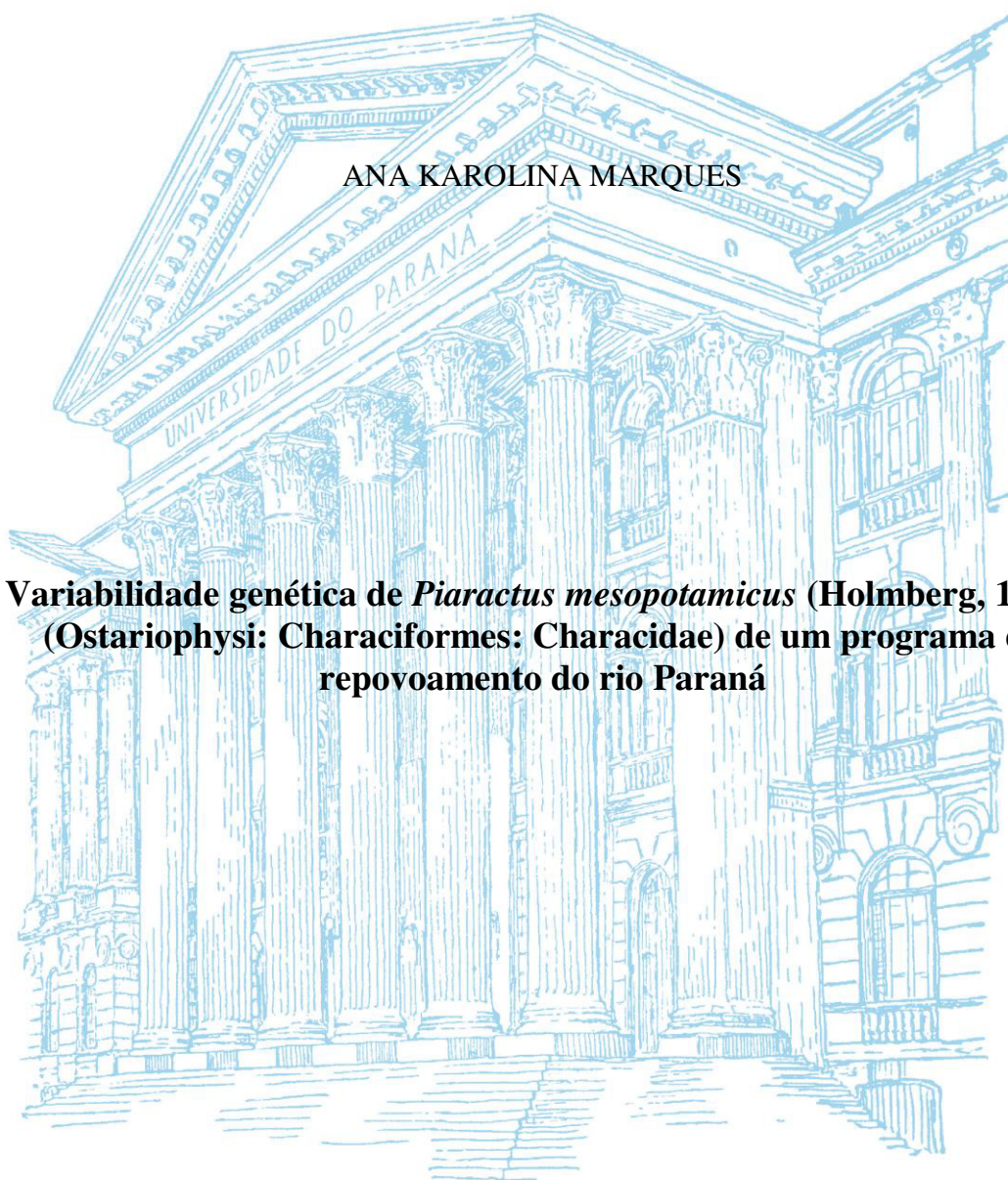


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE PALOTINA
DEPARTAMENTO DE ZOOTECNIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

ANA KAROLINA MARQUES

**Variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)
(Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de um programa de
repopoamento do rio Paraná**



Palotina
2015

ANA KAROLINA MARQUES

**Variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)
(Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de um programa de
repopoamento do rio Paraná**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, do Setor Palotina, Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável. Área de concentração: Impactos ambientais da atividade de Aquicultura

Orientadora: Prof. Dr^a. Carla Simone Pavanelli
Coorientadora: Dr^a Sandra Regina de Souza

Palotina
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

M357 Marques, Ana Karolina
Variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus*
(Holmberg, 1887) (Ostariophysi: Characiformes:
Characidae) de um programa de repovoamento
do rio Paraná. / Ana Karolina Marques -
Palotina, 2015.

