

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Salminus brasiliensis*  
UTILIZADOS EM PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO

Autora: Patrícia Cristina Gomes  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Junho – 2010

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Salminus brasiliensis*  
UTILIZADOS EM PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO

Autora: Patrícia Cristina Gomes  
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

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

MARINGÁ  
Estado do Paraná  
Junho – 2010

“Se você encontrar um caminho sem obstáculo, ele provavelmente não leva a lugar nenhum.”

Frank Clark

## **DEDICO**

À minha querida mãe, Maria Hilda Antoniazi,  
pelo amor, carinho, incentivo  
que deu durante todos esses anos.

Obrigada, por nunca ter medido esforços para  
me dar tudo que precisei.

Obrigada também, por sempre acreditar em mim  
e sempre me apoiar.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus.

À Universidade Estadual de Maringá e ao curso de Pós-Graduação em Zootecnia que permitiram a realização de mais uma etapa da minha formação.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pela orientação, pela oportunidade e pela confiança em mim depositada.

Ao Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira pelos ensinamentos, colaboração e amizade.

Aos membros da comissão examinadora, que gentilmente aceitaram o convite.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

À Estação de Hidrologia e Aqüicultura da Duke *Energy International*, Geração Paranapanema, pelas amostras fornecidas.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Zootecnia que muito contribuíram na transmissão do conhecimento.

Aos doutores Jayme Aparecido Povh; Nelson Maurício Lopera Barrero, Danilo Streit Jr. e à zootecnista Carolina Besspalhok Jacometo pelo companheirismo, competência, amizade, carinho dedicado e constante apoio em todas etapas deste trabalho.

À todos integrantes do grupo de pesquisa LEGA (Laboratório de Engenharia Genética Animal) – Universidade Federal de Pelotas, pelo auxílio, amizade e companheirismo.

Agradeço em especial à minha família, pelo amor, torcida e incentivo em todos os momentos, em especial minha mãe Maria Hilda Antoniazi, meu irmão Fábio Rogério Gomes e minha sobrinha Júlia Toná Gomes.

Aos amigos Iraúza Arroteia Fonseca, Thiago Cintra Maniglia, Fabiane Abujanra, Leandro Fuloni, Kelsilene Guastala, Luciana Castaldo Colosio, Franciely Garcia Mommensohn e Leonardo Garcia Mommensohn pelo carinho, incentivo e companheirismo.

À todos os colegas do curso de Pós-Graduação, pela amizade.

À todos estagiários, mestres e doutores do laboratório de Marcadores Moleculares, pela amizade, companheirismo, proporcionando sempre um ambiente agradável de trabalho.

À Zeni, técnica do laboratório, pelo companheirismo.

E finalmente, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram na realização deste trabalho.

## **BIOGRAFIA**

Patrícia Cristina Gomes, filha de Domingos Gomes e Maria Hilda Antoniazi, nasceu em Maringá, Paraná, no dia 06 de novembro de 1978.

Concluiu o curso de Ciências Biológicas, pela Universidade Estadual de Maringá, em julho de 2003.

Em 2004 iniciou o curso de Pós-Graduação em Biotecnologia com Ênfase em Meio Ambiente e Saúde, em nível de Especialização pela Universidade Estadual de Maringá.

Em 2005, ingressou no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, em nível de mestrado, área de concentração produção Animal, realizando estudos na área de biologia molecular.

Em março de 2007, iniciou o Curso de Pós-Graduação em Zootecnia, Doutorado, Área de Concentração em Produção Animal, na Universidade Estadual de Maringá, desenvolvendo estudos na área de biologia molecular.

## ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
I – INTRODUÇÃO GERAL.....	1
1.1. <i>Salminus brasiliensis</i> .....	2
1.2. Rio Paranapanema.....	5
1.3. Estação de Hidrologia e Aquicultura da Duke <i>Energy International</i> , Geração Paranapanema.....	7
1.4. Considerações sobre a transformação de rios em reservatórios.....	8
1.5. Repovoamento.....	8
1.6. Espécies Nativas.....	10
1.7. Reprodução de espécies nativas migradoras e estratégias reprodutivas ...	12
1.7.1. Acasalamento.....	14
1.7.2. Sistemas reprodutivos.....	15
1.7.2.1. Sistema reprodutivo seminatural.....	15
1.7.2.2. Sistema reprodutivo por extrusão.....	16
1.8. Genética e biotecnologia na piscicultura.....	18
1.9. Marcador molecular.....	20
1.10. Marcador molecular RAPD.....	20
1.11. Monitoramento da diversidade genética de peixes.....	22
1.12. Conservação da espécie <i>Salminus brasiliensis</i> .....	23
1.13. REFERÊNCIAS.....	24
II – OBJETIVOS GERAIS.....	34
III – Diversidade genética de populações de dourado coletados na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I.....	35
Resumo.....	36
Abstract.....	36
Introdução.....	37
Material e Métodos.....	38
Resultados e Discussão.....	41
Conclusões.....	47



Referências .....	47
IV – Diversidade genética de dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> ), utilizados em programas de repovoamento.....	50
Resumo.....	51
Abstract.....	51
Introdução.....	52
Material e Métodos.....	53
Resultados e Discussão.....	56
Conclusões.....	62
Referências.....	62
V – CONCLUSÕES GERAIS.....	66

## LISTA DE TABELAS

	Página
III	Diversidade genética de populações de dourado coletados na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I
Tabela 1	Sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> , porcentagem de bases G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para dourado ( <i>S. brasiliensis</i> ), coletados em três períodos distintos.....42
Tabela 2	Porcentagem de fragmentos polimórficos para amostras de dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> ), coletados em três períodos distintos, obtidos pelo programa Popgene 1.31.....42
Tabela 3	<i>Primer</i> , tamanho dos fragmentos, amostras de <i>S. brasiliensis</i> coletados em três períodos distintos com valores significativos pelo teste exato ( $p < 0,05$ ).....43
Tabela 4	Diversidade genética ( $G_{st}$ ) obtidos entre os indivíduos de <i>S. brasiliensis</i> , coletados em três períodos distintos .....44
IV	Diversidade genética de dourado utilizados em programas de repovoamento
Tabela 1	<i>Primers</i> , sequências de nucleotídeos dos <i>primers</i> , porcentagem de bases G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os reprodutores e suas respectivas progênes ( <i>Salminus brasiliensis</i> ).....57
Tabela 2	<i>Primer</i> , tamanho dos fragmentos (pb), amostras de reprodutores de <i>S. brasiliensis</i> e suas respectivas progênes com valores significativos pelo teste exato ( $p < 0,05$ ).....58
Tabela 3	Análise de variância molecular (AMOVA), distância (D) e identidade genética (I) para os diferentes agrupamentos utilizados nos parentais e progênie de <i>S. brasiliensis</i> .....60

## LISTA DE FIGURAS

	Página
I	INTRODUÇÃO GERAL
Figura 1	Características externas do dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> ). Fonte: infoaqua.com.br.....3
Figura 2	Localização geográfica da bacia hidrológica do rio Paranapanema.....5
Figura 3	Foto ilustrativa das usinas hidrelétricas de Canoas I(A) e Canoas II (B).Fonte: Arquivo <i>Duke Energy International</i> .....6
Figura 4	Vista aérea da Estação de Hidrologia e Aquicultura da <i>Duke Energy International</i> , Geração Paranapanema. Fonte: Arquivo <i>Duke Energy International</i> .....7
Figura 5	Sistema reprodutivo seminatural utilizado em espécies migradoras. Fonte: Arquivo pessoal.....16
Figura 6	Sistema reprodutivo por extrusão utilizado em espécies migradoras.Fonte: Arquivo pessoal.....17
III	Diversidade genética de populações de dourado coletados na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I
Figura 1	Localização geográfica da escada de transposição de Canoas I, situada na bacia hidrológica do rio Paranapanema.....38
Figura 2	Foto ilustrativa da escada de transposição de Canoas I, com seu fluxo normal (A) e fechada (B). Fonte: Arquivo pessoal de Patrícia Cristina Gomes.....39
Figura 3	Gráfico de dispersão em coordenadas principais dos indivíduos de dourado, coletados em três períodos diferentes na escada de transposição da usina hidrelétrica de Canoas I.....45
IV	Diversidade genética de dourado utilizados em programas de repovoamento
Figura 1	Porcentagem de fragmentos polimórficos e índice de Shannon obtidos para os parentais e a progênie de <i>S. brasiliensis</i> .....57
Figura 2	Gráfico de dispersão em coordenadas principais do estoque de reprodutores e suas respectivas progênies.....60

## RESUMO

Nos últimos anos vêm ocorrendo um declínio da captura de dourado (*Salminus brasiliensis*), no rio Paranapanema. Os principais fatores causadores do declínio na captura são: desmatamento da vegetação ciliar; excessivo esforço de pesca; captura de indivíduos jovens; drenagem de lagoas marginais; regulação do regime hidrológico dos rios; construções de barragens; poluição das águas e introdução de espécies exóticas. Para a preservação da diversidade genética dessa espécie, é necessário o desenvolvimento de programas capazes de amenizar o impacto de barragens sobre a piracema. A produção de juvenis dessa espécie surge como uma alternativa para a conservação, com objetivo de povoar viveiros de pisciculturas, grandes lagos, rios e represas. Porém, para que haja uma correta implantação de programas de repovoamento é requerido o monitoramento genético, a avaliação de procedimentos reprodutivos e o apoio científico de diferentes áreas. O objetivo do presente estudo foi verificar se ocorre a transposição de indivíduos de *S. brasiliensis* na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I e avaliar a diversidade genética destes indivíduos para que sejam renovado os estoques de dourado da Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande e também avaliar diversidade genética de reprodutores (5♂ e 5♀) da progênie deste acasalamento, que serão utilizados em programas de repovoamento do rio Paranapanema através do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Os resultados mostraram que a escada de transposição de Canoas I permite a transposição de dourado (*S. brasiliensis*) no trecho do médio Paranapanema e as três populações coletadas na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I podem ser utilizadas para renovar o estoque de dourado da Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande (SP). E também mostrou que houve a dominância de apenas um casal no

acasalamento entre reprodutores de *Salminus brasiliensis* no sistema reprodutivo seminatural. No entanto, a variabilidade genética da progênie obtida por este sistema em relação aos reprodutores foi mantida.

## ABSTRACT

In recent years there has been a decline in the capture of “dourado” fish (*Salminus brasiliensis*) in the Paranapanema River. The major factors causing this decline are: clearing of riverside vegetation, excessive fishing effort, capture of young individuals, drainage ponds, regulation of hydrological regime of rivers, construction of dams, pollution and introduction of exotic species. To preserve the genetic diversity of this species, it is necessary to develop programs that can mitigate the impact of dams on spawning. The production of juveniles is an alternative to conservation, aiming to populate fish ponds, large lakes, rivers and dams. But for an effective implementation of repopulation programs it is required genetic monitoring, evaluation of reproductive procedures and scientific support of different areas. The aim of this study was to determine whether there is transposition of individuals of *S. brasiliensis* on the transposition stairs of the hydroelectric plant of Canoas I and evaluate the genetic diversity of these individuals to renew the stocks of “dourado” at the Station of Hydrology and Aquaculture of Salto Grande and also assess the genetic diversity of breeders (5 ♂ and 5 ♀) from the progeny of this mating, which will be used in repopulation programs of the Paranapanema River through the molecular marker RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). The results showed that the transposition stairs of Canoas I allow the transposition of “dourado” (*S. brasiliensis*) at the middle Paranapanema River and that the three populations collected there can be used to renew the stock of “dourado” at Salto Grande (SP). It was also shown that there was a dominance of only one mating pair of *Salminus brasiliensis* in the semi-natural reproductive system. However, the genetic variability of the offspring produced by this system was maintained..

## I- INTRODUÇÃO GERAL

A Aquicultura é um dos sistemas de produção de alimentos que mais cresce no mundo, sendo que a Piscicultura é uma das atividades que vem se mostrando mais promissora. Nesse contexto, conforme dados da FAO – *Food and Agriculture Organization of United Nations* (2008), quando se analisa o desempenho da aquicultura mundial, não se pode deixar de ressaltar, que dentre os dez maiores produtores mundiais, destacam-se de forma bastante preponderante, nove países Asiáticos (China, Índia, Indonésia, Filipinas, Vietnã, Tailândia, Coreia do Sul, Japão e Bangladesh) e, apenas um país da América do Sul (Chile). Já o Brasil, a despeito de todo o seu potencial e tradição secular nessa área, teve a participação sofrível, notadamente quando se leva em conta que as 289,6 mil toneladas produzidas pelo país em 2007, representaram apenas 0,44% da produção mundial da aquicultura no referido ano.

Porém, o Brasil apresenta uma série de condições que poderiam aumentar ainda mais sua produtividade, tais como condições climáticas adequadas, baixo custo da terra, grande variedade de espécies com valor econômico adaptáveis aos cultivos, mercado consumidor potencial, infraestrutura de apoio e escoamento para exportação, linhas de crédito, ausência de poluição e contaminação acentuada dos ecossistemas aquáticos, também possui muitos Estados produtores e exportadores de soja e outros grãos que formam a base da maior parte da alimentação dos peixes (Lovshin, 2000).

Apesar de a produtividade da aquicultura ainda ser modesta quando comparada com programas de produção de animais terrestres, de acordo com a FAO (2002), um hectare cultivado com peixes produz mais do que com qualquer outro animal. Também é crescente a demanda mundial por alimento de origem aquática, tanto em função da expansão populacional como pela busca por produtos de fácil preparo,

higienicamente corretos e nutricionalmente adequados (Bailey, 1997; Valenti et al., 2000; Oetterer, 2002). Por isso, nos últimos anos o interesse dos produtores na utilização de espécies nativas com apreciáveis características zootécnicas tem aumentado, objetivando a produção, a melhora econômica e a participação em programas de melhoramento e repovoamento, em que além da aplicação de estratégias de monitoramento e de exploração, a utilização de diversas ferramentas biotecnológicas pode ser propostas.

### 1.1. *Salminus brasiliensis*

O gênero *Salminus* é representante da família Characidae, ordem dos Characiformes e classe dos Actinopterygii. Atualmente, são descritas três espécies para o gênero *Salminus*: *Salminus affinis* (Steindachner, 1880), *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1850) e *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816).

*S. affinis* é nativo das bacias dos rios Magdalena na Colômbia e rio Pachitea no Peru. *S. hilarii* é nativo das bacias do alto rio Paraná, São Francisco, Tocantins e alto Amazonas, também é nativo da Venezuela e Colômbia, sendo encontrado na bacia do rio Orinoco, comum a esses dois países. Já, *S. brasiliensis*, conhecido popularmente como dourado, apresenta ampla distribuição geográfica no território brasileiro, sendo encontrado em toda a extensão da bacia do Prata (formada pelos rios Paraná, Paraguai e Uruguai) e na bacia do São Francisco (distribuída em sete unidades da federação: Sergipe, Alagoas, Pernambuco, Bahia, Goiás, Minas Gerais e Distrito Federal) (Morais-Filho e Schubart, 1955; Paiva, 1983; Godoy, 1987; Britski et al., 1988).

*S. brasiliensis* é a espécie que atinge o maior tamanho entre as espécies do gênero *Salminus*, podendo passar de um metro de comprimento. Dentre as três espécies, é considerada a que possui maior potencial para a piscicultura, pois é um peixe de grande porte, com características organolépticas adequadas e, além disso, tem características indicadas para a pesca esportiva, sendo excelente atrativo em estabelecimentos de pesque-pague (Morais-Filho e Shubart, 1955).

Apesar de este peixe ser de grande importância econômica (Koch et al., 2000), a piscicultura desta espécie torna-se um processo difícil. Pelo fato do dourado aceitar somente alimentos vivos e pelas altas taxas de canibalismo quando acondicionado em altas



densidades, torna-se necessário introduzir grande número de larvas forrageiras (Weingartner & Zaniboni Filho, 2005).

O dourado é um peixe carnívoro de hábitos diurnos, de coloração típica amarelo-dourado (Figura 1), sendo considerado o maior peixe de escama da bacia do Prata e uma das espécies mais nobres dos peixes nativos de água doce (Scorvo Filho & Ayrosa, 1996).



**Figura 1.** Características externas do dourado (*Salminus brasiliensis*). Fonte: infoaqua.com.br.

*S. brasiliensis* apresenta comportamento migratório e conforme seu estágio de vida (larva, juvenil ou adulto) ocupa diferentes ambientes na planície de inundação (Agostinho et al., 1997). As espécies migratórias geralmente desovam em águas abertas no canal principal e tributários, seus ovos e larvas são carregados para áreas alagadas e lagoas marginais. Na fase jovem, essa espécie explora ambientes lênticos ou semilênticos, os quais funcionam como áreas de alimentação e crescimento.

