores valores de vigor e concentração espermática, e talvez por isso tenha contribuído com uma menor proporção da progênie formada, necessitando de novas pesquisas tratando-se da qualidade seminal e sua influência na contribuição parental em tratamentos com *pool* de sêmen.

Embora os parâmetros de qualidade seminal avaliados tenham variado entre os machos (Tabela 5), suas médias estavam de acordo com o encontrado por outros autores que também trabalharam com *Brycon orbignyanus*, evidenciando a boa capacidade reprodutiva dos animais selecionados. Paulino et al. (2011) e Murgas et al. (2003), encontraram valores médios de motilidade espermática progressiva (97,77%), pH (8), cor do ejaculado (branco aquoso) e índices de normalidade (36±4%) similares ao desta pesquisa. Por outro lado os valores de concentração espermática encontrados na literatura variaram significativamente, mas isso pode ser resultado da grande variação deste parâmetro em decorrência da perda de variabilidade genética nos estoques, idade dos reprodutores, sazonalidade, técnica utilizada para coleta do sêmen e diversos outros fatores.

A utilização de um número maior de machos no sistema por extrusão é um fator que interferiu positivamente para esse tratamento, uma vez que Lopera-Barrero et al. (2014) encontraram, também para *Brycon orbignyanus*, em acasalamentos 1x1 nos mesmos dois sistemas, maior variabilidade genética para a prole do sistema seminatural.

Esses resultados levam a crer, que a resposta, quanto aos índices de variabilidade genética e contribuição na progênie de peixes utilizando-se os sistemas seminatural e por extrusão sejam variáveis de acordo com a proporção, número e qualidade do sêmen dos reprodutores utilizados, assim como o comportamento reprodutivo da espécie trabalhada.

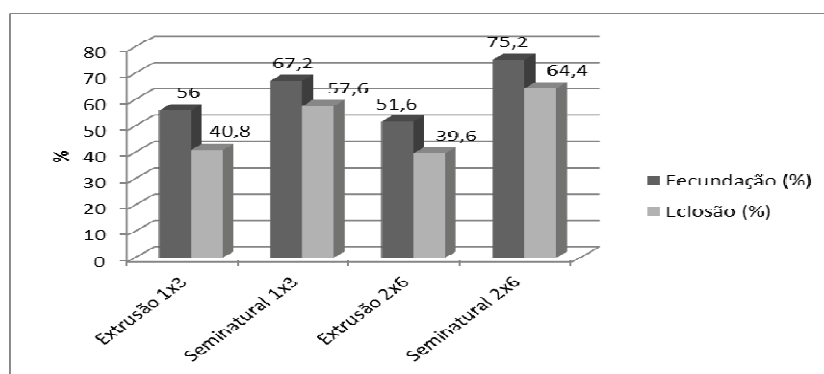
Em pisciculturas voltadas à produção de alevinos destinados ao repovoamento, espera-se a homogeneidade no repasse genético, já que a seleção artificial de indivíduos que irão participar dos processos reprodutivos favorece o aparecimento da endogamia. Desta forma quanto aos resultados de contribuição parental, o sistema reprodutivo por extrusão foi melhor, permitindo a contribuição mais homogênea dos machos em comparação ao tratamento com igual número de reprodutores no sistema seminatural. Porém, para que esse resultado seja alcançado, é imprescindível a análise da qualidade seminal dos machos que irão compor o *pool* de sêmen para a extrusão, a fim de que todos sejam efetivos e participem em iguais condições da fecundação.

Embora não tenham ocorrido diferenças estatísticas nos parâmetros de diversidade genética entre os dois sistemas reprodutivos, muitos autores citam as vantagens da utilização do sistema seminatural em relação à extrusão. Reynalte-Tataje et al. (2013) observaram aumento nas taxas de desova, fertilização, eclosão e menor taxa de mortalidade em reprodutores *Brycon orbignyanus* utilizados em sistema seminatural. Fatores esses que estão intimamente relacionados com o estresse do manuseio durante os procedimentos, principalmente em espécies sensíveis como a Piracanjuba.