30p.

Orientador: Carla Simone Pavanelli.

Coorientador: Sandra Regina de Souza.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do
Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-Aquicultura e
Desenvolvimento Sustentável.

1.D-loop . 2. ISSR . 3. Marcadores moleculares.

I. Pavanelli, Carla Simone. II. Souza, Sandra Regina de
III. Universidade Federal do Paraná.

CDU 639.3

ANA KAROLINA MARQUES

**Variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)
(Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de um programa de
repopoamento do rio Paraná**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, do Setor Palotina, Departamento de Zootecnia, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^{ta} Dr^a. Carla Simone Pavanelli
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

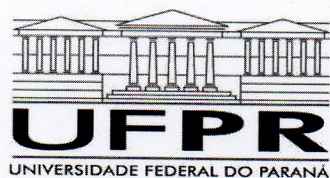
Prof^o Dr. Almir Manoel Cúnico
Universidade Federal do Paraná (UFPR) setor Palotina

Dr^a Vivian Nunes Gomes
Universidade Estadual de Maringá (UEM)

Dr^a Alessandra Valéria de Oliveira
Instituto Federal do Paraná (IFPR)

Aprovada em: 21 de Agosto de 2015.

Local da defesa: Bloco didático. Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em AQUICULTURA E
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL

Código CAPES: 40001016078P2

PARECER DA BANCA EXAMINADORA

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANA KAROLINA MARQUES**, intitulada: "**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887)(OSTARIOPHYSI: CHARACIFORMES: CHARACIDAE) DE UM PROGRAMA DE REPOVOAMENTO DO RIO PARANÁ**", após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua *APROVAÇÃO*....., completando-se assim todos os requisitos previstos nas normas desta Instituição para a obtenção do Grau de **Mestre em AQUICULTURA E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL**.

Palotina, 21 de Agosto de 2015.

Prof CARLA SIMONE PAVANELLI
(Presidente da Banca Examinadora)

Prof ALMIR MANOEL CUNICO

Prof VIVIAN NUNES GOMES

Em especial aos meus avós maternos (*in memoriam*), que sempre me fizeram acreditar na realização dos meus sonhos e a lutar por eles, onde quer que estejam esse mérito é pra vocês. A você Cleodir, companheiro no amor, na vida e nos sonhos, que sempre me apoiou e compartilhou comigo as alegrias, pelo carinho e paciência dispensados em todos esses anos,

Com amor dedico...

AGRADECIMENTOS

É provável que nestas páginas eu não consiga expressar minha enorme gratidão a todas as pessoas que ao longo da minha vida tenham colaborado para as conquistas alcançadas, dificilmente todos estarão listados, mas agradeço a todos que direta ou indiretamente fazem parte desta etapa alcançada.

A Deus pela beleza da vida, por me dar mais do que preciso, e me abençoar bem mais do que mereço.

A todos os meus familiares, especialmente minha mãe Fátima, que com amor e apoio torce por mim, para que eu concluísse com êxito esse desafio.

Aos meus avós maternos (*in memoriam*), que serão eternos em mim pelo exemplo deixado, e pelo amor incondicional.

Especialmente ao meu eterno namorado Cleodir Lopes Antunes pela cumplicidade, lealdade, paciência enfim por estar sempre ao meu lado, por ser meu grande amor.

À minha Irmã Juliana Karina Marques por ser uma graça de Deus na minha vida, por não importar como ou onde está sempre ao meu lado quando eu preciso, e quando não preciso também. A ela e ao meu cunhado Alex por terem me dado uma inspiração de amor, carinho e paz que é a pequena Laura por quem não me canso de dizer que é meu amor perfeito.

À minha família de cinco irmãos (Juliana, Thiago, Matheus, Giovana e eu) acalentada por Nivaldo e Adriana, por quem além de toda ajuda e confiança depositada terá nossa admiração eterna.