O dourado apresenta hábito alimentar diferenciado ao longo do desenvolvimento ontogenético, sendo planctófago no estágio larval, passando a alimentar-se de larvas de outros peixes e de insetos. Quando juvenil, a dieta é baseada em insetos e, finalmente, durante o restante de seu desenvolvimento, alimenta-se exclusivamente de peixes (Morais-Filho e Schubart, 1955).

Em relação ao comportamento reprodutivo, a espécie apresenta fecundação externa e apenas um período de desova anual durante a primavera e o verão (época da piracema), possui ovos semidensos e não apresenta cuidado parental (Godoy, 1975). De acordo com Vazzoler et al. (1997), os fatores exógenos são responsáveis pela sinalização dos processos reprodutivos, os aumentos da temperatura e da duração do dia agem como fatores preditivos, exercendo influência em diferentes fases do desenvolvimento gonadal. Por esses fatores, o período reprodutivo acaba coincidindo com dias longos e com altas temperaturas da água, associados com picos de cheias, possibilitando que as larvas resultantes da desova encontrem condições adequadas para

o seu desenvolvimento, no que se refere à disponibilidade de alimento e à presença de abrigos.

A maioria dos peixes de piracema não apresenta indícios de desova em cativeiro, sendo comum a estocagem de dourados por longos anos em tanques, sem que esses peixes manifestem qualquer sinal de desova (Morais-Filho e Schubart, 1955). Porém, a desova do dourado em cativeiro pode ser obtida por meio de indutores hormonais de peixes, tais como o extrato de hipófise de carpa (Streit Jr. et al, 2003).

Na bacia do Prata, o dourado tem grande valor comercial, e no alto rio Paraná, a espécie pertence à categoria-I, que é a mais alta categoria alimentar de peixes nobres para comercialização, isto após atingir um comprimento total superior a 40cm (Agostinho et al., 1994; Okada, 2001). O dourado é uma espécie que apresenta carne saborosa, boas características para a pesca esportiva, sendo bastante requisitado em pesque-pague. Porém, nos últimos anos vem ocorrendo o declínio de sua captura.

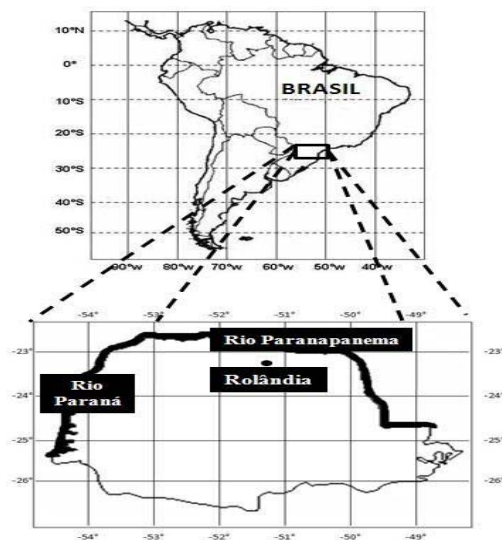
Os principais fatores causadores do declínio na captura são: desmatamento da vegetação ciliar; excessivo esforço de pesca; captura de indivíduos jovens; drenagem de lagoas marginais; regulação do regime hidrológico dos rios; construções de barragens; poluição das águas e introdução de espécies exóticas (Zaniboni-Filho, 2000).

Para a preservação da diversidade genética dessa espécie é necessário o desenvolvimento de programas capazes de amenizar o impacto de barragens sobre a piracema. E a produção de juvenis dessa espécie surge como uma alternativa para a conservação, com objetivo de povoar viveiros de piscicultura, grandes lagos, rios e represas.

De acordo com Baldisserotto e Gomes (2005), atualmente os trabalhos relacionados à criação de dourado têm despertado grande interesse dos centros de pesquisa. Duas razões principais podem ser citadas para justificar esse maior interesse pela espécie: uma delas é o potencial como espécie para piscicultura, pelo seu rápido desenvolvimento inicial e elevado preço de mercado; a segunda está relacionada à preocupação existente quanto à conservação dessa espécie em ambiente natural, em função da degradação do seu hábitat e do grande apelo social despertado, principalmente entre as comunidades ribeirinhas de sua área de distribuição.

## 1.2. Rio Paranapanema

O rio Paranapanema é um dos mais importantes afluentes da margem esquerda do rio Paraná, com uma bacia de 100.800 km<sup>2</sup> que drena as regiões Sudoeste de São Paulo e Noroeste do Paraná, servindo ainda como divisor entre os dois Estados (Figura 2). Tem origem na vertente ocidental da serra da Paranapiacaba (48°15'W, 24°16'S) no município de Capão Bonito, SP (Britto et al., 2003).



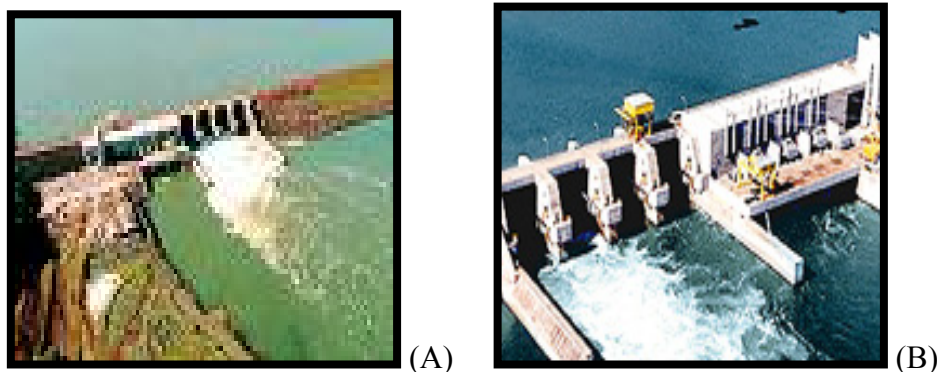
**Figura 2.** Localização geográfica da bacia hidrográfica do rio Paranapanema.

O Paranapanema tem uma extensão total de 929km em um desnível de 570m, desenvolvendo-se no sentido geral Leste-Oeste e desagua no rio Paraná numa altitude de 239m aproximadamente (Agostinho et al., 1995).

Atualmente, este rio possui 10 usinas em operação (Usina Hidrelétrica (UHE) Jurumirim, UHE Piraju, UHE Paranapanema, UHE Chavantes, UHE Salto Grande, UHE Canoas I, UHE Canoas II, UHE Capivara, UHE Taquaruçu e UHE Rosana) e uma ainda em construção o que transformou seu curso original em uma sucessão de reservatórios justapostos (Leuzzi et al., 2004).

No presente estudo foram considerados os reservatórios de Canoas I e Canoas II (Figura 3), construídos pela Companhia Energética de São Paulo (CESP), gerenciados atualmente pela *Duke Energy International*, Geração Paranapanema. Elas estão situadas no médio Paranapanema e começaram operar em novembro de 2000. A implantação das escadas em Canoas I e Canoas II visam garantir a migração dos peixes ao longo do médio Paranapanema, entre os reservatórios de Capivara (a jusante) e Salto

Grande (a montante), na hipótese de garantir condições favoráveis à manutenção das populações de espécies migradoras nesse trecho da bacia.



**Figura 3.** Foto ilustrativa das usinas hidrelétricas de Canoas I (A) e Canoas II (B). Fonte: Arquivo *Duke Energy International*.

De acordo com Britto et al. (2003), o rio Paranapanema é considerado um rio de água pouco poluída. Ele divide-se em três trechos principais:

#### 1-baixo Paranapanema:

Da foz, no rio Paraná, até Salto Grande, com 421Km de extensão, o rio Paranapanema apresenta declividade média de 29cm/km, larguras superiores a 200m nos trechos mais profundos e nos trechos rasos, larguras que chegam a atingir 800m. Os raios de curvatura são da ordem de 1000m. O curso é muito pouco sinuoso, apresentando um total equilíbrio horizontal, com exceção, somente, do trecho nas proximidades da embocadura no Paraná, onde se nota a existência de bancos de areia móveis e ilhas.

#### 2-médio Paranapanema:

De Salto Grande até a confluência do rio Apiaí-Guaçu, com 328km de extensão, o rio Paranapanema apresenta um desnível total de 210m. Não se pode falar em declividade média para este trecho, uma vez que com a construção de várias barragens para fins de aproveitamento hidrelétrico, este desnível está, em sua maior parte, concentrado.

#### 3-alto Paranapanema:

Da confluência do rio Apiaí-Guaçu, até as nascentes, na serra de Agudos Grandes, com uma extensão total de 180km, o rio Paranapanema apresenta uma declividade média bastante elevada de 150cm/km, drenando uma série de ribeirões que descem da serra de Paranapiacaba, o alto Paranapanema vai ganhando porte e se consolida ao receber os rios Itapetininga e Apiaí-Guaçu.

A fauna dos peixes do rio Paranapanema é composta por nove grandes Ordens (Characiformes, Gymnotiformes, Siluriformes, Cypriniformes, Perciformes, Cyprinodontiformes, Synbranchiformes, Pleuronectiformes e Rajiformes) e um total de 155 espécies identificadas (Britto et al., 2003) e algumas outras ainda desconhecidas (Castro et al., 2003). Várias destas espécies têm apresentado diminuição das populações naturais, onde *Salminus brasiliensis* é raramente encontrado (Britto et al., 2003).

### **1.3. Estação de Hidrologia e Aquicultura da Duke Energy International, Geração Paranapanema**

A Estação de Hidrologia e Aquicultura da *Duke Energy International*, Geração Paranapanema está localizada a 49°13'25" W e 23°10'38" S (Figura 4), entre os municípios de Salto Grande (SP) e Cambará (PR). Possui altitude de 384,67m, no curso médio do rio Paranapanema. A Estação foi inaugurada em 1975, com a finalidade de produzir alevinos para o repovoamento do rio Paranapanema, para atendimento às leis vigentes, condicionante obrigatória para a aquisição e revalidação da Licença de Operação (LO), concedida pelo IBAMA. São reproduzidas na Estação, várias espécies de peixes migradores, tais como: curimatá (*Prochilodus lineatus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), piapara (*Leporinus elongatus*), piava (*Leporinus fridericci*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e piracanjuba (*Bricon orbignianus*).



**Figura 4.** Vista aérea da Estação de Hidrologia e Aquicultura da *Duke Energy International*, Geração Paranapanema. Fonte: Arquivo *Duke Energy International*.

## 1.4. Considerações sobre a transformação de rios em reservatórios

De acordo com Sirol e Britto (2005), o represamento de ambientes lóticos para formação de lagos (lênticos), visando à produção de energia elétrica, tem aumentado em resposta à demanda do crescimento populacional e econômico. A inserção de barragens e a criação de lagos artificiais acarretam um complexo de impactos que afetam os componentes químicos, físicos e biológicos, originalmente presentes no ambiente.

Segundo Carvalho et al., *in press*, a construção de reservatórios sucessivos, tem como um dos principais impactos primários a pressão negativa exercida sobre as populações dos peixes conhecidos como grandes migradores, estritamente fluviais. Dessa forma, a interrupção das rotas migratórias dessas espécies, é, em grande parte, responsável pelo desaparecimento dos migradores.

Porém, há uma série de fatores que também impactam a fauna piscícola, tais como desmatamento da vegetação ciliar dos rios; despejo de efluentes domésticos e industriais; pressão das populações humanas ao redor dos reservatórios; sobrepesca ao longo do ano (inclusive em maior intensidade na época de piracema); o assoreamento de lagoas marginais e os processos erosivos decorrentes da exploração agrícola e mineral. (Paiva, 1983; Torloni, 1986; Vinatea, 2004).

De maneira geral, podemos entender que a construção de reservatórios sucessivos (em cascata), requer um conjunto de medidas de mitigação quanto à manutenção da biodiversidade, da biota nas bacias, tentando evitar que não ocorra depleção das capturas totais e até mesmo possibilitando o aumento da produtividade do ambiente, em alguns casos (Sirol e Britto, 2005).

## 1.5. Repovoamento

Os programas de repovoamento de peixes no Brasil, realizados há mais de três décadas, são práticas que vêm se tornando cada vez mais comuns. No passado, a introdução de espécies exóticas era vista com interesse para o aumento da pesca comercial, porém, hoje é consenso que tal prática pode ter contribuído para a redução e

até o desaparecimento de espécies locais (Hilsdorf et al., 2006). No entanto, para espécies nativas a soltura de peixes tem sido cada vez maior.

De acordo com o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas o repovoamento piscícola consiste na introdução no meio natural, curso de água ou albufeira, de peixes, ou mesmo ovos, provenientes de piscicultura ou, em alguns casos, provenientes de outras massas de água.

Os objetivos de um repovoamento podem ser vários, podendo, no entanto, subdividir-se em quatro categorias principais:

- mitigação de impactos causados, por exemplo, por obras hidráulicas, em que houve perturbação dos habitats e, conseqüentemente, das populações piscícolas;
- recuperação de populações piscícolas após a eliminação ou atenuação de fatores que as afetavam, como alterações da qualidade da água ou dos habitats, ou a existência de barreiras físicas que impediam a circulação dos migradores;
- aumento das populações piscícolas em locais em que pela procura elevada por parte dos pescadores, o repovoamento constitua uma das formas de reforçar os efetivos piscícolas e garantir a manutenção do nível de oferta;
- introdução de peixes em novas massas de água, por exemplo, novas albufeiras, ou introdução de novas espécies com o objetivo de modificar a dinâmica populacional e diversificar a oferta.

Pelo repovoamento, uma das estratégias necessárias à realização dos objetivos estabelecidos no plano de manejo de reservatórios, há fatores diretamente relacionados ao plano de manejo, para que seja realizado o repovoamento, tais como definição das espécies; proteção à variabilidade genética das populações selvagens; locais e períodos de soltura; tamanho de soltura dos alevinos; sanidade dos alevinos; quantidade de alevinos liberados por local e por ambiente (Sirol e Britto, 2005).

Considerando-se o fato de que o repovoamento, provavelmente, continuará aumentando em popularidade na sociedade, como um método mitigatório para a recuperação das populações de peixes, torna-se fundamental que os programas sejam fortemente cercados por pesquisas científicas, a fim de determinar com clareza os possíveis ganhos ecológicos, sociais e econômicos (Sirol e Britto, 2005).

A Estação de Hidrologia e Aquicultura da *Duke Energy International*, Geração Paranapanema, vem realizando o repovoamento como forma de mitigar e compensar os impactos resultantes da construção dos reservatórios. Segundo a empresa, somente em 2002 foram soltos mais de um milhão e meio de alevinos de peixes nativos

. *elongatus* em pontos estratégicos do rio Paranapanema. Porém, a tendência é aumentar ainda mais.

## 1.6. Espécies nativas

Os avanços tecnológicos que viabilizaram a produção de peixes nativos no Brasil, tiveram início efetivo nos anos 80. Foram quatro os principais centros de geração e difusão de tecnologia para a reprodução e produção de alevinos de diversas espécies de peixes nativos: o DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra as Secas (a partir de suas estações de piscicultura no Ceará), a CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (com suas estações de piscicultura no eixo do rio São Francisco), a UNESP – Universidade Estadual Paulista (Setor de Piscicultura em Jaboticabal, SP) e o CEPTA – Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais (Estação de Piscicultura em Pirassununga, SP). Paralelamente, técnicos das Estações de Piscicultura de diversas companhias hidrelétricas se empenharam na reprodução de algumas espécies nativas.

Nos anos 90 a tecnologia de produção de alevinos dos peixes redondos estava praticamente consolidada e, assim, iniciou-se a produção de outras espécies. Porém, a produção dessas novas espécies começou dentro do setor privado, sendo muito modesta a participação das instituições de pesquisa.

Nesse mesmo período começaram a ser implantados os primeiros empreendimentos de grande porte dedicados à engorda de peixes nativos. Também se multiplicaram diversas pisciculturas dedicadas à engorda de peixes como o tambacu, o pacu e o piaçu, que eram destinados tanto aos mercados locais, como aos pesque-pague que estavam em seus “anos de glória” na região Sul e Sudeste.

São mais de 27 anos de pesquisas, difusão de tecnologia, cultivos experimentais e comerciais. Aumentaram os esforços por parte de produtores individuais, instituições de pesquisa e fomento e de empreendedores em todo o Brasil, em busca do fortalecimento da produção de peixes nativos em nosso país.

De acordo com estatísticas providas pelo IBAMA (2007), a produção de peixes nativos saltou de pouco mais de seis mil toneladas em 1995 para 58 mil toneladas em 2005, com um crescimento médio ao redor de 25% ao ano.



Apesar de modesta, quando comparada as 114 mil toneladas de peixes exóticos produzidos no mesmo ano, a produção de peixes nativos deverá crescer muito nos próximos anos, principalmente com a expansão da piscicultura nos Estados da região Centro-Oeste e Norte, onde, atualmente, há grandes restrições quanto à piscicultura com espécies não-nativas.