A mortalidade dos animais pós processos reprodutivos, é um ponto crítico, e deve ser tratado com cuidado, ainda mais quando a espécie trabalhada corre o risco de extinção, sendo a formação de um novo estoque de reprodutores muito difícil. Nesta pesquisa foram observadas maiores taxas de mortalidade dos reprodutores utilizados no sistema por extrusão, 44,44% para os machos e 100% para as fêmeas, enquanto que para os animais do sistema seminatural essa taxa foi de apenas 22,22% para machos e 33,33% para as fêmeas. As lesões causadas pela massagem abdominal, como a perda de escamas são inevitáveis, tendo-se como resultado a formação de um ambiente propício para proliferação de fungos e bactérias, levando o animal à morte. Baldisserotto & Gomes (2010) encontraram taxas de mortalidades

similares às encontradas nesta pesquisa com até 100% de mortalidade dos reprodutores utilizados em sistemas por extrusão. Reynalte-Tataje et al. (2013), também observaram que as taxas de sobrevivência dos indivíduos aumentou com a realização da desova seminatural, já que obtiveram cerca de 80% de mortalidade de machos reprodutores e 100% de fêmeas no sistema por extrusão.

As taxas de fecundação e eclosão foram maiores para os reprodutores do sistema seminatural, com melhores resultados encontrados para o tratamento seminatural 2x6, 75,2% de fecundação e 64,4% de eclosão, e os piores para o sistema por extrusão 1x3, 56% de fecundação e 40,8% de eclosão (Figura 5). Esses dados corroboram os obtidos por Reynalte-Tataje et al. (2013), com média de taxa de fertilização de 98,7% para o sistema seminatural e apenas 14,7% para o sistema por extrusão, e Sirol & Britto (2006) que também encontraram valores similares em trabalho com *Piaractus mesopotamicus*.



**Figura 5.** Taxa de fecundação e eclosão de reprodutores *Brycon orbignyana* submetidos aos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural em diferentes acasalamentos.

### Conclusão

Os resultados obtidos por esse trabalho demonstraram a manutenção da variabilidade genética da progênie de *Brycon orbignyana* nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, em acasalamentos de uma fêmea para três machos e duas fêmeas para seis machos, existindo, no entanto, relações de dominância reprodutiva nos dois sistemas. Dominância essa, que influenciou na participação desigual dos machos, sendo que os



tratamentos por extrusão possuíram contribuição mais homogênea. Por outro lado melhores taxas de fertilização, eclosão e mortalidade dos reprodutores foram observadas para o sistema seminatural, resultado associado às lesões causadas pela massagem abdominal na extrusão. Desta forma é indicada a redução da proporção macho x fêmea na produção de alevinos de piracanjuba no sistema seminatural em pisciculturas voltadas ao repovoamento, a fim de reduzir-se ao máximo o comportamento de dominância, enquanto que, em sistemas por extrusão, o aumento dessa proporção favorece uma contribuição parental mais homogênea, estando condicionado à análise de qualidade seminal do macho para comprovação de sua efetiva participação.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem à empresa de geração de energia AES-Tietê pelo apoio financeiro e estrutura física cedida, e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida durante a realização desta pesquisa.

### **Referências**

- ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**, v.2014, p.1-11, 2014.
- AGOSTINHO, A. A., THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p.70-78, 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.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. Santa Maria: Editora da UFSM, 2010. 608p.
- 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. Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) Characiforme, Characidae, Bryconidae). **Molecular Ecology Notes**, v.3, p.297-298, 2003.
- CHAPUIS, M.; ESTOUP, A. Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p. 621–631, 2007.

DUCHESNE, P.; GODBOUT, M. H.; BERNATCHEZ, L. PAPA (Package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.191-193, 2002.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution Bioinformatics Online**, v.1, p.47-50, 2005.

GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista brasileira de reprodução animal**, v.31, p.351-360, 2007.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L. D.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; MANGOLIN, C. A.; BOSO, K. M. O.; GUALDA, T. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience Journal**, v. 24, p.86-93, 2008a.

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

LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; MANGOLIN, C. A. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, p.184-191, 2010.

LOPERA-BARRERO, N. M.; ALVAREZ, C. A. R.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina: Ciências agrárias**, v.35, p.541-554, 2014.

MACMANUS, C.; PAIVA, S.; CORRÊA, P. S.; SEIXAS, L.; DE MELO, C. B. **Estatísticas para descrever genética de populações**. Brasília: Informação genético-sanitária da pecuária brasileira, 2011. p.50.

MATSUMOTO, C. K.; HILSDORF A. W. S. Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p.395-402, 2009.

MME. **Boletim de monitoramento do sistema elétrico brasileiro**. Brasília: Ministério de Minas e Energia, 2014. p.36.