Aos meus “caronas” Wilson e Thiago, que com tanta disponibilidade me apoiaram.

Aos irmãos que a vida gentilmente me ofereceu, Antonio Alves dos Santos Junior pela imensa parceria, amizade e carinho, Katiane pela lealdade, amizade, por ser uma bênção em minha vida pela sua presença e também na sua ausência, Franciele minha prima, minha irmã porque a infância mesmo com a longevidade do tempo ainda faz mantermos o amor genuíno.

Às minhas *best friends*, Eliege e Crislene que sempre estiveram ao meu lado.

À minha orientadora Carla Simone Pavanelli, pela paciência, pelos ensinamentos e apoio durante todo esse processo.

Ao Prof. Dr. Alberto José Prioli pelos ensinamentos e auxílio em todas as fases do desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço aos professores, funcionários e colegas de mestrado, pelo convívio com quem tanto aprendi, principalmente Franthiesco, Dircelei e Nathalia.

Aos colegas de laboratório Thaís, Rodrigo, Thomas, Nathalia e Thaty que contribuíram imensamente para a realização deste trabalho e pelo companheirismo em todo esse tempo.

Ao Nupélia, pela infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Paraná setor Palotina, por permitir que eu realizasse este mestrado.

Agradeço a todos pela compreensão da minha ausência, em vários momentos, a vocês, dedico meu eterno amor, respeito e gratidão por tudo que vocês representam para mim. Não me canso se agradecer a existência de vocês em minha vida!

*"Hoje me sinto mais forte,
mais feliz, quem sabe, só levo
a certeza de que muito pouco
sei, ou nada sei..."*

(ALMIR SATER)

Variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de um programa de repovoamento do rio Paraná

RESUMO

Conservar a variabilidade genética de peixes ou demais organismos é fundamental para a viabilidade das mesmas a médio e em longo prazo. Os programas de repovoamento têm sido utilizados como forma de melhorar os estoques pesqueiros que diminuíram consideravelmente, sendo necessários investimentos para recuperação destes estoques. Porém, esta atividade não vem sendo monitorada de forma adequada através de avaliações genéticas, biológicas e de reprodução, que são ferramentas essenciais para um eficaz programa de repovoamento. Sendo de grande importância comercial, por se tratar de uma espécie de excelente aceitação no mercado consumidor, *Piaractus mesopotamicus*, o pacu, é uma das espécies de maior relevância na piscicultura no Brasil. Destaca-se pela qualidade de sua carne e bom desempenho em sistemas de cultivo. Por ser um peixe nativo e apresentar esses potenciais de produção, é uma das espécies mais utilizadas nos programas de repovoamento da bacia do rio Paraná. O objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética de matrizes e progênes de *Piaractus mesopotamicus* para um programa de repovoamento do rio Paraná, realizada pelo marcador nuclear de sequências internas simples repetidas (*Inter Simple Sequence Repeat- ISSR*) e o marcador mitocondrial (*D-loop*) região controle hipervariável. Dos resultados obtidos a diversidade haplotípica ($0,633 \pm 0,048$) e a nucleotídica ($0,00397 \pm 0,00073$) indicaram que as amostras estudadas apresentam variabilidade genética e o Índice de Fixação (F_{ST}) aponta que essas populações não apresentam estruturação genética.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, *D-loop*, ISSR.

Genetic variability of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) from a restocking program of the Parana River

ABSTRACT

Conserving genetic variability of fish or other organisms is crucial to viability of them medium and long term. Restocking programs have been used in order to improve fish stocks that declined considerably, requiring investments for recovery these stocks. However, this activity has not being monitored properly through genetic, biological and breeding evaluations, which are essential tools for effective resettlement program. Very commercially important, because it is a species of great acceptance in consumer market, *Piaractus mesopotamicus*, pacu, is one of most relevant species in fish farming in Brazil. It stands out for quality of meat and good performance in farming systems. As a native fish which presents these potential of production, it is one of most commonly used species in restocking programs of the Paraná River basin. Our objective was to estimate the genetic variability of arrays and progeny *Piaractus mesopotamicus* for a Parana River restocking program, performed by nuclear marker of repeated simple internal sequences (Inter Simple Sequence Repeat ISSR) and mitochondrial marker (*D-loop*) region hypervariable control. Results obtained haplotype diversity (0.633 ± 0.048) and nucleotide (0.00397 ± 0.00073) indicated that samples studied had genetic variability and the fixation index (F_{ST}) pointed out these populations do not present genetic structuration.