De acordo com Kubitzka et al. (2007), os caminhos para a expansão da produção de peixes nativos no Brasil deverão contemplar os seguintes aspectos:

- o alcance de escalas industriais de produção, para reduzir custos e prover produtos com regularidade na oferta, permitindo o desenvolvimento de um trabalho de abertura de mercados para estas espécies;
- o uso de tecnologia de processamento para obter produtos sem espinhos, de maior valor agregado e facilidade de preparo, de forma a ampliar as opções de mercado e o universo de consumidores, especialmente nos grandes mercados fora das áreas de consumo tradicional;
- adaptação da tecnologia de cultivo em tanques-rede para a produção de peixes nativos;
- ampliação dos conhecimentos sobre a nutrição dos peixes nativos, possibilitando a produção de rações mais eficientes, seja para a produção em tanques escavados ou para cultivos mais intensivos em tanques-rede;
- a criação de mecanismos mais eficientes de compilação e difusão dos conhecimentos gerados pela pesquisa, para que estes cheguem rapidamente aos produtores e técnicos e sejam incorporados à rotina de produção;
- desenvolvimento e difusão da tecnologia de reprodução e de produção de alevinos de espécies nobres de grande potencial como o pintado e o pirarucu, de forma a aumentar a oferta e a reduzir os custos dos alevinos;
- melhoramento e seleção, para obter maior uniformidade no desenvolvimento e melhores taxas de crescimento e conversão alimentar, visando a domesticação das principais espécies. No caso das espécies carnívoras um processo de seleção bem aplicado pode, em poucas gerações, resultar na produção de alevinos capazes de se adaptar mais facilmente às rações comerciais;
- os governos federais e estaduais precisam ser mais pragmáticos na busca das soluções tecnológicas para a produção das espécies nativas de grande interesse comercial ou ambiental, seja pelo financiamento de pesquisas encomendadas, seja pela aquisição da tecnologia existente. Também, por convênio com instituições de pesquisa, devem

fortalecer as agências de extensão e promover maior difusão da tecnologia de produção de peixes nativos, gerada tanto pelo setor acadêmico, quanto pelo setor produtivo;

- os produtores também precisam se organizar em associações específicas para defender os interesses de suas espécies e produtos. Organizados, podem reivindicar ou contratar pesquisas ou ações de interesse mútuo para solucionar gargalos importantes da cadeia produtiva da espécie de interesse em centros produtores específicos do país.

Ainda há muito caminho pela frente até que a piscicultura de peixes nativos se consolide, definitivamente, como o setor de maior expressão na aquicultura nacional. Mas, com foco objetivo na definição das espécies e adequados programas nacionais e regionais de fortalecimento dos cultivos, sem falar no sempre fundamental trabalho de desenvolvimento do mercado, a piscicultura das espécies nativas apresenta condição de melhorar.

### **1.7. Reprodução de espécies nativas migradoras e estratégias reprodutivas**

Embora o Brasil apresente uma rica diversidade ictiológica e condições geográficas excepcionais, a piscicultura brasileira teve sua expansão baseada no cultivo de espécies exóticas, poucos foram os esforços quanto ao desenvolvimento de tecnologias referentes à criação das espécies nativas brasileiras (Zaniboni-Filho, 2000).

Contudo, atualmente há interesse dos piscicultores brasileiros pela criação de espécies de peixes nativos (Baldisserotto e Gomes, 2005). Dentre estas, existe um grupo que abrange a maior parte das espécies nativas, e que necessita realizar migrações (piracema) rumo às cabeceiras dos rios para a reprodução, sendo denominados peixes reofílicos ou migradores.

Segundo Zaniboni-Filho (2000) a falta de tecnologia para a produção de alevinos das espécies nativas migradoras pode ser considerada o maior entrave ao desenvolvimento da piscicultura baseada nestas espécies. Quando se iniciaram os trabalhos de produção de alevinos das espécies nativas reofílicas, não foi levada em consideração a biologia destas espécies na natureza e passou-se então a adotar as mesmas técnicas desenvolvidas para a produção de espécies exóticas. Dessa forma,

vários equívocos foram cometidos, isto contribuiu para retardar o desenvolvimento de tecnologia de produção de alevinos destas espécies (Zaniboni-Filho, 2000).

A reprodução representa um dos aspectos mais importantes da biologia de uma espécie, visto que seu sucesso depende do recrutamento e, conseqüentemente, a manutenção de populações viáveis (Suzuki e Agostinho, 1997). Segundo Wootton (1990), o sucesso reprodutivo de um peixe depende de onde e quando ele se reproduz, além do recurso alocado para a reprodução.

A reprodução é o resultado de interações entre fatores bióticos e abióticos, operando no comportamento fisiológico dos peixes. Falhas na reprodução por anos consecutivos, causadas principalmente por modificações no hábitat, podem levar os estoques naturais à depleção ou mesmo à extinção (Suzuki e Agostinho, 1997; Ali e Wootton, 1999).

Ao longo do tempo, a ação antrópica sobre os ambientes naturais, como o desmatamento da vegetação ciliar, a poluição por dejetos orgânicos e químicos e a sobrepesca, acarretaram a redução dos estoques pesqueiros de algumas espécies nativas. O dourado foi uma destas espécies nativas prejudicadas.

Esta situação está sendo agravada com a implantação de empreendimentos hidrelétricos. Os represamentos têm como conseqüências inevitáveis alterações na composição específica e na estrutura da comunidade de peixes nativos, e as mais atingidas são as espécies migradoras (Agostinho et al., 1992). Os impactos sobre tais espécies, normalmente resultam da fragmentação do hábitat (áreas de desova, alimentação e crescimento) ou isolamento de segmentos populacionais (redução da heterogeneidade genética), além é claro, da interrupção de sua rota migratória.

Como as espécies migradoras são as mais afetadas pelos barramentos hidrelétricos, geralmente estão incluídas entre as populações-alvo de programas de recomposição dos estoques pesqueiros.

Assim, a possibilidade de uma espécie de peixe reproduzir-se naturalmente em cativeiro, foi considerada durante vários anos uma característica desejável para esta espécie ser destinada ao cultivo.

Porém, é necessário ter conhecimento sobre o ciclo de vida da espécie para que se possa fazer o manejo adequado. A importância que os peixes nativos migratórios têm na pesca e na piscicultura, justifica sua utilização na implantação de medidas compensatórias, como o repovoamento do rio pela soltura de alevinos (Zaniboni-Filho et al., 2002).

### 1.7.1. Acasalamento

Geralmente, o acasalamento é manejado de maneira aleatória na reprodução artificial de estoques mantidos em cativeiro. Entretanto, muitas pisciculturas realizam o manejo reprodutivo de forma inadequada podendo provocar grandes problemas na piscicultura.

De acordo com Povh et al. (2006), um grave erro de manejo é a seleção não-intencional. Esta pode ocorrer quando se faz a seleção dos animais maiores, mais bonitos, uso de um pequeno número efetivo de reprodutores e da não-utilização de todo o período reprodutivo da espécie. A seleção não-intencional pode causar sérios prejuízos genéticos, alterando de maneira irreversível o “*pool*” gênico da população, o que pode levar à perda de alelos importantes, como aqueles associados com a adaptação a uma determinada situação de estresse ou característica climática. A situação pode ser mais grave quando o destino dos alevinos ou juvenis tem como objetivo o repovoamento de rios e reservatórios. Primeiro porque com baixa variabilidade genética pode diminuir a viabilidade dos alevinos ou juvenis por perdas de alelos importantes; segundo porque estes animais serão futuros reprodutores, portanto, pode ocorrer a redução da variabilidade genética.

Também de acordo com Povh et al. (2006), outro aspecto importante no manejo reprodutivo a ser considerado é a endogamia, evento que pode ser observado em função do pequeno número efetivo de reprodutores em sistemas fechados, condição que pode proporcionar aumento da homozigose, o que possibilita que alelos deletérios raros e alelos deletérios tenham maior chance de se expressarem, reduzindo a viabilidade, sobrevivência e crescimento. Quando não se faz seleção intencional é de grande importância a manutenção da variabilidade genética, que pode ser conseguida com o uso de um grande número efetivo de reprodutores, uso de todo período reprodutivo e acasalamento de indivíduos não-aparentados.

## **1.7.2. Sistemas reprodutivos**

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

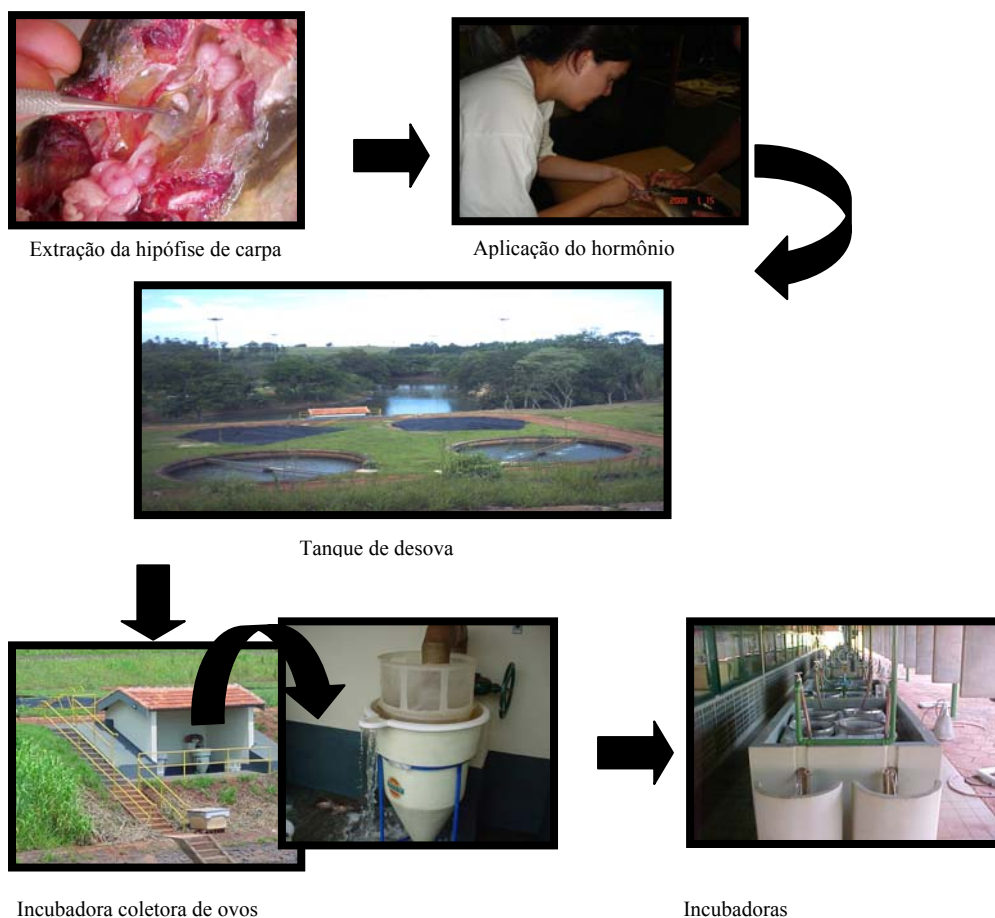
### **1.7.2.1 Sistema reprodutivo seminatural**

O sistema reprodutivo seminatural caracteriza-se pela pouca interferência do produtor no processo reprodutivo, simulando condições reprodutivas naturais.

De acordo com a metodologia desenvolvida por Sirol & Britto (2005), primeiramente é selecionado visualmente um número adequado de reprodutores. Posteriormente estes são transportados para um laboratório, onde serão pesados individualmente e acondicionados nos aquários em números apropriados. Utiliza-se o hormônio de hipófise de carpa para estimulação gonadal. Após a aplicação, todos os peixes (machos e fêmeas) são transportados para o tanque de desova, previamente preparado onde ocorre diretamente a fertilização dos ovócitos pelos machos de forma aleatória.

O próximo passo consiste na coleta de ovos. Os mesmos são conduzidos por um cano instalado no centro de um tanque redondo e estes transportados até uma incubadora de fibra de vidro e conduzidos à incubadoras situadas na Estação de Hidrologia e Aquicultura.

A principal desvantagem do sistema reprodutivo seminatural está relacionada com a necessidade da retirada dos ovos do tanque para transferência para as incubadoras, que segundo Zaniboni-Filho e Nuñez (2004), pode prejudicar a evolução dos embriões e aumentar a possibilidade de infecção destes por fungos. Segundo Sirol et al. (2007), para contornar este problema, os autores propuseram uma técnica simples de sistema reprodutivo seminatural, utilizando tanques circulares de fluxo contínuo e circular de água que possuem uma tubulação que permite coletar e dirigir os ovos ao centro do tanque para serem levados a um sistema terminal de incubadora (Figura 5).



**Figura 5.** Sistema reprodutivo seminatural utilizado em espécies migradoras. Fonte: Arquivo pessoal.

### 1.7.2.2 Sistema reprodutivo por extrusão

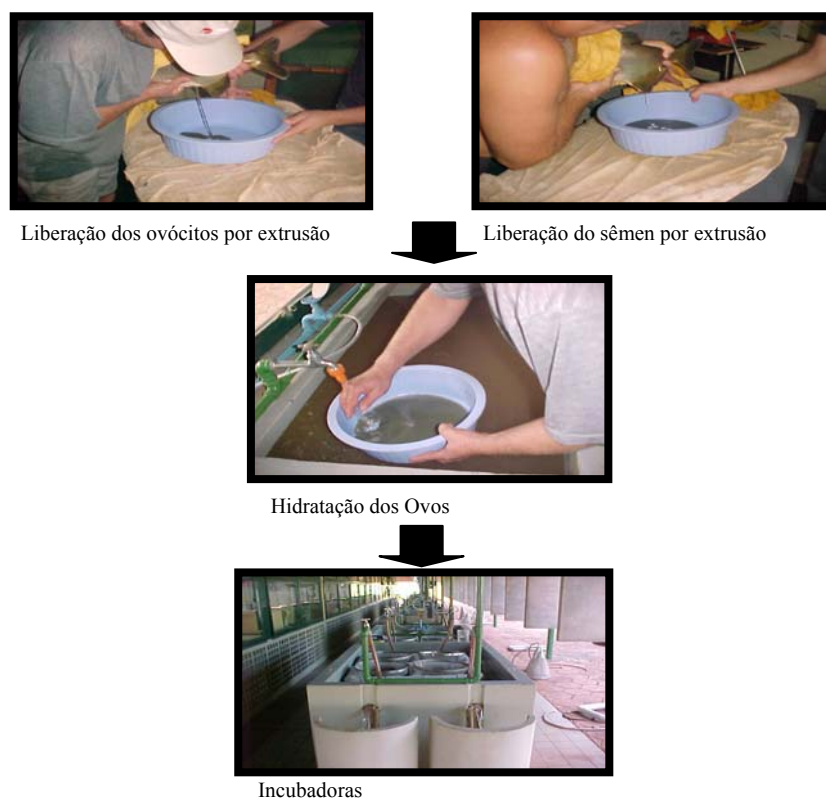
De acordo com Zaniboni-Fliho e Nuñez (2004), o sistema reprodutivo por extrusão é um dos mais utilizados no Brasil. Este sistema apresenta como vantagens a não-utilização de tanques de reprodução ou desova, permite o fácil manejo dos gametas destinados para programas de melhoramento e seleção e reduz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

Nesta técnica a seleção dos reprodutores, pesagem, dosagem e aplicação de hormônio são iguais à do sistema seminatural. A diferença é que para o sistema reprodutivo por extrusão, é necessário o acompanhamento da temperatura da água, até que atinja em torno de 280°C de UTA (Unidade Térmica Acumulada). Também se faz necessário, após 270°C de UTA, um acompanhamento constante das fêmeas, para verificar se as mesmas estão liberando ou não os ovócitos.

Posteriormente é realizada a extrusão, sendo necessário capturar a fêmea no aquário, com o auxílio de um puçá, secar o animal com uma toalha e comprimir seu abdome com o auxílio dos dedos, até que sejam liberados os ovócitos em um recipiente plástico que deverá estar totalmente seco, para que não haja hidratação dos ovócitos, quando em contato com a água em seguida, é realizado o mesmo processo para os machos, para a liberação do sêmen e posterior fecundação dos ovócitos. Para a fertilização adiciona-se água para que ocorra sua hidratação.

Após a união dos ovos com o sêmen, aguardam-se mais ou menos 15 segundos e adiciona-se um pouco de água para que haja a hidratação dos ovócitos em seguida, os recipientes com a desova são colocados em cima de um balcão, onde esta fica por cerca de 20 minutos para que ocorra a hidratação, após, a desova é levada para as incubadoras instaladas nos tanques.

Nestas incubadoras ocorre o processo desde a formação das larvas até a sua eclosão (Figura 6).



**Figura 6.** Sistema reprodutivo por extrusão utilizado em espécies migradoras. Fonte: arquivo pessoal.

Existem alguns trabalhos que comparam a eficiência reprodutiva na utilização dos dois sistemas reprodutivos na variabilidade genética das progênies. De

acordo com Povh et al. (2007), o sistema de desova seminatural é o método mais eficiente para a produção de peixes em cativeiro, pela excelente taxa de fecundação e a menor perda de reprodutores utilizados, pois o manejo realizado neste sistema causa menos estresse aos peixes, enquanto que no sistema por extrusão o estresse do animal é muito alto, ocasionado pelo excesso de manuseio, causando ferimentos nestes animais pelo excesso de movimentos repetidos em seu abdomen, e em alguns casos ocasiona a sua morte.