MURGAS, L. D. S.; FRANCISCATTO, R. T.; SANTOS, A. G. O. Avaliação Espermiática Pós-Descongelamento em Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*, Valenciennes, 1849). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1810-1814, 2003.

OLIVEIRA, M. P.; TEJERINA-GARRO, F. L. Distribuição e estrutura das assembléias de peixes em um rio sob influência antropogênica, localizado no alto da bacia do rio Paraná – brasil central. **Boletim do Instituto da Pesca**, v. 36, p.185-195, 2010.

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

PAULINO, M. S.; SAMPAIO, M.; MILLIORINI, A. B.; MURGAS, L. D. S.; LIMA, V. O. F. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, v.37, p.39-45, 2011.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JR, D. P.; MOREIRA, H. L. M.; SIEWERDT, F.; LOPERA-BARRERO, N. M.; MANGOLIN, C. A.; VARGAS, L. Microsatellite Analysis of the Parental Contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the Production of Offspring in the Semi-natural System of Reproduction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.389-396, 2010.

PRITCHARD, V. L.; JONES, K.; COWLEY, D. E. Genetic Diversity within Fragmented Cutthroat Trout Populations. **Transactions of the American Fisheries Society**, v.136, p.606–623, 2007.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; LOPES, C. A.; ÁVILA-SIMAS, S.; GARCIA, J. R. E.; ZANIBONI-FILHO, E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning?. **Natural Science**, v.5, p.1-6, 2013.

RIBEIRO, R. P.; STREIT JR, D. P.; POVH, J. A.; SIROL, R. N.; URIBE, L.; VARGAS, L. D. M.; LOPERA-BARRERO, N. M.; GOMES, P.; DIGMAYER, M. Modelo de manejo e monitoramento para programas de repovoamento de espécies de peixes nativas migradoras. In: Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, Dourados. Anais. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste, 2010.

RIBOLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p.629-634, 2009.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BAISAO, Z. U.; TANIGUCHI, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. **Aquaculture**, v.236, p.131-150, 2004.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. T. Peixes. In: MACHADO, A. B. M.; DRUMMOND, G. M.; PAGLIA, A. P. (Ed.). **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. p. 8-286.

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v.6, p.1045-1046, 2006.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: Nogueira, M. G.; Henry, R.; Jorcin, A. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RiMA, 2006. p.275-284.

SORENSEN, A. M. **Animal reproduction; principles and practices**. New York: McGraw Hill, 1979. 496p.

SOUZA, W. L. **Impacto ambiental de hidrelétricas: uma análise comparativa de duas abordagens**. 2000. 160p. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535–538, 2004.

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.

WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.

ZANIBONI-FILHO, E.; REYNALTE-TATAJE, E. D.; WEIGARTNER, M. Potencialidad del género *Brycon* em la piscicultura brasileña. **Revista Colombiana de ciências pecuárias**, v.19, p.233-240, 2006.

### Lista de Tabelas

**Tabela 1.** Características dos *loci* microssatélites estudados para a variabilidade genética na progênie de *Brycon orbignyana* nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural em diferentes acasalamentos.

<i>Locus</i>	Repetição	TA (°C)	Sequência (5'-3')
BoM5	(AC) <sub>4</sub> T(AC) <sub>10</sub> AT(AC) <sub>5</sub>	53	F: CGACCACAATAGGATTAGGG R: CTGGAGTTTGTGTGTGGA
BoM13	(CT) <sub>11</sub>	47	F: CATTTCCTCAGTCCTTTTCAGC R: CCCACTTAGGGTTCGCAC
Bh5	(CA) <sub>13</sub>	56	F: CTTCCACTCATAACGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG
Bh6	(CA) <sub>14</sub>	56	F: GCGTTGCGTGTGTATGTTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT
Bh8	(GAT) <sub>5</sub>	56	F: CCATGGCTCAACACAGATAT R: TGTACGAATCCTGAAATGCT
Bh13	(AT) <sub>7</sub>	56	F: AGCAATTTAAGCAAGTGAAG R: GCGTCGGAGCAGTAGTTATA
Bh16	(TAA) <sub>8</sub>	56	F: CCTCCAATGAAAACAGTGCG R: ACGACTTAGCCACCCACCCT
Bc48 -10	(CA)	65	F: GTTCCACCTATTGCTGACAC R: GAAAATACTACTCTACGGGGAC

**Tabela 2.** Número, tamanho e alelo de maior frequência nos parentais e na progênie de *Brycon orbignyanus* nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural em diferentes acasalamentos.