Keywords: Molecular markers, *D-loop*, ISSR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa de localização do estoque utilizado para o programa de repovoamento da Fazenda Green Farm.....	15
Figura 2 - Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação da região controle de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	18
Figura 3 - Rede de haplótipos obtida com 65 sequências nucleotídicas da região <i>D-loop</i> do DNA mitocondrial de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	20
Figura 4 - Árvore de máxima verossimilhança construída a partir da sequência mitocondrial <i>D-loop</i> de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	21
Figura 5 - Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação do marcador ISSR de <i>Piaractus mesopotamicus</i>	23
Figura 6- Dendrograma <i>neighbor-joining</i> baseado em complementos aritméticos da similaridade de Jaccard entre indivíduos de <i>Piaractus mesopotamicus</i> da bacia do alto rio Paraná e de matrizes e progênies F ₁ de piscicultura, com o modelo Tamura 3-Parâmetros.....	24

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Sítios nucleotídicos polimórficos.....	19
Tabela 2 -	Índice de diversidade haplotípica e nucleotídica em sequência da região <i>D-loop</i>	22
Tabela 3 -	Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base em sequências <i>D-loop</i>	22
Tabela 4 -	Análise de Variância Molecular (AMOVA) de populações de <i>Piaractus</i> <i>mesopotamicus</i> com marcador molecular ISSR.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAIS E MÉTODOS	15
2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS	15
2.2 PROCESSAMENTO DE DNA	16
2.3 ANÁLISE DOS DADOS	17
3 RESULTADOS	18
3.1 MARCADOR MOLECULAR <i>D-LOOP</i>	18
3.2 MARCADOR NUCLEAR ISSR	22
4 DISCUSSÃO	25
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27

1 INTRODUÇÃO

A estocagem de peixes, também conhecida como repovoamento, consiste na soltura de peixes, em sua maioria alevinos ou jovens, produzidos em cativeiro. Em meio a inúmeras formas para se minimizar o impacto da diminuição de várias espécies de peixes nos ambientes aquáticos o repovoamento tem sido muito utilizado (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2013). Esta prática é amplamente disseminada no Brasil, porém há ausência de monitoramento sobre os aspectos reprodutivos, genéticos e ecológicos, o que não permite um quadro preciso dos resultados obtidos de forma a aumentar ou avaliar sua efetividade (AGOSTINHO *et al.*, 2007). Para tanto, é notável que a simples soltura de peixes nos rios não é uma prática suficientemente eficaz, podendo até mesmo ser prejudicial ao ecossistema, se não for realizada com uma gestão adequada (LIDANI *et al.*, 2006).

Uma preocupação comum em programas de repovoamento é a necessidade de informações sobre a identidade genética das populações de peixes utilizadas (GONZÁLEZ-WANGÜEMERT *et al.*, 2011). Os alevinos e jovens utilizados nas estocagens, em geral, provêm de poucas matrizes, se comparado ao ambiente natural, ocasionando um dos fatores que influencia os estoques em cativeiro, a diminuição da variabilidade genética (AGOSTINHO *et al.*, 2007). Baixa variabilidade genética em estoques pesqueiros é um sério agravante para as populações naturais, por ocasionar a diminuição da resistência às doenças e da capacidade de adaptação a diferentes mudanças ambientais. A variabilidade genética é fundamental, visto que é o meio pela qual uma determinada espécie reage e também se adapta a mudanças ambientais.

A falta da diversidade genética pode levar a aumento nos níveis de endogamia, que pode reduzir a adaptação de indivíduos e populações (LOPES *et al.*, 2009). A redução do *pool* gênico é ocasionada pela reprodução de aparentados, tornando os descendentes homogêneos. Para se evitar este problema, faz-se necessária uma análise genética nas práticas de produção para melhores resultados, seja na produção ou na conservação de peixes, de forma que os resultados direcionem os potenciais riscos genéticos.

O ideal para um programa de repovoamento que se tem como finalidade a conservação genética é o monitoramento, para isso os marcadores genéticos podem ser eficientes (POVH *et al.*, 2008). Atualmente existem diversos marcadores genéticos que são aplicados á piscicultura, esses podem ser cromossômicos, bioquímicos ou moleculares, cada um com características específicas que são evidenciadas por marcas para identificar as variações no DNA.