Assim, recomenda-se a utilização do sistema seminatural de desova, pois este método possibilita que todos os machos do lote tenham a chance de deixarem descendentes, aumentando assim a variabilidade genética nos alevinos oriundos destas desovas, pois, neste sistema a liberação dos ovos ocorre naturalmente em um tanque adaptado, onde se tenta aproximar ao máximo as condições do meio natural.

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

As pesquisas em genética de populações de peixes têm contribuído grandemente para elucidação de questões relativas à estrutura de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, de sua origem e características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (Parker et al., 1998; Sunnucks, 2000).

Considerando as características biológicas dos peixes, a grande diversidade da ictiofauna neotropical e a importância da pesca em diversas regiões do mundo, a utilização de marcadores genéticos pode auxiliar os programas de conservação de recursos pesqueiros (Ward & Grewe, 1995).

A biologia molecular tem sido a ferramenta escolhida para os estudos de genética de populações e tem acumulado avanços importantes, gerando técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA, em adição à descoberta de variados marcadores moleculares aplicáveis aos mais diversos problemas encontrados no estudo de populações e às análises estatísticas que permitem desde a estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco.



A biologia molecular desenvolveu-se de maneira expressiva, após a descoberta da estrutura do DNA em 1953 por Watson e Crick (Alberts et al., 1997). Até o início dos anos 70, o DNA era uma molécula difícil de ser analisada bioquimicamente. Hoje, graças à evolução das técnicas de manipulação do DNA, ela é uma das moléculas mais fáceis de ser estudada. Outra vantagem é que o DNA é integralmente transmitido às todas as células, podendo ser extraído de tecidos superficiais de peixes (Lopera-Barrero et al., 2008).

Várias técnicas de análise de DNA foram criadas, porém, foi a partir do desenvolvimento da técnica de PCR (PCR, do Inglês, *Polymerase Chain Reaction*) que possibilitou avanços significativos na manipulação do material genético (Martins et al., 2002).

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi concebida por Kary Mullis (Matioli e Passos-Bueno, 2001). A técnica consiste na replicação do DNA “in vitro”, catalisada por uma DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxiucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos sintéticos, complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar.

Esses oligonucleotídeos, denominados iniciadores ou *primers*, funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada *primer*. Cada ciclo de PCR envolve: a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°C; anelamento dos *primers* por redução da temperatura até o ponto ideal para a formação das pontes de hidrogênio entre cada par de *primer* e a fita molde; e extensão da síntese da nova fita de DNA (Reginato et al., 2001).

Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a sequência-alvo, de maneira que uma cópia desta sequência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da sequência dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de sequência alvo. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma sequência específica de interesse (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os produtos da amplificação podem ser visualizados diretamente em gel de agarose ou poliacrilamida (Marques et al., 2002).

Esta otimização aliada com a alta especificidade e sensibilidade tornou a PCR a principal técnica de diagnóstico molecular e ferramenta essencial nos mais diversos campos da investigação genética (Marques et al., 2002). Particularmente, a tecnologia de PCR tem sido amplamente aplicada na identificação de marcadores de DNA úteis na aquicultura e na conservação de estoques naturais de espécies de peixes (Martins et al., 2002).

## **1.9. Marcador molecular**

Um marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA, expresso ou não, como sequência de nucleotídeos que pode ou não ser conhecida (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os principais tipos de marcadores moleculares, de acordo com Milach (1998), podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: marcadores que usam hibridização (*RFLP–Restriction Fragmented Length Polymorphism*, *VNTR–Variable Number of Tandem Repeats*) e aqueles que usam a amplificação do DNA (*RAPD–Random Amplified Polymorphic DNA*, *SSR–Simple Sequence Repeats*, *AFLP–Amplified Fragment Length Polymorphism*, *Microsatélite*).

Uma série de marcadores baseados em PCR foi desenvolvida nos últimos anos. Dentre as técnicas moleculares, o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e microsatélite são os mais usados em estudos genéticos de peixes (Liu e Cordes, 2004).

## **1.10. Marcador molecular RAPD**

A técnica de RAPD foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. Williams et al., (1990) patentaram a tecnologia com o nome mais comumente utilizado em inglês *Random Amplified Polymorphic DNA* e em português DNA polimófico amplificado ao acaso.

RAPD é basicamente uma variação do protocolo de PCR, com duas características distintivas: utiliza *primer* único ao invés de um par de *primers*; e esse *primer* único tem sequência arbitrária, e portanto sua sequência-alvo é desconhecida. Normalmente, os *primers* apresentam 10 bases de comprimento (Dinesh et al., 1993).

Para que haja amplificação de um fragmento de DNA a partir do uso de *primer* para RAPD, duas sequências de DNA complementares ao *primer* arbitrário devem estar suficientemente adjacentes e em orientação oposta, de maneira a permitir a amplificação exponencial de um segmento de DNA pela DNA polimerase. Em função da grande quantidade de DNA produzido, este segmento pode ser visualizado diretamente na forma de um fragmento num gel de eletroforese. A eletroforese é geralmente conduzida em gel de agarose e a visualização é feita com brometo de etídio em luz ultravioleta. Tipicamente, cada *primer* arbitrário utilizado dirige a síntese de vários segmentos de DNA simultaneamente em diversos pontos do genoma, resultando assim, em várias bandas no gel (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Dinesh et al., 1993).

O número de fragmentos obtidos pela técnica RAPD é ilimitado, uma vez que vários *primers* podem ser utilizados e as sequências destes fragmentos compreendem desde sequências de cópia única até altamente repetida, o que dá um aumento na variação genética (Oliveira et al., 2002).

A ampla utilização da técnica RAPD deve-se principalmente a sua rapidez; relativa acessibilidade; alto polimorfismo; pequena quantidade de material biológico para extração de DNA; a não-necessidade do conhecimento prévio do genoma; visualização direta em gel e por não utilizar sondas, é eliminada a necessidade de isótopos radioativos ou marcação não-radioativa (Bártfai et al., 2003; Ferreira e Grattapaglia, 1998). O marcador RAPD é o de menor custo, é exigido pequeno número de etapas, pouco tempo para obter os resultados e facilidade de implementação (Milach, 1998).

As limitações desta técnica ficam por conta de sua expressão alélica dominante, ou seja, genótipos heterozigotos não podem ser discriminados dos homozigotos; dificuldade de assumir homologia entre dois fragmentos (Lynch e Milligan, 1994; Ferreira e Grattapaglia, 1998); sensibilidade a pequenas modificações de concentrações dos componentes da reação e da baixa reprodutibilidade de um laboratório para outro (Pérez et al., 1998).

Dentre as técnicas moleculares, a de RAPD tem sido rotineiramente utilizada para caracterização de populações, espécies e linhagens, pois, com base em eventos

recentes, permitem a inferência de relações de parentesco entre indivíduos de uma dada população e da história de divergência entre populações de uma mesma espécie (Marques, 2002; Povh et al., 2005). Segundo Moreira et al. (2003), a técnica de RAPD é uma ferramenta adequada para o melhoramento genético em peixes.

Além do uso clássico na estimativa de similaridade genética entre populações, os marcadores RAPD foram utilizados com sucesso em grande número de trabalhos na obtenção de padrões de espécies específicos em peixes (Dinesh et al., 1993, Takagi e Taniguchi, 1995 e Callejas e Ochando, 1998) e na estimativa de relações filogenéticas entre espécies e subespécies (Bardakci e Skibinski, 1994, Callejas e Ochando, 1998).

### **1.11. Monitoramento da diversidade genética de peixes**

Como se pode observar, a introdução de peixes nos rios é uma prática muito comum no Brasil. No entanto, estes peixes normalmente são provenientes de poucos casais (pequeno número efetivo de reprodutores –  $N_e$ ) pela alta prolificidade dos peixes, o que tende a promover um gargalo genético (efeito *bottleneck*), levando à uma redução da variabilidade genética (Povh et al., 2006).

Introduções de peixes de forma irracional, mesmo feitas com as melhores intenções, podem proporcionar a redução da variabilidade genética e, conseqüentemente, levar à perda de resistência às doenças e da capacidade de se adaptar em um novo ambiente (Allendorf e Phelps, 1980; Taniguchi, 2003).

Mesmo a reprodução de um grande número de peixes não garante que a progênie apresentará alta variabilidade, pois é comum que na formação dos reprodutores sejam utilizados peixes da própria piscicultura, o que pode favorecer o acasalamento entre reprodutores aparentados (endogamia), conduzindo a um aumento da homozigose e, conseqüentemente, da variabilidade genética (Moreira et al., 2003; Povh et al., 2006).

A seleção não-intencional dos peixes, como a escolha para a reprodução dos animais menores ou maiores, mais bonitos, e também pela não-utilização de todo o período reprodutivo de uma espécie reofílica, também são fatores que podem

proporcionar grande redução da variabilidade genética nas gerações subsequentes (Povh et al., 2006).

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

Segundo Vasemägi et al. (2005) e Sønstebø et al. (2007), a mistura (cruzamento) de peixes da população nativa com peixes liberados no ambiente pode promover a perda de alelos importantes para a adaptação local. Isso porque cada população de uma determinada espécie possui um *pool* de alelos diferentes para a adaptação local e, quando um local é reabastecido com indivíduos criados em cativeiro que não se originaram do hábitat da população nativa, alelos importantes para sobrevivência naquele hábitat podem ser reduzidos ou mesmo perdidos (Almeida et al., 2003; Leuzzi et al., 2004). Desta forma, qualquer tentativa para reabilitar populações reduzidas depende de manter tão íntimo quanto possível a variabilidade genética da população selvagem com os peixes que serão liberados no ambiente.

É evidente o impacto que as espécies nativas têm sofrido, assim, os estoques de reprodutores podem ser uma alternativa para a recuperação da diversidade genética, promovendo a manutenção dos recursos genéticos com práticas como o repovoamento dos rios, principalmente quando existe risco de extinção (Koljonen et al., 2002; Barroso et al., 2005).

Frente a este cenário, qualquer ação que vise à recuperação do ambiente deve buscar o monitoramento por meios científicos. Para este propósito, os marcadores moleculares são uma das metodologias mais adequadas (Povh et al., 2006).

### **1.12. Conservação da espécie *Salminus brasiliensis***

Uma série de trabalhos que envolvendo o *S. brasiliensis* foi publicado, tais como que envolve reprodução (Dumont-Neto et al., 1997), eventos ontogenéticos

(Santos et al., 2002); avaliação do desempenho (Fracalossi et al., 2004) e o rendimento de recruta (Feitosa et al., 2004), estudando a anatomia (Rodrigues e Menin, 2006) e a larvicultura (Vega-Orellana et al., 2006).

Porém, os estudos que envolvem o monitoramento genético ainda são incipientes. Alguns autores como: Hoffmann et al. (2005) iniciaram estudos avaliando a diversidade de uma série de espécies coletadas no rio Paranapanema e na bacia do alto rio Paraná; Ramella et al. (2006) analisaram a variabilidade genética de quatro espécies, entre elas do *S. brasiliensis*, coletados na base do rio Uruguai e Lopes et al. (2007) avaliaram a estrutura genética de dourado coletados na usina hidrelétrica de Canoas – rio Paranapanema. Portanto esta linha de estudo é promissora e vários artigos tendem a ser publicados, considerando a extinção desta espécie em uma série de reservatórios e a necessidade de realização de técnicas de repovoamento visando conservá-la.

### 1.13. Referências

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR., H.F.; BORGHETTI, J.R. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. **Revista UNIMAR, Maringá**, v. 14, p. 89-107, 1992.

AGOSTINHO, A.A.; OKADA, E.K.; GREGORIS, J. Características económicas y sociales de las actividades pesqueras en el embalse de Itaipu, Brasil. In: SIMPOSIO REGIONAL SOBRE MANEJO DE LA PESCA EN EMBALSES EN AMERICA LATINA, 24 al 28 oct 1994, Habana, Cuba. [Rome]: FAO, 1994. p.100.

AGOSTINHO, A.A.; VAZZOLER, A.E.A.M.; THOMAZ, S.M. The high river Paraná basin: limnological and ichthyological aspects. p.59-103 In: TUNDISI, J.G.; BICUDO, C.E.M.; MATSUMURA-TUNDISI, T. (Ed.) **Limnology in Brazil**, Rio de Janeiro: ABC/SBL, 1995. 384p.

AGOSTINHO, A.A.; JÚLIO JR, H.F.; GOMES, L.C.; BINI, L.M., AGOSTINHO, C.S. Composição, abundância e distribuição espaço-temporal da ictiofauna. In: VAZZOLER, A.E.A. de M.; AGOSTINHO, A.A.; HAHN, N.S. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos**. Maringá: EDUEM, 1997. p.229-248.

ALBERTS, B.; JONHSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALKE, P. **Biologia molecular da célula**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.

ALI, M; WOOTON, R.J. Effect of Variable Food on Reproductive performance Breeding Female Three-spined Stichlebacks. **Journal of Fish Biology**, v.55, n.5, p. 1040-1053, 1999.

ALLENDORF, F.W.; PHELP, S.R. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. **Trans. Am. Fish. Soc.**, v. 109, p. 537-543, 1980.

ALMEIDA, F.S., SODRÉ, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 301-305, 2003.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005. 470p.

BAILEY, C. Aquaculture and basic human needs. **World Aquaculture**, Amsterdam, v. 28, p. 28-31, 1997.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, Oxford, v.73, p. 117-123, 1994.

BARROSO, R.M; HILSDORF, A.W.S; MOREIRA, H.L.M; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia) using microsatellites. **Aquaculture**, v. 247, p. 51-65, 2005.

BÁRTFAI, R.; EGEDI, S.; YUE, G.H.; KOVACS, B.; URBANYI, B.; TAMAS, G.; HORVATH, L.; ORBAN, L. Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture**, Amsterdam, v 219, p. 157-167, 2003.

BRITSK, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.Q.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. Brasília: CODEVASF, 1988. 115p.

BRITTO, S.G.C., SIROL, R.N., VIANNA, N.C., JARDIM, S.M., SANTOS, J.C., PELISARI, E. **Peixes do rio Paranapanema. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema**, 2003.112 p.

CALLEJAS, C.; OCHANDO, M.D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. **Journal of Fish Biology**, London, v.53, p. 208-215, 1998.

CARVALHO, E.D.; BRITTO, S.G.C.; ORSI, M.L. O panorama das introduções de peixes na bacia hidrográfica do Rio Paranapanema, Alto Paraná, Brasil. In: ESPÍNOLA, E. L.; ROCHA, O. (Eds.) **Impacto da piscicultura e da introdução de espécies exóticas nas bacias hidrográficas**. São Carlos: NEEA/CRHEA, USP. No prelo.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTO, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.; MELO, A.L.A.; STOPIGLIA, R.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.; CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z.; LIMA, F.C. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 3, p. 1-14, 2003.

DINESH, K.R.; LIM, T.M.; CHUA, K.L.; CHAN, W.K.; PHANG, V.P.E. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprint in fishes. **Zoological Science**, Tokyo, v. 10, n. 5, p. 849-954, 1993.

DUMONT-NETO, R.; PELLI, A.; FREITAS, R.O.de; COSTA, C.L.da; BARBOSA, N.D.deCAMPOS. Reprodução induzida do dourado (*Salminus maxillosus*, Valenciennes, 1849), na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental de Volta Grande- Cemig/EPDA-VG. **Revista UNIMAR**, v.19, p. 439-445, 1997.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**. UFV, Viçosa, Brasil. 1987. 279p.

FAO (Food and Agriculture Organization of United Nations).Yearbook of fishery statistics: summary tables. FAO, Roma. <http://www.fao.org>. 2008.

FEITOSA, L.A.; FERNANDES, R.; COSTA, R.S.da; GOMES, L.C.; AGOSTINHO, A.A. Parâmetros populacionais e simulação do rendimento por recruta de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) do alto rio Paraná. **Acta Scientiarum**. Biological Sciences Maringá, v. 26, n. 3, p. 317-323, 2004.



FERREIRA, M.E; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3<sup>a</sup> edição. EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20., Brasília, 1998. 220p.

FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M.; ZANIBONI-FILHO, E. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum**. Animal Sciences Maringá, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

GODOY, M.P.de. **Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da Bacia do Rio Mogi Guassú**. Piracicaba: Editora Franciscana, v.4 , 1975.

GODOY, M.P. **Peixes do estado de santa Catarina**. Florianópolis: UFSC, Co-Edição ELETROSUL/FURB, 1987 572p.

GUTTMAN, S.I.; BERG, D. Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. **Setac News**, 1998. p.23-24.