Locus	N	Tamanho (pb)	Extrusão 1x3		Seminatural 1x3		Extrusão 2x6		Seminatural 2x6	
			Parentais	Progênie	Parentais	Progênie	Parentais	Progênie	Parentais	Progênie
BoM5	4	107-122	117 (0,667)	112 (0,500)	112 (0,250)	112 (0,458)	117 (0,562)	112 (0,410)	112 (0,375)	112 (0,331)
BoM13	4	140-160	150 (0,500)	160 (0,339)	145 (0,875)	150 (0,522)	145 (0,562)	150 (0,352)	145 (0,750)	145 (0,420)
Bh5	3	205-225	215 (0,875)	215 (0,450)	215 (0,875)	215 (0,506)	215 (0,750)	215 (0,659)	215 (0,625)	215 (0,800)
Bh6	4	180-195	180 (0,625)	180 (0,500)	180 (0,500)	180 (0,656)	185 (0,500)	180 (0,589)	180 (0,625)	180 (0,478)
Bh8	4	185-215	185 (0,625)	195 (0,489)	185 (0,625)	185 (0,386)	185 (0,688)	185 (0,572)	185 (0,750)	185 (0,652)
Bh13	3	150-165	160 (0,500)	160 (0,375)	160 (0,667)	160 (0,533)	160 (0,625)	160 (0,477)	160 (0,625)	160 (0,700)
Bh16	4	150-170	160 (0,375)	160 (0,472)	170 (0,500)	165 (0,300)	160 (0,714)	160 (0,572)	160 (0,438)	160 (0,461)
Bc48-10	4	80-95	80 (0,375)	80 (0,417)	85 (0,500)	85 (0,456)	85 (0,500)	85 (0,451)	85 (0,500)	85 (0,384)

N: Número de alelos; Alelo de maior frequência (frequência alélica).

**Tabela 3.** Heterozigose observada (Ho), heterozigose esperada (He), índice de Shannon (H') e teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Hw).

	Extrusão 1x3		Seminatural 1x3		Extrusão 2x6		Seminatural 2x6	
	Rep	Pro	Rep	Pro	Rep	Pro	Rep	Pro
Ho	0,5418	0,5730	0,5938	0,4500	0,5670	0,4580	0,5156	0,4853
He	0,6047	0,6695	0,5780	0,6150	0,5813	0,6315	0,5917	0,5940
H'	0,8570	1,1877	0,8378	1,0564	0,9742	1,1408	0,9922	1,0754
Hw	0,0447*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

Rep: Reprodutores; Pro: Progênie; NS: Não significativo; \*P<0,05.

**Tabela 4.** AMOVA para os oito grupos de *Brycon orbignyanus* (Reprodutores x Progênie).

<b>Extrusão 1x3</b>					
Fator de variação	d.f.	Soma dos quadrados	Componentes de variância	% de variação	$F_{ST}$
Entre grupos	1	4,287	0,10685	3,88	0,003875
Dentro do grupo	186	492,942	2,65022	96,12	
Total	187	497,229	2,75707		
<b>Seminatural 1x3</b>					
Entre grupos	1	3,652	0,10154	4,62	0,04620
Dentro do grupo	186	389,875	2,09610	95,38	
Total	187	393,527	2,19764		
<b>Extrusão 2x6</b>					
Entre grupos	1	3,799	0,05719	2,63	0,02628
Dentro do grupo	194	410,992	2,11851	97,37	
Total	195	414,791	2,17570		
<b>Seminatural 2x6</b>					
Entre grupos	1	2,991	0,03396	1,68	0,01676
Dentro do grupo	194	386,626	1,99292	98,22	
Total	195	389,617	2,02688		

Fst: Diferenciação genética entre os reprodutores e a progênie.