Os marcadores moleculares têm apresentado eficiência na determinação da diversidade genética com populações utilizadas nos programas de repovoamento (POVH *et al.*, 2009). Esses permitem estimar parâmetros genético-populacionais para avaliação do fluxo gênico, diferenciação e distância genética entre populações ou espécies.

A técnica da reação de polimerase em cadeia (*Polymerase Chain Reaction* - PCR), que abrange a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias através um segmento específico de DNA diante da presença da enzima DNA polimerase, foi um dos maiores avanços da biologia molecular, e tem sido crescentemente empregada. Dentre os marcadores moleculares que se utilizam dessa técnica está o ISSR, que é um marcador nuclear de sequências internas simples repetidas (*Inter Simple Sequence Repeat* - ISSR) em que se utiliza um único *primer* com a sequência tetranucleotídica repetitiva que amplifica regiões que se encontram entre dois locos de microssatélite (DOMINGOS *et al.*, 2014).

Outra abordagem consiste no sequenciamento de fragmentos e análise do polimorfismo das sequências nucleotídicas. Várias regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) são utilizadas como eficientes marcadores uma delas é a região controle hipervariável *D-loop*, herdada via materna, na qual não há codificação de proteínas e onde mutações se acumulam mais rapidamente, não seguindo padrões de segregação mendeliana. Por isso, o *D-loop* tem sido a sequência de escolha para estudos taxonômicos e genéticos de populações e espécies próximas de peixes (LUI *et al.*, 2012; PANARARI-ANTUNES *et al.*, 2012).

Piaractus mesopotamicus, conhecida popularmente como pacu, é utilizada na piscicultura e em programas de estocagem devido a diversos fatores, como facilidade na obtenção de larvas através da reprodução induzida, adaptação à alimentação artificial e elevado valor comercial (FURUYA, 2001). Esta espécie tem sido utilizada em vários estudos com objetivo de estimar a diversidade genética. LOPERA-BARRERO *et al.* (2010) analisaram diversas populações através de blocos microssatélite e detectaram baixa diferenciação genética, o que sugere uma origem comum produzida por constantes repovoamentos. Resultados similares foram encontrados por RODRIGUEZ *et al.* (2013), ao analisar populações da espécie de um programa de repovoamento do rio Tietê. *Piaractus mesopotamicus* pertence à ordem Characiformes e família Characidae, a qual apresenta a maior diversidade de peixes, com cerca de 1097 espécies (ESCHMEYER e FONG, 2015) e é endêmica da bacia do Prata (GRAÇA e PAVANELLI, 2007).

Neste estudo, sequências nucleotídicas da região controle do mtDNA e ISSR foram utilizadas para analisar a variabilidade genética de populações de *Piaractus mesopotamicus* utilizado de um programa de repovoamento em comparação com populações nativas desta

espécie capturadas no rio Ivinhema, fornecendo subsídios para auxiliar em programas de manejo e conservação da espécie.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletados um total de 99 exemplares de *Piaractus mesopotamicus*. Desses, 24 foram do estoque utilizado para o programa de repovoamento da Fazenda Green Farm (<http://www.greenfarmco2free.com.br/wp/>), localizada às margens do rio Amambai, próximo à sua foz no rio Paraná, Estado do Mato Grosso do Sul (Figura 1), perto da divisa com o Estado do Paraná. Também foram utilizados 43 exemplares das matrizes desse plantel, provenientes de um produtor do município de Mundo Novo Estado de Mato Grosso do Sul e 32 foram capturados no rio Ivinhema ($22^{\circ}57'37.90''\text{S}$ $53^{\circ}39'06.0''\text{W}$), Estado de Mato Grosso do Sul.