HILSDORF, A.W.S., RESENDE, E.K., MARQUES, D.K.S. **Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 44p.

HOFFMANN, A.C.; ORSI, M. L.; SHIBATTA, O.A. Diversidade de peixes do reservatório da UHE Escola Engenharia Mackenzie (Capivara), Rio Paranapanema, bacia do alto rio Paraná, Brasil, e a importância dos grandes tributários na sua manutenção. **Iheringia, Sér. Zool.** [online], vol.95, n.3, p. 319-325, 2005.

Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), Diretoria de Fauna e Recursos Pesqueiros. Estatística da Pesca, 2005: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: IBAMA, 2007. p.147.

KOCH, W.R., MILANI, P.C., GROSSER, K. M. **Guia Ilustrado de Peixes Parque Delta do Jacuí**. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2000. 91p.

KOLJONEN, M.L.; TÄHTINEN, J; SÄISÄ, M.; KOSKINIEMI, J. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. **Aquaculture**, v. 212, p. 69-92, 2002.

KUBITZA, F.; ONO, E.A.; CAMPOS, J.L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. **Panorama da Aqüicultura**. Rio de Janeiro, julho/agosto, v. 17, p. 14-23, 2007.

LEUZZI, M.S.P.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; SODRÉ, L.M.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, p. 355-362, 2004.

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., POVH, J.A., RIBEIRO, R.P., GOMES, P.C., JACOMETO, C.B., LOPES, T da S. Comparación de protocolos de extracción de ADN com muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Cien. Inv. Agr.**, v. 35, n. 1., 2008.

LOPES, C.M.; ALMEIDA, F.S.de; ORSI, M.L.; BRITTO, S.G.deC.; SIROL, R.N.; KOELBLINGER, L.M. Fish passage ladders from Canoas Complex Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v.5, n. 2, p.131-138, 2007.

LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas. Louisiana. **The World Aquaculture Society**, v.2, p. 133-140, 2000.

LYNCH, M; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, Oxford, v.3, p. 91-99, 1994.

MARQUES, D.K.S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: EMBRAPA – Pantanal. Documentos 36, 2002, 22p.

MARQUES, E.K.; IKUTA, N.; LUNGE, V.R.; FONSECA, A.S.K. Diagnóstico molecular e biotecnologia. In: SERAFINI, L.A.; BARROS, N.M. & AZEVEDO, J.L. **Biotecnologia: avanços na agricultura e na agroindústria**. Caxias do Sul, 2002. 433p.

MARTINS, C.; PORTO-FORESTI, F.P.; WASKO, A.P.; LEITÃO, G.R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.5, n.28, set-out, p.12-15, 2002.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R.dos S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.

MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. **Marcadores moleculares em plantas**. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 17-28.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, DO DESENVOLVIMENTO RURAL E DAS PESCAS. **Repovoamentos piscícolas**. Disponível em: [www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/repovoamentos\\_piscicolas.pdf](http://www.drapc.min-agricultura.pt/base/documentos/repovoamentos_piscicolas.pdf). Acesso em: 06 nov.2008.

MORAIS-FILHO, M.B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do dourado (Salminus maxillosus Val.) do rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**. São Paulo: Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca, 1955.

MOREIRA, H.L.M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R.P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da moderna Aqüicultura**. Ed. ULBRA, 2001. 200p.

MOREIRA, H.L.M.; ZIMMERMANN, S.; RIBEIRO, R.P.; BASTOS, R.G.; VARGAS, L.; POVH, J.A.. 2003. The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: **World Aquaculture Society**. Salvador: INVE, v. 2, 2003, 460p.

OETTERER, M. **Industrialização do pescado cultivado**. Guaíba: Agropecuária, 2002. 200p.

OKADA, E. K. **Gradientes espaço-temporais na pesca artesanal no reservatório de Itaipu-PR, Brasil**. 2001. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná.

OLIVEIRA, A.V.; PRIOLI, J.A.; PRIOLI, S.M.A.P.; PAVANELLI, C.S.; JÚLIO Jr., H.F.; PANARARI, R.S. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. **Genetica**, v. 115, p. 259-257, 2002.

PAIVA, M. P. **Peixes e Pescas de Águas Interiores do Brasil**. Brasília: Editerra, 1983, 158p.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Durham, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMÍNGUEZ, A. A Evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, Oxford. v.7, p. 1347-1357, 1998.

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

POVH, J. A.; MOREIRA, H.L.M; RIBEIRO, R.P.; PRIOLI, A.J.; VARGAS, L.; BLANCK, D.V.; GASPARINO, E. STREIT, JR., D.P. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; MANGOLIN, C.A.; GASPARINO, E.; LOPERA-BARRERO, N.M.; GOMES, P.C.; STREIT JR, D.P.; VARGAS, L. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. In: AQUACIÊNCIA, 2006, Bento Gonçalves. **Anais**. Aqüicultura e Sociedade. Bento Gonçalves : Aquabio e UFRG, 2006.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; STREIT JR, D.P.; GOMES, P.C.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; LOPES, T.S.; JACOMETO, C.B.; OLIVEIRA, S.N. Efeito da reprodução pelo sistema por extrusão na variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus*. In: I CONGRESSO BRASILEIRO DE PRODUÇÃO DE PEIXES NATIVOS DE ÁGUA DOCE E I ENCONTRO DE PISCICULTORES DE MATO GROSSO DO SUL, 2007, Dourados-MS. **Anais**, 2007.

RAMELLA, M.S.; KROTH, M.A.; MEURER, S.; NUÑER, A.P.deO.; ZANIBONI-FILHO, E.; ARISIL, A.C.M. Genetic variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. **Brazilian Archives of Biology Technology**, v. 49, n. 4 : p. 589-598, July, 2006.

REGINATO, L.C.A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGINATO, L.C.A. e COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: EMBRAPA, 2001. p. 25-39.

RODRIGUES, S.S.; MENIN, E. Anatomia da cavidade bucofaringeana de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1817) (Pisces, Characidae, Salmininae). **Biotemas**, v.19, n. 1, p. 41-50, março, 2006.

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

SANTOS, J.E.dos; GODINHO, H.P. Ontogenic events and swimming behavior of larvae of the characid fish *Salminus brasiliensis* (Cuvier) (Characiformes, Characidae) under laboratory conditions. **Rev. Bras. Zool.** [online], vol.19, n.1, p. 163-171, 2002.

SCORVO-FILHO, J.D.; AYROSA, L.M.S. São Paulo: a situação da piscicultura no Estado. **Panorama da Aqüicultura**, v.6, p.18-19, 1996.

SIROL, R.N.; BRITTO S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: Repovoamento. IN: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. E. **Ecologia de Reservatórios: Impactos potenciais, ações de manejo e sistemas de cascata**. São Carlos: RiMa, p. 275-284, 2005.

SIROL, R.N.; STREIT JR., D.P.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. Sistema de reprodução seminatural (Prelo), 2007.

STREIT JR., D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; CAÇADOR, W.C.; SAKAGUTI, E.S.; POVH, J.A.; SOUZA, E.D. Estudos comparativo da indução hormonal da espermiacção em piavuçu (*Leporinus macrocephalus*) com extrato de hipófise de frango, coelho e carpa. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 261-266, Abr./Jun, 2003.

SØNSTEBØ, J.H.; BORGSTRØM, R.; HEUN, M. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. **Conservation Genetics**, v. 8, p. 33-44; 2007.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p. 199-203, 2000.

SUZUKI, J.I.; AGOSTINHO, A.A. Reprodução de Peixes do reservatório de Segredo. In: AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C. (Eds.). **Reservatório de Segredo: bases para o manejo**. EDUEM, Maringá, Paraná, p. 163-182, 1997.

TAKAGI, M.; TANIGUSHI, N. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. **Fisheries Science**, v. 61, n. 5, p. 884-885, 1995.

TANIGUCHI, N. Genetic factors in broodstock management for seed production. **Reviews Fish Biology and Fisheries**, v. 13, p. 175-185, 2003.

TORLONI, C.E.C. Reprodução de peixes autóctones reofílicos no reservatório de Promissão, SP, CESP, 1986. 14 p.

VALENTI, W.C.; POLI, C.R.; PEREIRA, J.A.; BORGHETTI, J.R. **Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq, 2000. 399p.

VASEMÄGI, A.; CROSS, R.; PAAVER, T.; KOLJONEN, M.L. AND NILSSON, J. Extensive immigration from compensatory hatchery releases into wild *Atlantic salmon* population in the Baltic sea: spatio-temporal analysis over 18 years. **Heredity**, v. 95, p. 76-83, 2005.

VAZZOLER, A.E.A.deM.; SUZUKI, H.I.; MARQUES, E.E.; LIZAMA, M.A.P., 1997, Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução, p. 249-265. In: A.E.A. de M. Vazzoler, A.A. Agostinho, Hahn, N.S., **A Planície de Inundação do Alto Rio Paraná**. Maringá, EDUEM, 1997, 460p.

VEGA-ORELLANA, O.M.; FRACALOSSO, D.M.; SUGAI, J.K. Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. **Aquaculture**, v. 252, p. 484-493, March 2006.

VINATEA A. L. **Fundamentos de aqüicultura**. Florianópolis: Ed. USFC, 2004. 348p.

WARD, R.D.; GREWE, P.M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. **Molecular geneticis in fisheries**. London: Chapman & Hall, 1995. p.29-54.

WEINGARTNER N., ZANIBONI FILHO E. Dourado. In: BALDISSEROTO B.; CARVALHO GOMES L. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Editora UFSM, 470 p., 2005.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOOTTON, R. J. **Ecology of teleost fishes**. Chapman & Hall, London, 1990.

ZANIBONI-FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. **Revista Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 69-77, 2000.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O.; MEURER, S.; REYNALTE-TATAJE, D.A.; IACZINSKI, P. Monitoramento e Manejo da Ictiofauna do Alto Rio Uruguai – Espécies Migradoras – UHE Machadinho – **Relatório Final** – LAPAD. Florianópolis, SC. janeiro, 2002, 83p.

ZANIBONI-FILHO, E., NUÑER, A.P.O. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N. (Eds.), **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. TecArt, São Paulo, 2004, 533p.

## II- OBJETIVOS GERAIS

Os objetivos do presente trabalho foram:

1) verificar se ocorre a transposição de indivíduos de *Salminus brasiliensis* na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I;

2) avaliar a diversidade genética de indivíduos de *S. brasiliensis*;

3) e também avaliar a diversidade genética de reprodutores de dourado e de sua progênie, que serão utilizados em programas de repovoamento do rio Paranapanema através do marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).



**III- DIVERSIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE DOURADO  
COLETADOS NA ESCADA DE TRANSPOSIÇÃO DA  
HIDRELÉTRICA DE CANOAS I**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: Pesquisa Agropecuária Brasileira**

**“Genetic diversity of populations collected at passage ladders of the hidreletric  
plants Canoas I”**

### **Diversidade genética de populações de dourado coletados na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I**

Resumo – O objetivo do presente trabalho foi coletar reprodutores de *Salminus brasiliensis* em três intervalos de tempo distintos (14 (A), 18 (B) e 25 (C) de fevereiro de 2008) na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I, com intuito de verificar se ocorre a transposição de indivíduos de dourado e avaliar a diversidade genética destes indivíduos, utilizando o marcador RAPD. Foram avaliados oito *primers* que apresentaram bom padrão de amplificação. Observaram-se valores de polimorfismo alto para as amostras A e B (71,43; 63,81%) e baixo para as amostras C (33,33%). Pela análise da diversidade genética (*Gst*) foi observada alta diferenciação genética entre os indivíduos coletados nos três períodos (0,21). O gráfico ordenado em coordenadas principais é coerentes com a diferenciação genética. Os resultados deste estudo indicam que a escada de transposição de Canoas I permite a transposição de dourado no trecho do médio Paranapanema. Os indivíduos coletados nos três diferentes períodos na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I podem ser utilizados para renovar o estoque de reprodutores da Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande (SP).

Termos para indexação: marcador molecular, peixe, RAPD, programas de repovoamento, *Salminus brasiliensis*.

### **Genetic diversity of populations collected at passage ladders of the hidreletric plants Canoas I**

Abstract – The aim of this study was to collect breeders of *Salminus brasiliensis* at three different time periods (14<sup>th</sup> (A), 18<sup>th</sup> (B) and 25<sup>th</sup> (C), February 2008) at the transposition stairs of the hydroelectric plant of Canoas I, aiming at verifying if there is transposition of individuals and evaluating the genetic diversity of these individuals through the RAPD marker. We evaluated eight primers that showed good amplification pattern. The observed values of polymorphism were high for samples A and B (71.43, 63.81%) and low for sample C (33.33%). Through the analysis of genetic diversity (*Gst*) it was observed a high genetic differentiation among the individuals collected at the three periods (0.21). The graph ordered in principal coordinates is consistent with genetic differentiation. The results of this study indicate that the transposition stairs of

Canoas I allow the transposition of the “dourado” at the middle Paranapanema River. And individuals collected at the three different periods from the transposition stairs of Canoas I could be used to renew the breeding stock of the Hydrology and Aquaculture Station of Salto Grande (SP).

Index terms: molecular marker, fish, RAPD, restock programs, *Salminus brasiliensis*.

## Introdução

O rio Paranapanema é um dos mais importantes afluentes da margem esquerda do rio Paraná, com uma bacia de 100.800km<sup>2</sup> que drena as regiões Sudoeste de São Paulo e Noroeste do Paraná, servindo ainda como divisor entre os dois Estados (Britto et al., 2003). Porém, nos últimos anos vem ocorrendo um declínio da captura de uma série de espécies nativas neste rio, entre elas está o dourado (*Salminus brasiliensis*).

Os principais fatores causadores desse declínio são: desmatamento da vegetação ciliar; excessivo esforço de pesca; captura de indivíduos jovens; drenagem de lagoas marginais; regulação do regime hidrológico dos rios; poluição das águas; e introdução de espécies exóticas (Zaniboni Filho, 2000). Além disso, atualmente, este rio possui 10 usinas em operação, entre elas a usina hidroelétrica de Canoas I, e uma ainda em construção, o que transformou o seu curso original em uma sucessão de reservatórios justapostos (Leuzzi et al., 2004), os quais interrompem a migração dos peixes, interferem no ciclo de vida dos organismos aquáticos, e produzem alterações importantes nos ecossistemas (Agostinho et al., 2003).

Nesse contexto, foi construída a escada de transposição para peixes em Canoas I, destinadas a permitir a passagem dos cardumes da jusante para a montante em rios barrados. Outra importante medida que visa à conservação da fauna piscícola é o desenvolvimento de métodos de repovoamento (Vinatea, 2004).

Embora empregado há mais de três décadas no Brasil, os programas de aumento dos estoques de peixes têm sido muito questionados, visto que a perda da diversidade genética dos peixes destinados à soltura nos rios pode tornar esta prática ineficiente, e assim como também acarretar em impactos na ictiofauna (Agostinho et al., 2005).

Dessa forma, o monitoramento genético é requerido para preservar a existência de variação genética das populações nativas, e isto contribuirá para promover a conservação e o aumento dos recursos exploráveis.

A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) tem sido utilizada com muito sucesso para a estimação do valor de diversidade genética em populações, espécies e linhagens de peixes (Povh et al., 2005).

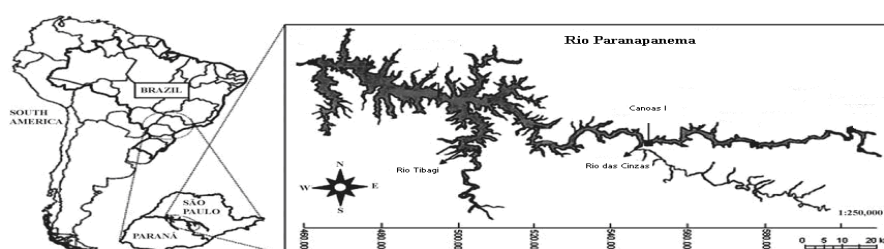
O objetivo do presente trabalho foi coletar reprodutores de *S. brasiliensis* em três intervalos de tempo distintos na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I, com intuito de verificar se ocorre a transposição de indivíduos de *S. brasiliensis* e avaliar a diversidade genética destes indivíduos para que seja renovado o estoque de dourado na Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande (SP), utilizando o marcador RAPD, para futuramente utilizar suas progênes em programas de repovoamento.