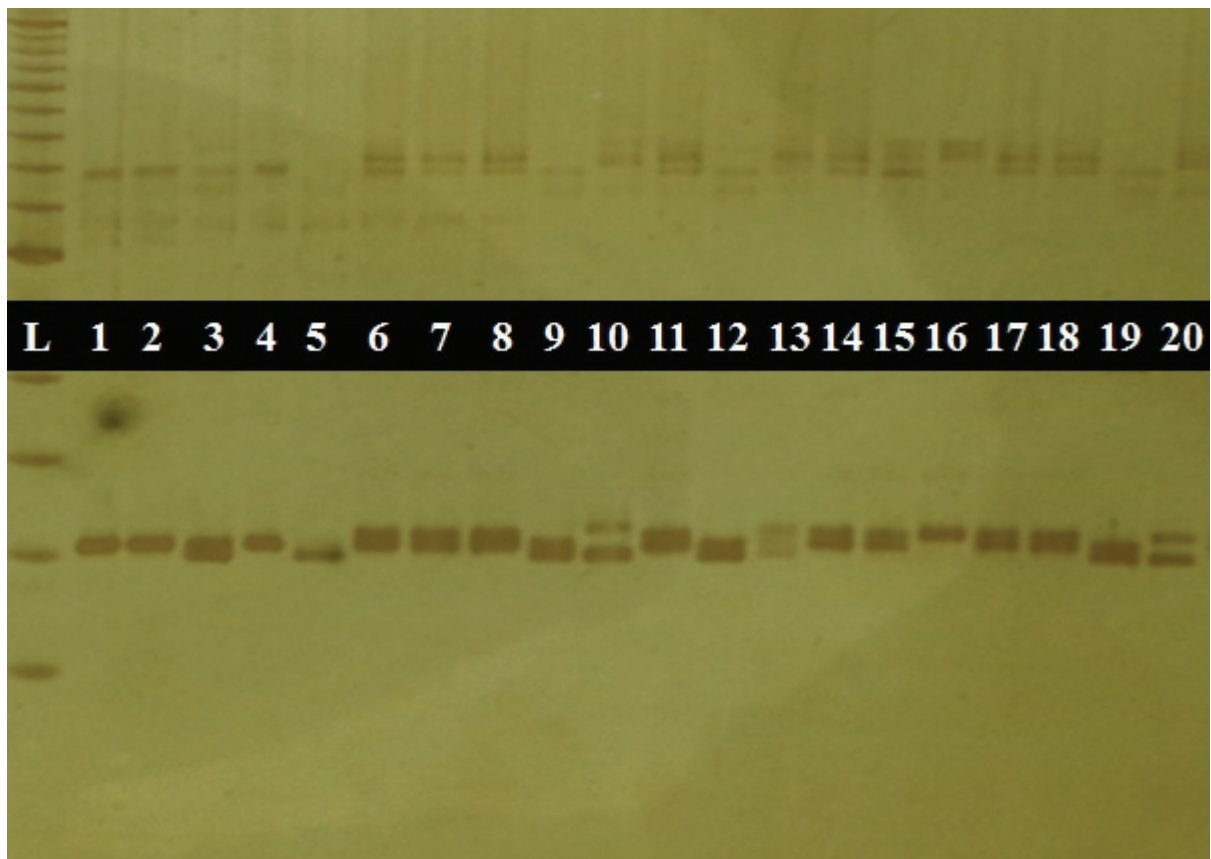
**Tabela 5.** Análise dos parâmetros seminais de machos de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos ao sistema reprodutivo por extrusão.

Tratamento	Macho	IN (%)	MEP (%)	VIG (0-5)	CON (Spz/mL)	pH
<b>Extrusão 1x3</b>	1	59,05	100	4	$2,04 \times 10^{10}$	8
	2	60,00	85	3	$7,12 \times 10^9$	8
	3	58,25	95	4	$1,98 \times 10^{10}$	8
<b>Extrusão 2x6</b>	1	72,38	100	3	$2,13 \times 10^{10}$	8
	2	67,33	95	3	$1,69 \times 10^{10}$	8
	3	67,24	90	2	$1,53 \times 10^{10}$	8
	4	70,00	100	5	$1,05 \times 10^{10}$	8
	5	61,11	90	4	$1,53 \times 10^{10}$	8
	6	56,86	100	5	$2,75 \times 10^{10}$	8
<b>Média</b>		63,58	95	3,67	$1,71 \times 10^{10}$	8

IN: Índice de normalidade; MEP: Motilidade espermática progressiva; VIG: Vigor espermático; CON: Concentração espermática.

## APÊNDICE

**Figura 1.** Análise dos alelos produzidos a partir da amplificação de marcador microsatélite (*primer* Bh13), para larvas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), separados por gel de poliacrilamida 10%.



L=Ladder de 50pb.