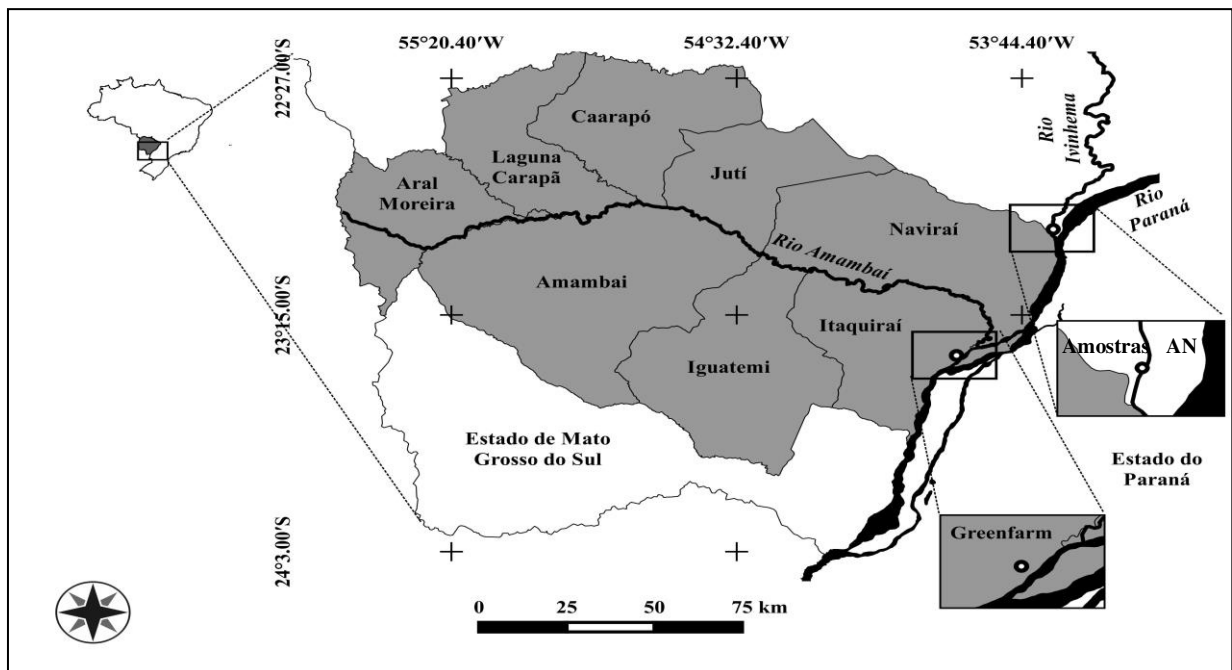


Figura. 1. Mapa de localização do estoque utilizado para o programa de repovoamento da Fazenda Green Farm e Amostras de Ambiente Natural (AN). Fonte: O autor (2015)

Após a coleta, os exemplares provenientes da Fazenda Green Farm e os capturados no rio Ivinhema foram anestesiados com óleo de Cravo e sacrificados, uma amostra de tecido muscular de aproximadamente 1cm foi retirada de cada exemplar. As amostras foram

etiquetadas, fixadas e armazenadas em microtubos contendo álcool 96° GL, para extração e amplificação do DNA. Após a retirada do tecido, os exemplares eram fixados em formalina 10%, e depositados como material testemunho na Coleção Ictiológica do Nupélia sob o NUP 17354 e 17616, da Universidade Estadual de Maringá, no Estado do Paraná.

As matrizes mencionadas acima foram analisadas da mesma maneira, com a utilização de DNA retirado na nadadeira adiposa de cada matriz, totalizando 43 exemplares. Como não é possível o sacrifício das matrizes, cada exemplar foi fotografado e a foto salva em arquivo com o mesmo nome da etiqueta que identificará seu material genético.

2.2 PROCESSAMENTO DE DNA

Para extração do DNA as amostras foram extraídas com kit da Promega, *Wizard Genomic Purification kit*, de acordo com as instruções do fabricante.

A quantificação do DNA presente em cada amostra foi realizada por meio visual através da comparação de 25, 50 e 100 ng de DNA do fago λ (Invitrogen Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA, USA). Utilizou-se gel de agarose (0,8%) corado com brometo de etídio (20 μ g/100 mL) e fotografado sob luz ultravioleta.