## Material e Métodos

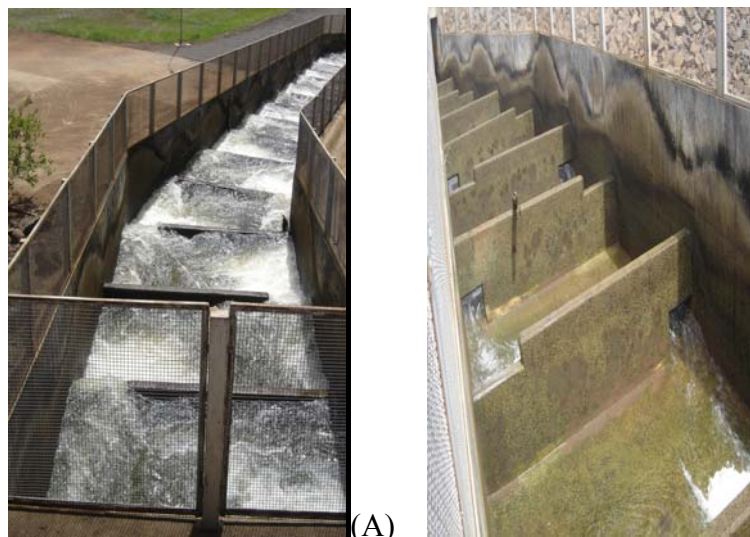
### Material biológico

A escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I ( $22^{\circ} 56' S$ ;  $50^{\circ} 31' W$ ), situada no médio rio Paranapanema (Figura 1) foi fechada em três intervalos de tempo distintos: 14, 18 e 25 de fevereiro de 2008) (Figura 2).

Nesses intervalos foram coletadas amostras de tecido da nadadeira caudal de *Salminus brasiliensis*; sendo 81 amostras coletadas dia 14, dos quais para fins de análise foram utilizadas 40 (A); 54 amostras coletadas dia 18, em que também para fins de análise foram utilizadas 40 (B) e sete amostras coletadas dia 25 de fevereiro de 2008 (C). Totalizando 87 indivíduos analisados.



**Figura 1.** Localização geográfica da escada de transposição de Canoas I, situada na bacia hidrográfica do rio Paranapanema.



**Figura 2.** Foto ilustrativa da escada de transposição de Canoas I, com seu fluxo normal (A) e fechada (B). Fonte: Arquivo pessoal de Patrícia Cristina Gomes.

Os indivíduos coletados nos três períodos permaneceram estocados na Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande (SP). Este estoque está sendo destinado à produção de alevinos para o programa de repovoamento do rio Paranapanema.

A avaliação da diversidade genética foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Estadual de Maringá (UEM-PR), Departamento de Zootecnia.

### **Extração de DNA**

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

### **Quantificação de DNA**

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

### **Amplificação do DNA**

As condições de amplificações foram baseadas nas descritas por Williams et al. (1990), com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15μl, no qual foi utilizado tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,46mM de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2mM de cada dNTPs, uma unidade de Taq DNA Polimerase, e 10ng de DNA. As reações de RAPD foram amplificadas num termociclador “Eppendorf Mastercycler<sup>®</sup> Gradient”, programado para 40 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 92°C, por quatro minutos e um passo final de extensão a 72°C, por cinco minutos. Cada ciclo consistiu de 40 segundos a 92°C, um minuto e trinta segundos a 40°C e dois minutos a 72°C.

Foram avaliados 60 *primers* do Kit Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, EUA). Para avaliar os diferentes estoques foram selecionados oito *primers*, que apresentaram bom padrão de amplificação.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,4%. Foram utilizados 15μl do produto amplificado e 2μl de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em 70 volts por quatro horas em uma cuba horizontal usando tampão TBE 1X (500mM de Tris-HCl, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA). Foi utilizado um controle negativo (N) para cada reação, onde sua amplificação foi executada adicionando-se todos os componentes, citados anteriormente, exceto o DNA.

Para a revelação do gel, utilizou-se um banho de brometo de etídeo a 0,5μg/ml, por 30 minutos. Posteriormente, os géis foram fotografados usando o sistema EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### **Análise dos dados**

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão DNA Ladder de 100pb (Invitrogen, Carlsbad, EUA).

A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo fragmento) foi usada para a construção de uma matriz de similaridade, codificando “1”, como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência.

A variabilidade genética para cada estoque foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos. Para esta análises foi utilizado o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). O programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997) foi utilizado para a determinação da frequência dos fragmentos polimórficos (critério de 95%).

Os valores de divergência entre os indivíduos foram determinados pela diversidade genética de Nei (1973) ( $G_{st}$ ), utilizando o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). Para a determinação do nível de diferenciação estabeleceu-se a definição proposta por Wright (1978), em que valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25; e maior que 0,25; indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética respectivamente.

Uma vez que a distância de Nei não é métrica, a dispersão em coordenadas principais foi construída após correção de Lingoes, utilizando o programa DistPCoA (Legendre e Anderson, 1998), sendo evidenciada por um gráfico utilizando o programa Statistica (data analysis software system), Inc., version 7.1 (2005).

### **Resultados e Discussão**

Pela análise em gel de agarose, observou-se que não ocorreu degradação do DNA em nenhuma das amostras e que também não houve excesso de proteína que pudesse prejudicar a amplificação. Desta forma, a extração de DNA de fragmentos de nadadeira utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente.

Na Tabela 1 estão apresentadas as sequências dos oito *primers* selecionados, a porcentagem das bases (G e C), o número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados.

**Tabela 1.** Sequências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de bases G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para dourado (*S. brasiliensis*), coletados em três períodos distintos.

<b>Primers</b>	<b>Sequência de nucleotídeos (3' → 5')</b>	<b>% (G+C)</b>	<b>Nº de fragmentos</b>	<b>Nº de fragmentos polimórficos</b>	<b>Tamanho dos fragmentos (pb)</b>
X-01	CTG GGC ACG A	70	11	07	550-2500
X-06	ACG CCA GAG G	70	13	05	400-2072
X-07	GAG CGA GGC T	70	12	10	600-2072
X-09	GGT CTG GTT G	60	19	17	200-2600
X-12	TCG CCA GCC A	70	08	04	700-2072
X-13	ACG GGA GCA A	60	13	10	400-2072
A-02	TGC CGA GCT G	70	17	17	200-2072
A-16	AGC CAG CGA A	60	12	09	300-2500
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>105</b>	<b>79</b>	<b>200-2600</b>

Todos os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD. O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis gerados por *primer* para as amostras de dourado coletados em três períodos distintos variou de oito a 19 e o tamanho desses produtos amplificados permaneceu entre 200-2600pb. Dos 105 fragmentos analisados para os oito *primers* randômicos, 79 foram polimórficos (75,2%) e 26 monomórficos (24,8%).

A porcentagem de fragmentos polimórficos para as amostras de dourado (*S. brasiliensis*), coletados na escada de transposição da hidroelétrica de Canoas I, em três períodos distintos, está apresentada na Tabela 2.

**Tabela 2.** Porcentagem de fragmentos polimórficos para amostras de dourado (*Salminus brasiliensis*), coletados em três períodos distintos, obtidos pelo programa Popgene 1.31.

<b>Amostras</b>	<b>% de Fragmentos Polimórficos</b>
<b>A</b>	71,43%
<b>B</b>	63,81%
<b>C</b>	33,33%

A porcentagem de fragmentos polimórficos foi maior para as amostras A (71,43%) e B (63,81%) quando comparados com as amostras C (33,33%). Tais dados



evidenciaram alta variabilidade genética para os indivíduos coletados no primeiro e segundo dia, enquanto que os indivíduos coletados no terceiro dia apresentam baixa variabilidade. Esta baixa variabilidade encontrada para os indivíduos C pode ter ocorrido em função do baixo número de amostras analisados (sete).

A Tabela 3 apresenta a frequência dos fragmentos polimórficos (critério de 95%) para as amostras de dourado (*S. brasiliensis*), coletados na escada de transposição da Hidrelétrica de Canoas I, em três períodos distintos.

**Tabela 3.** *Primer*, tamanho dos fragmentos, amostras de *S. brasiliensis* coletados em três períodos distintos com valores significativos pelo teste exato ( $p < 0,05$ ).

<i>Primer</i>	<i>Tamanho dos Fragmentos (pb)</i>	<i>Amostras A</i>	<i>Amostras B</i>	<i>Amostras C</i>	<i>p</i>
OPX01	2700	0,051	0,097	0,302	0,002
	2600	0,157	0,494	0,000	0,000
	500	0,189	0,039	0,000	0,002
	400	0,173	0,013	0,000	0,003
	300	0,189	0,013	0,000	0,002
OPX06	2700	0,194	0,000	0,000	0,001
OPX07	2700	0,051	0,293	0,000	0,001
	2500	0,163	0,526	0,000	0,001
	2072	0,452	1,000	0,000	0,000
	1900	0,106	0,613	0,476	0,002
	1700	0,367	0,726	0,000	0,001
	1000	0,367	0,842	0,842	0,001
	800	0,225	0,646	0,000	0,000
OPX09	2200	0,553	1,000	0,000	0,002
	2072	0,776	0,526	0,000	0,004
	2000	0,163	0,776	0,842	0,000
	1000	0,476	0,258	0,000	0,003
	800	0,311	0,106	0,000	0,001
	500	0,367	0,553	0,120	0,002
	320	0,258	0,025	0,000	0,001
OPX12	2100	0,225	0,000	0,552	0,002
	2072	0,225	0,000	0,552	0,002
OPX13	1900	0,452	1,000	0,000	0,001
	1100	0,452	0,000	0,842	0,002
	700	0,163	0,225	0,500	0,002
	500	0,293	0,367	0,613	0,001
OPA02	480	0,209	0,051	0,000	0,001
	380	0,194	0,013	0,000	0,001
OPA16	2700	0,430	0,414	0,000	0,000
	2500	0,324	0,134	0,000	0,000
	1400	1,000	0,258	0,367	0,000
	1300	0,225	0,000	0,014	0,000

Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na frequência de 32 dos 105 fragmentos encontrados. Fragmentos com baixa frequência (menor que 0,100) foram observados nas três amostragens, sendo encontrados dois, sete e um para as amostras A, B e C, respectivamente. Estas também apresentaram 25 fragmentos ausentes (frequência de 0,000), sendo encontrados cinco para a amostra B e 20 para a amostra C. Como foram coletadas amostras de dourado em ambiente natural, esta baixa frequência, bem como a ausência desses fragmentos encontrada pode ser explicada pelo fato que em ambiente natural não ocorre qualquer seleção durante o acasalamento entre os indivíduos.

Foram encontrados quatro fragmentos limitantes, sendo um para a amostra A e três para a amostra B e também um fragmento exclusivo para a amostragem A (*primer* OPX 06 com o fragmento de 2700pb). Estes resultados são indicações de que, apesar de os estoques apresentarem fragmentos com baixa frequência e ausentes, existe uma alta variabilidade genética dentro de cada população.

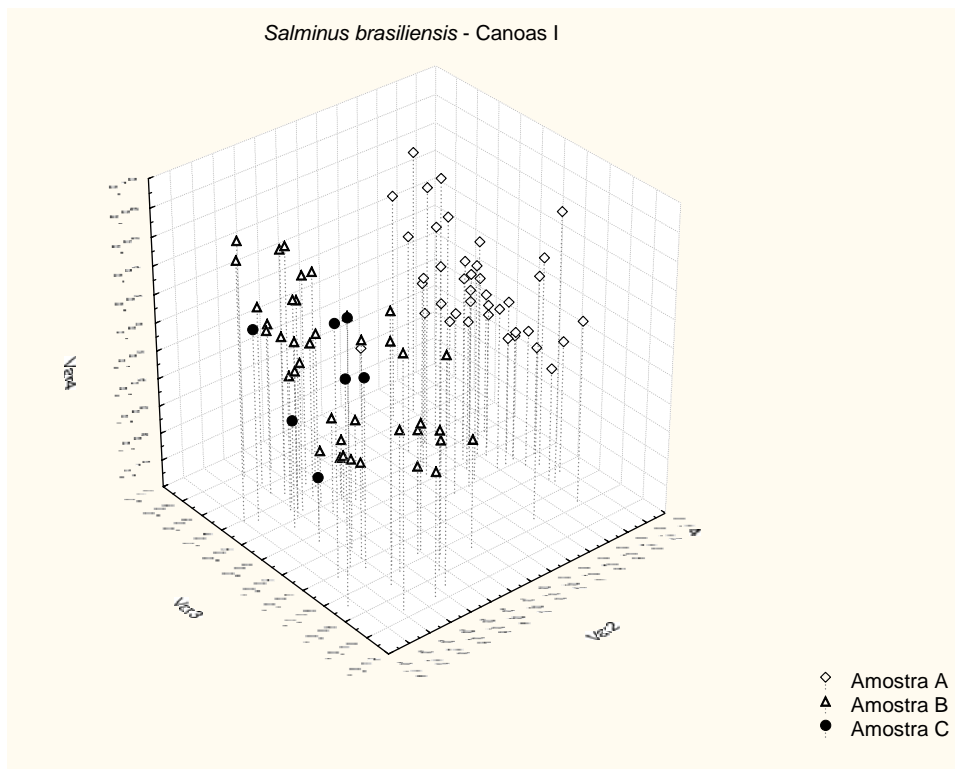
Os valores de diversidade genética ( $G_{st}$ ) entre os indivíduos de dourado, coletados nos três períodos distintos, podem ser observados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Diversidade genética ( $G_{st}$ ) obtidos entre os indivíduos de *S. brasiliensis*, coletados em três períodos distintos.

<b>Amostras</b>	<b><math>G_{st}</math></b>
A X B X C	0,21

A diversidade genética ( $G_{st}$ ) entre os indivíduos foi de 0,21, valor que sugere uma alta diferenciação genética, segundo a definição de Wright (1978).

Tais dados são evidenciados por meio do gráfico em coordenadas principais, obtidos com o programa Statistica, version 7.1 (Figura 3).



**Figura 3.** Gráfico de dispersão em coordenadas principais dos indivíduos de dourado, coletados em três períodos diferentes na escada de transposição da usina hidrelétrica de Canoas I.

De acordo com o gráfico de dispersão em coordenadas principais é possível identificar que as amostras B e C estão mais próximas geneticamente, enquanto que a amostra A está mais distante (porém, mais próxima da população B). O que sugere que ocorre transposição de indivíduos geneticamente diferentes em períodos distintos.

Britto e Sirol (2006) estudaram a transposição de peixes nas escadas do Complexo Canoas (Canoas I e Canoas II) durante quatro períodos reprodutivos consecutivos (2000/2001; 2001/2002; 2002/2003; 2003/2004), em que verificaram aumento porcentual na participação de Characiformes entre todos os períodos, sendo identificadas espécies migradoras e de curta e média atividade migratória. Para Canoas I, estes autores verificaram aumento porcentual de espécies migradoras, todas de médio e grande porte entre os anos 2001/2002 (58,73%) e 2002/2003 (88,96%), mas entre os anos 2003/2004 houve redução nessa participação (52,48%). Tais dados concordam com o presente estudo, em um período relativamente curto foi coletado grande número de exemplares da ordem Characiformes (*S. brasiliensis*), sendo coletados: 81 indivíduos no dia 14; 54 indivíduos no dia 18 e sete no dia 25 de fevereiro de 2008. Dessa forma, a escada de transposição de Canoas I permite a transposição de peixes, indicando que pode ser uma rota migratória alternativa no trecho do médio Paranapanema.

Lopes et al. (2007) também utilizaram a técnica de RAPD para estimar a variabilidade genética de grupos de *S. brasiliensis* coletados nas escadas de transposição de Canoas I e Canoas II – rio Paranapanema. Na hidrelétrica de Canoas I foram coletados 17 indivíduos em março de 2003 e 24 entre novembro de 2004 e março de 2005. Em Canoas II, foram coletados 19 indivíduos entre novembro de 2003 e março de 2004 e 27 entre novembro de 2004 e março de 2005. Estes autores estimaram a variabilidade genética por meio da porcentagem de fragmentos polimórficos. Para Canoas I obtiveram 42,19% de fragmento polimórficos e para Canoas II, 44,79%. Os dados permitiram concluir que o *S. brasiliensis* do Complexo Canoas tem um índice moderado de variabilidade genética quando comparado com outras espécies migradoras. Diferentemente ao encontrado no presente trabalho, onde se obtiveram valores elevados de fragmentos polimórficos para as amostras A e B, respectivamente, (71,43% e 63,81%) e valor inferior para a amostra C (33,33%), com um número inferior de indivíduos (sete).

Através da análise da diversidade genética ( $G_{st}$ ) foi observada uma alta diferenciação genética entre os indivíduos coletados nos três períodos. O gráfico ordenado em coordenadas principais é coerentes com a diferenciação genética.

Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que existem a mais de 10 anos programas de repovoamento oficiais ou privados incluindo para a espécie *S. brasiliensis* no rio Paranapanema, corroborando assim com essa disposição. Contudo, uma amostragem mais abrangente de indivíduos de ambos os grupos, assim como a utilização de marcadores microssatélites específicos, os quais ainda não foram definidos seria mais adequado para inferir se os peixes capturados na escada de transposição da usina hidrelétrica de Canoas I são oriundos de repovoamento.

Como as amostras A e B são geneticamente divergentes e a amostra C apresenta poucos indivíduos, tais indivíduos podem ser utilizadas para renovar o estoque de dourado da Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande (SP).

O monitoramento genético dos peixes jovens que serão soltos nos rios é fundamental para um programa de repovoamento, tendo em vista que a diminuição da variabilidade genética pode tornar um programa de repovoamento ineficiente, com baixa sobrevivência dos peixes jovens no ambiente, e proporcionar impactos genéticos irreversíveis na população nativa.

## Conclusões

1. A escada de transposição de Canoas I permite a transposição de dourado (*S. brasiliensis*) no trecho do médio Paranapanema.
2. Considerando o alto valor de fragmentos polimórficos e a alta diferenciação genética entre os indivíduos coletados nos três diferentes períodos na escada de transposição da hidrelétrica de Canoas I; estes, podem ser utilizadas para renovar o estoque de dourado Estação de Hidrologia e Aquicultura de Salto Grande (SP).

## Referências

- AGÊNCIA ESTADUAL DE NOTÍCIAS. **Soltura de peixes nos rios do Paraná**. Disponível em: <http://www.agenciadenoticias.pr.gov.br>. Acesso em: 06 nov. 2009.
- AGOSTINHO, A.A., GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I. Migratory fish of upper Paraná river basin. In: Carolsfed, J., B. Harvey, A. Baer and C. Ross (Ed.). **Migratory fishes of South America: Biology, Social Importance and Conservation Status**. World Fisheries Trust, Victoria, EE.UU, Brasil, 2003. p. 19–99.
- AGOSTINHO, A.A., THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, p. 70-78, 2005.
- BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; VIANNA, N.C.; JARDIM, S.M.; SANTOS, J.C.; PELISARI, E. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2003. 112 p.
- BRITTO, S.G.; SIROL, R.N. Transposição de peixes como forma de manejo: As escadas do Complexo Canoas, médio rio Paranapanema, Bacia do alto Paraná. Pp. 285-304. In: Nogueira M.G., R. Henry & A. Jorcín (Eds). **Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata**. São Carlos, Rima, 2005. 459p.
- DUKE ENERGY. **Meio ambiente**. Disponível em: <http://www.dukeenergy.com.br/PT/Meioambiente>. Acesso em 06 nov. 2009.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M.J. Distance-based redundancy analysis: testing multispecies responses in multifactorial ecological experiments. **Ecological Monographs**, v. 69, p. 1-24, 1999.

LEUZZI, M.S.P., ALMEIDA, F.S., ORSI, M.L., SODRÉ, L.M.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, v. 27, p. 355-362, 2004.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T.S. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 15-24, 2007.

LOPES, C.M.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; SODRÉ, L.M.K. Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v.5, p.131-138, 2007.

MILLER, M.P. Tools of population genetic analysis (TFPGA) 1.3: a **Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Utah State University, 1997.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v.70, p.3321-3323, 1973.

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.

POVH, J. A.; MOREIRA, H.L.M; RIBEIRO, R.P.; PRIOLI, A.J.; VARGAS, L.; BLANCK, D.V.; GASPARINO, E. STREIT, JR., D.P. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P; SIROL, R.N.; STREIT JR., D.P; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Diversidade genética de pacu do Rio

Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesq. agropec. bras.**, v.43, n.2, Brasília, Feb., 2008.

STATSOFT INC., 2005. Statistica (data analysis software system). Version 7.1. Available from: [www.statsoft.inc](http://www.statsoft.inc). Access in: 20 de Outubro de 2007.

VINATEA, A.L. **Fundamentos de aquicultura**. Florianópolis: Ed. USFC, 2004. 348p.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Res**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WRIGHT, S. Evolution and genetics of populations. University of Chicago Press, Chicago, 511 pp, 1978.

ZANIBONI FILHO, E. Larvicultura de peixes de água doce. **Revista Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 21, n. 203, p. 69-77, 2000.

**IV- DIVERSIDADE GENÉTICA DE DOURADO UTILIZADOS EM  
PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO**

**(a ser enviado para publicação)**

**Periódico: Pesquisa Agropecuária Brasileira**

**“Genetic diversity of dourado used in restocking programs”**



### **Diversidade genética de dourado utilizados em programas de repovoamento**

Resumo – O objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade genética de um estoque de *Salminus brasiliensis* utilizado em programas de repovoamento, através do marcador RAPD. Dez reprodutores (cinco machos e cinco fêmeas), 40 larvas e 40 alevinos foram analisados. Os oito primers analisados produziram 96 fragmentos dos quais 81,2% foram polimórficos. Houve diferença significativa na frequência de 32 dos 96 fragmentos, com a presença de um fragmento exclusivo nos alevinos. O índice de Shannon, a porcentagem de fragmentos polimórficos e a distância e identidade genética mostraram que houve menor distância genética entre os parentais e as larvas e também diminuição da variabilidade genética nos alevinos. A divergência genética foi menor no grupo dos alevinos. A análise de variância molecular mostrou que a maior parte da variação está dentro de cada grupo (90,05%) e não entre os grupos (9,95%). O estoque de reprodutores apresenta alta variabilidade genética e houve diferenciação genética entre a fase de larva e alevino.

Termos para indexação: marcador molecular, peixe, RAPD, programas de repovoamento, *Salminus brasiliensis*.

### **Genetic diversity of dourado used in stock enhancement programs in the Paranapanema river**

Abstract – The objective of this work was to estimate the genetic diversity of a *Salminus brasiliensis* lot used in stock enhancement programs, using microsatellite markers. Ten broodstocks (five males and five females), 40 larvae and 40 fingerlings were analyzed. The eight analyzed primers produced 96 fragments, of which 81.2% were polymorphic. There was significant difference in the frequency of 32 out of the 96 fragments with the presence of a exclusive fragment in the fingerlings. The Shannon index, the percentage of polymorphic fragments and the genetic distance and identity showed that there is less genetic distance between parental and larvae and a decrease of genetic variability in the fingerlings. Genetic divergence was low in fingerlings group. The analysis of molecular variance results showed that the major part of the genetic variation is within the groups (90.05%) and not between them (9.95%). The broodstock present high genetic

variability and the genetic differentiation was observed between larval and fingerling stages.

Index terms: molecular marker, fish, RAPD, stock enhancement programs, *Salminus brasiliensis*.

## Introdução

O *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) é representante da família Characidae, ordem Characiformes e classe dos Actinopterygii. Conhecido popularmente como dourado, este peixe apresenta ampla distribuição geográfica no território brasileiro, principalmente na Bacia do Prata formada pelos rios Paraguai, Paraná e Uruguai e na Bacia do rio São Francisco (Lima et al., 1993; Barbieri et al., 2001; Zaniboni-Filho, 2004).

Nos últimos anos tem ocorrido um decréscimo em sua captura no rio Paranapanema (Lopes et al., 2007). Uma importante medida mitigadora para a conservação, não só desta espécie, como também de toda fauna piscícola é o desenvolvimento de programas de repovoamento (Sirol & Britto, 2006). Tal medida vem sendo muito questionada, visto que a perda da diversidade genética dos peixes destinados à soltura nos rios pode tornar esta prática ineficiente, assim como também acarretar em impactos na ictiofauna (Agostinho et al., 2005).

De acordo com Povh et al. (2008), a produção de alevinos ou juvenis para soltura no ambiente pode provocar um grande impacto no potencial genético da população nativa, isto porque os estoques podem mostrar uma redução da variabilidade genética, o qual pode possibilitar a perda de resistência à doenças e a redução da capacidade de se adaptar em um novo ambiente. Desta forma, a intensiva prática de estocagem utilizando um manejo reprodutivo inapropriado, pode resultar em impactos sobre os estoques nativos em detrimientos genéticos. Os autores também destacaram que a perda de variação genética pode ocorrer devido ao efeito fundador, e pela utilização de um baixo número efetivo de reprodutores, portanto, um manejo reprodutivo adequado pode minimizar perdas genéticas na progênie.

Segundo e, o monitoramento da diversidade genética dos reprodutores e dos peixes que serão liberados no ambiente (Ortega-Villaizán Romo et al. 2006) e a participação multidisciplinar (Lopera-Barrero et al. 2007) são necessários para

assegurar um programa de repovoamento responsável e efetivo. Entre as técnicas moleculares a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) tem sido utilizada com sucesso para a estimativa do valor de diversidade genética em populações (Pamponet et al., 2008), espécies e linhagens de peixes (Sanches & Galetti Jr, 2007) e monitoramento genético de programas de conservação (Jacometo et al., 2010; Lopera-Barrero et al., 2010a).

O presente trabalho teve por objetivo avaliar através do marcador RAPD a diversidade genética de estoques de *Salminus brasiliensis*, que serão utilizados em programas de repovoamento do rio Paranapanema.

## **Material e Métodos**

### **Local**

O trabalho foi realizado em 2007 na Estação de Hidrologia e Aquicultura da *Duke Energy International*, localizada no município de Salto Grande (SP), em conjunto com o Laboratório de Biologia Molecular - Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (PR).

### **Material biológico**

Foram utilizados 10 reprodutores (5♂ e 5♀) de *S. brasiliensis* coletados aleatoriamente de uma população estocada há cinco anos nas instalações da Estação de Aquicultura e Hidrologia da *Duke Energy International*, localizada na cidade de Salto Grande – SP, Brasil. Esses indivíduos são provenientes de coletas realizadas nas escadas de transposição das usinas hidroelétricas de Canoas I e Canoas II, situadas no rio Paranapanema, SP.

### **Manejo reprodutivo**

O experimento foi realizado em novembro de 2007 nas instalações da Estação de Aquicultura e Hidrologia da *Duke Energy International*. Os 10 reprodutores foram conduzidos para o laboratório e induzidos à reprodução seminatural com extrato de hipófise de carpa. As fêmeas receberam 5,5mg kg<sup>-1</sup>, divididos em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira aplicação e 12 horas depois os 90% restantes. Os machos receberam 2,5mg kg<sup>-1</sup> em dose única. De todos os indivíduos foram coletadas amostras de nadadeira caudal (0,5cm aproximadamente), armazenadas em microtubos

de 1,5mL contendo álcool etílico 100% para a posterior extração e amplificação do DNA.

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

Aproximadamente seis horas depois da última indução (260 horas-grau, 27°C) foi dado início à coleta de ovos. Estabeleceu-se um período de coleta de seis horas, com a retirada dos ovos da incubadora de captação a cada hora sendo em seguida, conduzidos para as incubadoras do tipo cilindro cônicas onde ocorreu a incubação dos ovos. A porcentagem de mortalidade dos reprodutores (fêmea/macho) usados nos acasalamentos foi definida um dia depois da reprodução.

Dois dias depois da eclosão dos ovos, aproximadamente 200 larvas foram coletadas de forma aleatória de todas as incubadoras em todos os horários, sendo armazenadas em microtubos de 1,5mL contendo álcool etílico 100%. Dessas larvas, 40 foram coletadas aleatoriamente para posterior extração e amplificação do DNA.

Também foram coletadas 40 amostras de nadadeira caudal (0,5cm aproximadamente) de alevinos com 30 dias de idade e armazenadas em microtubos de 1,5mL contendo álcool etílico 100% para posterior extração e amplificação do DNA.

### **Extração de DNA**

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008). Em microtubos contendo as nadadeiras, foram adicionados 550µL de tampão de lise (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 100mM NaCl), SDS 1% e 7µL de proteinase K (200µg/mL). Foram incubadas em banho-maria à 50°C por 12 horas. O DNA foi precipitado com 600µL de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 min à 12.000rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos (600µL), precipitado com 700µL de álcool etílico absoluto e incubado por uma hora à -20°C. O DNA foi centrifugado, lavado com 700µL de álcool etílico 70%. O *pellet* foi seco por aproximadamente 20 minutos à temperatura ambiente e posteriormente

ressuspendido em 80mL de tampão TE (10mM Tris pH 8,0 e 1mM EDTA) e tratado com 7 $\mu$ L de RNase (30mg/mL) em banho-maria à 37°C por uma hora, e em seguida estocado no freezer à -20°C.

### **Quantificação de DNA**

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

### **Amplificação do DNA**

As condições de amplificações foram baseadas nas descritas por Williams et al. (1990), com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15 $\mu$ L, no qual se utilizou tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20mM pH 8,4 e KCl 50mM), 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,46mM de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2mM de cada dNTPs, uma unidade de Taq DNA Polimerase, e 10ng de DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas num termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”, programado para 40 ciclos, com um passo inicial de desnaturação à 92°C, por quatro minutos e um passo final de extensão à 72°C, por cinco minutos. Cada ciclo consistiu de 40 segundos à 92°C, um minuto e trinta segundos à 40°C e dois minutos à 72°C.

Foram avaliados 60 *primers* do Kit Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, EUA). Para avaliar os diferentes estoques foram selecionados oito, que apresentaram bom padrão de amplificação.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,4%. Foram utilizados 15 $\mu$ L do produto amplificado e 2 $\mu$ L de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em 70 volts por quatro horas em um cuba horizontal usando tampão TBE 1X (500mM de Tris-HCl, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA). Foi utilizado um controle negativo (N) para cada reação, onde sua amplificação foi executada adicionando-se todos os componentes, citados anteriormente, exceto o DNA alvo.

Para a revelação do gel, utilizou-se um banho de brometo de etídeo à 0,5µg/ml, por 30 minutos. Posteriormente, os géis foram fotografados usando o sistema EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### **Análise dos dados**

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão DNA Ladder de 100pb (Invitrogen®, EUA). A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo fragmento), foi usada para a construção de uma matriz de similaridade, codificando “1”, como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência.

O índice de diversidade genética de Shannon e a porcentagem de fragmentos polimórficos (critério de 95%) foram obtidos com o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). O programa TFGA 1.3 (Miller, 1997) foi utilizado para determinar a distância e identidade genética (Nei, 1978) entre os estoques e frequência dos fragmentos pelo teste exato (Raymond & Rousset, 1995). O programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005) foi utilizado para a análise de variância molecular. A significância desse teste foi verificada pelo método de permutações aleatórias com 10000 permutações. A divergência genética em cada estoque foi obtida com base no cálculo do coeficiente de Jaccard pelo método de Monte Carlo, através do programa MANTEL-STRUCT (Miller, 1999).

Uma vez que a distância de Nei não é métrica, a dispersão em coordenadas principais foi construída após correção de Lingoes, utilizando o programa DistPCoA (Legendre & Anderson, 1998), sendo evidenciada através de um gráfico utilizando o programa Statistica (data analysis software system), Inc., version 7.1 (2005).

## **Resultados e Discussão**

As sequências dos oito *primers* selecionados, a porcentagem das bases (G e C), o número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** *Primers*, sequências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de bases G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os parentais e a progênie de *Salminus brasiliensis*.

<b>Primers</b>	<b>Sequência de nucleotídeos (3' → 5')</b>	<b>% (G+C)</b>	<b>Nº de fragmentos</b>	<b>Nº de fragmentos polimórficos</b>	<b>Tamanho dos fragmentos (pb)</b>
X-01	CTG GGC ACG A	70	16	15	220-2700
X-06	ACG CCA GAG G	70	11	04	400-2700
X-07	GAG CGA GGC T	70	13	13	600-2700
X-09	GGT CTG GTT G	60	17	14	320-2200
X-12	TCG CCA GCC A	70	08	04	750-2100
X-13	ACG GGA GCA A	60	11	10	400-1900
A-02	TGC CGA GCT G	70	13	12	380-1800
A-16	AGC CAG CGA A	60	07	06	300-2700
<b>Total</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>96</b>	<b>78</b>	<b>220-2700</b>

Todos os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD. O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis geradas por *primer* nos três estoques variaram de sete a 17 e o tamanho desses produtos amplificados permaneceram entre 220-2700pb. Dos 96 fragmentos analisados para os oito *primers* randômicos, 78 foram polimórficos (81,25%) e 26 monomórficos (18,75%).

Foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na frequência de 32 dos 96 fragmentos. Fragmentos com baixa frequência (menor que 0,100) foram observados tanto nos parentais (2), quanto na sua progênie (larvas: 7 e alevinos 1). Estes também apresentaram 25 fragmentos ausentes (frequência de 0,000), sendo encontrados cinco para as larvas e 20 para os alevinos. Foram encontrados quatro fragmentos limitantes, sendo encontrado um nos parentais e três nas larvas. Um fragmento exclusivo foi observado nos parentais (*primer* OPX06 - 2700pb). A ausência de fragmentos excluídos e a presença de poucos fragmentos de baixa frequência caracterizaram uma variabilidade genética adequada no estoque de reprodutores. Por outro lado, a presença de fragmentos de baixa frequência, bem como a ausência de fragmentos denota um processo de perda de variabilidade genética entre as duas fases de crescimento da progênie (larvas e alevinos), com maior incidência nos alevinos (Tabela 2).

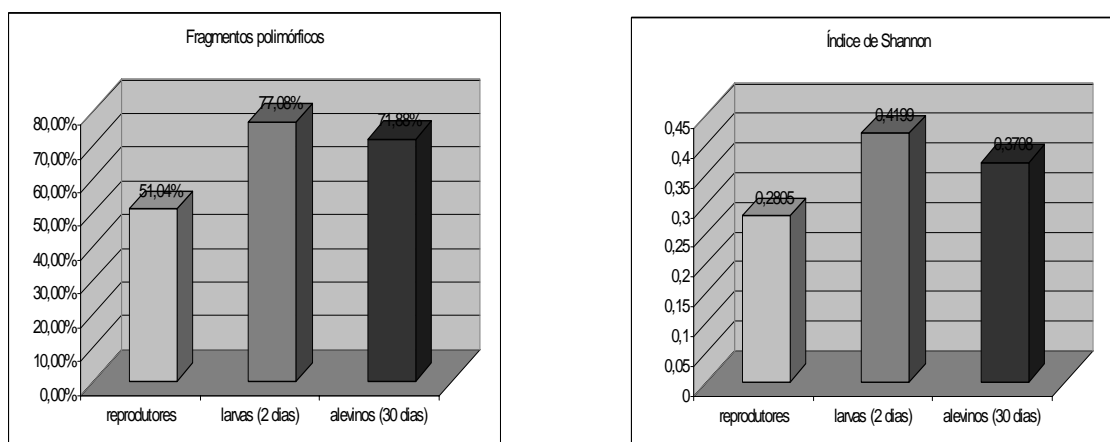
**Tabela 2.** Caracterização, tamanho (pb) e frequência dos fragmentos que apresentaram valores significativos pelo teste exato, para os parentais e a progênie de *S. brasiliensis*.

Primer	Tamanho (pb)	Parentais	Larvas	Alevinos	P
OPX01	2700	0,051	0,097	0,302	0,002
	2600	0,157	0,494	0,000	0,000
	500	0,189	0,039	0,000	0,002
	400	0,173	0,013	0,000	0,003
	300	0,189	0,013	0,000	0,002
OPX06	2700	0,194	0,000	0,000	0,001
OPX07	2700	0,051	0,293	0,000	0,001
	2500	0,163	0,526	0,000	0,001
	2072	0,452	1,000	0,000	0,000
	1900	0,106	0,613	0,476	0,002
	1700	0,367	0,726	0,000	0,001
	1000	0,367	0,842	0,842	0,001
	800	0,225	0,646	0,000	0,000
OPX09	2200	0,553	1,000	0,000	0,002
	2072	0,776	0,526	0,000	0,004
	2000	0,163	0,776	0,842	0,000
	1000	0,476	0,258	0,000	0,003
	800	0,311	0,106	0,000	0,001
	500	0,367	0,553	0,120	0,002
	320	0,258	0,025	0,000	0,001
OPX12	2100	0,225	0,000	0,552	0,002
	2072	0,225	0,000	0,552	0,002
OPX13	1900	0,452	1,000	0,000	0,001
	1100	0,452	0,000	0,842	0,002
	700	0,163	0,225	0,500	0,002
	500	0,293	0,367	0,613	0,001
OPA02	480	0,209	0,051	0,000	0,001
	380	0,194	0,013	0,000	0,001
OPA16	2700	0,430	0,414	0,000	0,000
	2500	0,324	0,134	0,000	0,000
	1400	1,000	0,258	0,367	0,000
	1300	0,225	0,000	0,014	0,000

Os resultados de variabilidade genética estimados pela porcentagem de fragmentos polimórficos (FP) e índice de Shannon (IS) foram superiores para progênie quando comparados com os parentais (Figura 1). A maior divergência genética nas larvas (0,275) em relação aos parentais (0,268) confirma a maior variabilidade dos indivíduos da progênie. De acordo com a análise de variância molecular (AMOVA) a maior parte da variação genética está dentro de cada estoque (90,05%) e não entre os estoques (9,95%) de *S. brasiliensis* (Tabela 3). Esses resultados são também confirmados com as estimativas da identidade e da distância genética (Tabela 3). Tais



dados evidenciaram que a variabilidade genética dos parentais foi preservada na progênie, concordando também com os resultados da frequência dos fragmentos.



**Figura 1.** Porcentagem de fragmentos polimórficos e índice de Shannon obtidos para os parentais e a progênie de *S. brasiliensis*.

De acordo com Lopera Barrero et al. (2010b), é esperado que, em estoques mantidos em cativeiro, exista uma diminuição da variabilidade genética, em consequência do efeito da seleção intencional e do acasalamento entre parentais. Contudo, pelos resultados observados é presumível supor que o efeito gargalo (*bottleneck effect*) não o influenciou, indicando que houve adequado manejo reprodutivo, em que a formação do estoque com suficiente variabilidade genética e a utilização de sistemas reprodutivos eficientes possivelmente permitiram manter o *pool* genético do estoque de reprodutores e, conseqüentemente, da sua progênie.

A utilização do sistema reprodutivo seminatural possivelmente influenciou na preservação da variabilidade genética, já que este sistema reduz o direcionamento e a seleção não intencional e a mortalidade de reprodutores, permitindo que um maior número deles participe durante o acasalamento (Lopera Barrero et al., 2010c). Esses autores ao analisar a variabilidade genética de progênies de *Brycon orbignyanus* no sistema reprodutivo seminatural, observaram uma heterocigosidade observada média ( $H_o$ ) maior na progênie (0,510) ao ser comparada com os parentais (0,470). Igualmente, Povh et al. (2010), analisando a diversidade genética de uma progênie de *Piaractus mesopotamicus* obtidas pelo sistema reprodutivo seminatural, observaram que não houve redução da variabilidade genética na progênie ( $H_o = 0,563$ ) quando comparada com os parentais ( $H_o = 0,550$ ). Dessa forma, o sistema reprodutivo seminatural mostrou-se eficiente, fato este possivelmente evidenciado também no presente trabalho.

**Tabela 3.** Análise de variância molecular (AMOVA), distância (D) e identidade genética (I) para os diferentes agrupamentos utilizados nos parentais e progênie de *S. brasiliensis*.

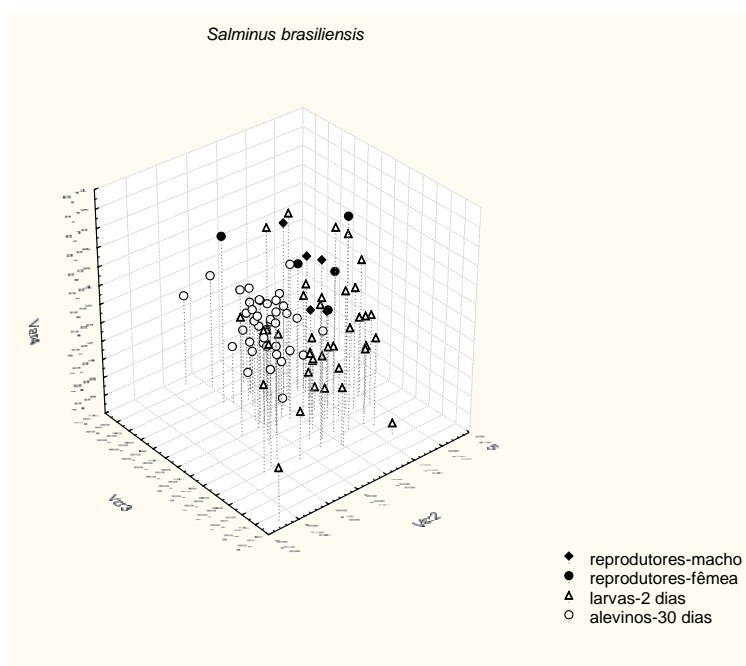
<b>Agrupamentos</b>	<b>FV</b>	<b>SMQ</b>	<b>CV</b>	<b>%V</b>	<b>D</b>	<b>I</b>
Parentais x larvas	E.G	32,760	1,3774	11,39*	0,046	0,954
	D.G	514,600	10,720	88,61		
	Total	547,360	12,098	100		
Parentais x alevinos	E.G	30,125	1,3497	13,66*	0,061	0,941
	D.G	409,375	8,5286	86,34		
	Total	439,500	9,8784	100		
larvas x alevinos	E.G	46,900	0,9440	9,36*	0,031	0,969
	D.G	712,750	9,1378	90,64		
	Total	759,650	10,081	100		

**E.G** = Entre grupos; **D.G** = Dentro de grupos \* $P > 0,05$

Ao analisar a variabilidade genética nas duas fases da progênie foi observada uma diminuição nos alevinos aos 30 dias de estocagem. Os valores de divergência genética (larvas: 0,275; alevinos: 0,231), distância e identidade genética (Tabela 3) confirmaram este resultado e evidenciaram também menor divergência entre os parentais e as larvas (0,289) e maior divergência entre os parentais e os alevinos (0,304). Resultados similares foram observados por Rodriguez-Rodriguez et al. (2010) para estoques de *Brycon orbignyanus* utilizados em programas de repovoamento, onde houve um menor valor de heterozigosidade observada ( $H_o$ ) nos alevinos (0,635) ao ser comparado com as larvas (0,864). Segundo estes autores, essa diferença pode ser consequência do canibalismo inicial presente em essa espécie, pelas condições ambientais de crescimento, pela fase de aclimação ou pela mortalidade aleatória. É possível que esses mesmos fatores tenham influenciado na progênie de *S. brasiliensis* já que nas fases iniciais de crescimento também existe um elevado canibalismo e uma alta mortalidade (Schütz & Nuñez, 2007; Flora et al., 2010). De acordo com Esteves & Pinto Lobo (2001), o dourado é um peixe que ocupa o topo da cadeia alimentar, o mesmo é considerado uma espécie piscívora ou ictiófaga por excelência. O hábito alimentar desta espécie é sem dúvida um dos entraves para o sucesso de sua criação, pois se trata de um animal carnívoro desde os primeiros dias de vida, o canibalismo é acentuado e não possui um aceite imediato da ração. Porém, não é possível fazer inferências sobre a influência dessas hipóteses, já que não se dispõe de informações compiladas durante as fases de crescimento.

O gráfico em coordenadas principais (Figura 2) mostra a distribuição da progênie nas duas fases, sendo identificados dois grupos de indivíduos. Os cinco casais de reprodutores estocados (5♂ e 5♀) contribuíram com as larvas coletadas com dois dias de idade. Porém, quando foi realizada a coleta dos alevinos com 30 dias de idade, verificou-se que apenas poucos reprodutores contribuíram com a maior parte dos indivíduos do grupo. Supõe-se que os alevinos provenientes dos outros quatro casais não suportaram a pressão causada pelo canibalismo e pelas condições ambientais.

Assim, pelos resultados observados é possível verificar que existem diferenças genéticas dentro de uma mesma progênie durante diferentes fases de crescimento. Estes resultados são importantes quando se pensa em programas de repovoamento, onde normalmente só a análise genética das larvas é indicativa da variabilidade genética com as quais essas progênies serão liberadas aos rios. Dessa forma, concordando com as recomendações realizadas por Rodriguez-Rodriguez et al. (2010), também se sugere avaliar as progênies de *S. brasiliensis* utilizadas em programas de repovoamento em duas fases: uma realizada nas larvas que oferecerá uma visão geral das características genéticas da nova geração e outra aos 60 ou 90 dias (dependendo do manejo e das condições ambientais do ecossistema onde serão liberadas) que permitira estimar objetivamente a real variabilidade genética com a qual os indivíduos serão liberados. Para isso, marcadores moleculares como o RAPD e microssatélites mostram-se eficientes e confiáveis.



**Figura 2.** Gráfico de dispersão em coordenadas principais do estoque de reprodutores e suas respectivas progênies.

### Conclusões

1. A variabilidade genética do estoque de reprodutores foi alta, podendo ser utilizado em programas de repovoamento.
2. Foi observada uma menor distância genética entre os parentais e os alevinos, com perda de variabilidade genética
3. Verificou-se diferenciação genética entre as larvas e os alevinos.

### Referências

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v.1, p.70-78, 2005.

BARBIERI, G.; SALLES, F. A.; CESTAROLLI, M. A. Reproductive and nutritional dynamics of *Salminus maxillosus* Valenciennes, 1849 (Pisces, Characidae) at Mogi Guaçu river, state of São Paulo, Brazil. *Acta Scientiarum*, 23: 441-444. 2001.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin Ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online*, v.1, p.47-50, 2005.

ESTEVES, K.E.; PINTO LOBO, A.V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* at Cachoeiras de Emas, Mogi Guaçu river (São Paulo State Southeast Brazil). **Rev. Bras. Biol.** 61:267-276, 2001.

FLORA, M. A. D.; MASCHKE, F.; FERREIRA, C. C.; PEDRON, F. A. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). *Acta Veterinária Brasília*, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2010.

JACOMETO, C. B.; LOPERA BARRERO, N. M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; GOMES, P. C.; POVH, J. A.; STREIT JR, D. P.; VARGAS, L.; RESENDE, E. K.; RIBEIRO, R. P. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.45, n.5, p.481-487, 2010.

LEGENDRE, P.; ANDERSON, M. J. 1998. *Program DistPCoA*. Département de sciences biologiques, Université de Montréal. 10 pages.

LIMA, F. C. T.; MALABARBA, L. R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J. F. P.; VARI, R. P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T.; PAVANELLI, C. S.; MENEZES, N. A.; LUCENA, C. A. S.; MALABARBA, M. C. S. L.; LUCENA, Z. M. S.; REIS, R. E.; LANGEANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V. A.; MOREIRA C.; LUCINDA, P. H. F. Genera Incertae Sedis in Characidae. Pp. 106-156. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris, (Eds.). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 2003.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar? **Aqüicultura & Pesca**, v.30, p.71-74, 2007.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T. da S. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. **Ciência e Investigación Agraria**, v.35, p.77-86, 2008.

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, n.1, p.184-191, 2010a.

LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; LOPES, T.S.; OLIVEIRA, S.N.; GOMES, P.C. Diversidad genética de *Piaractus mesopotamicus* utilizado em programas de repoblación. **Archivos de Zootecnia**, v.59, p.51-62, 2010b.

LOPERA BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; STREIT JR, D. P.; GOMES, P. C. Diversidad genética y contribución reproductiva de una progenie de *Brycon orbignyanus* en el sistema reproductivo seminatural, usando marcadores microsatélites. *Agrociencia*, v. 44, p. 171-181, 2010c.

LOPES, C.M.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; SODRÉ, L.M.K. Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes) *Neotropical Ichthyology*, 5(2):131-138, 2007.

MILLER, M.P. Tools of population genetic analysis (TFPGA) 1.3: **a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data**. Utah State University, 1997.

MILLER M. MANTEL-ESTRUCT: a program for the detection of population structure via mantel tests. *J Hered* 1999; 90: 258-259.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, v.89, p.583-590, 1978.

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

PAMPONET, V. C. C.; CARNEIRO, P. L. S.; AFFONSO, P. R. A. M.; MIRANDA, V. S.; JÚNIOR, J. C. S.; et al. A multi-approach analysis of the genetic diversity in populations of *Astyanax aff. bimaculatus* Linnaeus, 1758 (Teleostei: Characidae) from Northeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v. 6, n. 4, p. 621-630, 2008.

POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; LUPCHINSKI JUNIOR, E.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, p.5-15, 2008.

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, n. 2, p. 389-396, 2010.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, v.49, p.1280-1283, 1995.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. del P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.; VARGAS, L.; SIROL, R.N.; JACOMETO, C.B. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 45, n. 1, p. 56-63, 2010.

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). *Brazilian Journal of Biology*, v. 67, n. 4, p. 889-895, 2007.

SCHÜTZ, J. H.; NUÑER, A. P. O. Growth and survival of dorado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) post-larvae cultivated with different types of food and photoperiods. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 50, n. 3, p 435-444, 2007.

SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. Pp.275-284. In: Nogueira M. G., R. Henry & A. Jorcin (Eds.). *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. São Carlos, Rima, 459p. 2005.

STATSOFT INC., 2005. *Statistica* (data analysis software system). Version 7.1. Available from: [www.statsoft.inc](http://www.statsoft.inc). Access in: 20 de Outubro de 2007.

WILLIAMS, J.G.; KUBELIK, A.R.; LIVAK, K.J. RAFALSKI, J.A.; TINGEY, S.V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis**. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: *Aqüicultura: Experiências Brasileiras*. Ed. UFSC. Florianópolis, SC. Cap. 14, p. 337-369, 2004.

## V- CONCLUSÕES GERAIS

Os resultados do primeiro trabalho mostraram que a escada de transposição de Canoas I permite a transposição de dourado (*S. brasiliensis*) no trecho do médio Paranapanema e as três populações coletadas na escada de transposição da hidroelétrica de Canoas I podem ser utilizadas para renovar o estoque de dourado Estação de Hidrologia e Aqüicultura de Salto Grande (SP).

Já o segundo trabalho mostrou que houve a dominância de apenas um casal no acasalamento entre de reprodutores de *Salminus brasiliensis* no sistema reprodutivo seminatural, supõe-se que os alevinos provenientes dos outros quatro casais não suportaram a pressão causada pelo canibalismo. No entanto, a variabilidade genética da progênie obtida por este sistema em relação aos reprodutores foi mantida.