A amplificação, por PCR, do *D-loop* foi efetuada com os *primers* H16498 5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3' Meyer *et al.* (1990), e D-loop L 5'-AGAGCGTCGGTCTTGTAACC-3' Cronin *et al.* (1993). As condições de amplificação foram baseadas em Prioli *et al.* (2002). A mistura de reação consiste em Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 e 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 μ M de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 1 U *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 15 ng de DNA e água milli-Q para completar 25 μ L. O termociclador MJ Research PT100 foi programado para 94 °C por 4 min, e 40 ciclos a 94 °C por 15 s, 56 °C por 30 s, 72 °C por 2 min, e uma extensão de 72 °C por 5 min. Os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,0%), quantificados por comparação com o padrão *Ladder* 100 pb (Invitrogen Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA, USA) e fotografados.

Cerca de 50 ng do produto final de cada reação de PCR foi utilizado para reações de sequenciamento com BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing em um sequenciador automático ABI_3100 (Perkin Elmer) de acordo com instruções do fabricante.

Os marcadores ISSR foram obtidos com a metodologia já implantada no laboratório de Genética Geral da UEM. Foram utilizados os *primers* (AACC)₄, (TAGG)₄ e (GGAC)₃A. A mistura de reação de amplificação utilizando-se cada um dos *primers* escolhidos consistiu de

tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, *primer* 0,46 M, dNTP 0,19 mM (MIX), 1 U da *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 10 ng e água deionizada, filtrada e autoclavada, para completar 13 µL. O DNA foi programados para 4 ciclos a 94° C por 45 s, 44° C 1 min, 72° C 1 min, a seguir, foi submetido à 29 ciclos de 45 s a 94° C, 1 min a 44° C e 1 min a 72° C. Após o último ciclo de amplificação, a mistura de reação foi mantida a 4° C. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 1,4%. Um controle negativo foi incluído em cada experimento, consistindo da mistura de reação de PCR sem DNA. O padrão eletroforético foi visualizado em um transiluminador UV e fotografado. Os tamanhos dos fragmentos são estimados por comparação com o padrão *Ladder* 100 pb (Invitrogen Life TechnologiesTM, Carlsbad, CA, USA).

2.3 ANÁLISE DOS DADOS

Foram selecionadas sequências nucleotídicas da região *D-loop* com qualidade verificada pela inspeção visual do eletroferograma de cada sequenciamento. As sequências foram editadas manualmente com o programa BioEdit 7.2.0 (HALL, 1999). Em seguida, as sequências foram alinhadas utilizando-se o algoritmo Clustal W (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994) implementado no programa Mega 6.0 (TAMURA *et al.*, 2013). A seleção do modelo de substituição nucleotídica foi realizada com o programa Mega 6.0, com base nos critérios de Akaike (*Corrected Akaike Information Criterion -AICc*) e bayesiano (*Bayesian Information Criterion - BIC*). O programa DnaSP 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi utilizado para a obtenção dos índices de diversidade haplotípica (*h*) e nucleotídica (π). Com o programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER *et al.*, 2010), as populações estudadas foram comparadas entre si pela análise de variância molecular (AMOVA). Adicionalmente, com o programa Network 4.6.1.3 (Fluxus Technology, 2004-2015) e o método de vetores medianos, foi construída uma rede de haplótipos para ilustrar a evolução e a distribuição dos haplótipos nas populações. O programa Mega 6.0 foi utilizado para a construção de um dendrograma de máxima verossimilhança mostrando as relações filogenéticas entre as sequências *D-loop*, com 1.000 reamostragens.

Através da leitura dos géis, o marcador ISSR gerou resultados que foram tabulados em matrizes de dados binários, correspondentes à presença (1) ou ausência (0) de bandas de fragmentos ISSR. Portanto, com a análise dos géis produzidos pelos três *primers*, a cada indivíduo foi associado um padrão de bandas, traduzido por uma linha de dados binários na

matriz. Com base nessa matriz, foram determinados os coeficientes de similaridade de Jaccard entre todos os indivíduos, tomados dois a dois. Com a matriz de complementos aritméticos da similaridade de Jaccard foi construído um dendrograma *neighbor-joining*, utilizando os programas FreeTree (PAVLICEK *et al.*, 1999) e Mega 6.0. Além disso, com os dados binários foi realizada uma AMOVA para comparação das populações, utilizando o programa Arlequin 3.5.

3 RESULTADOS

3.1 MARCADOR MITOCONDRIAL *D-LOOP*

Os resultados da amplificação da região controle hipervariável resultaram em fragmentos de aproximadamente 600 pares de base (Figura 2), que após o sequenciamento foram reduzidos para 472 pb.

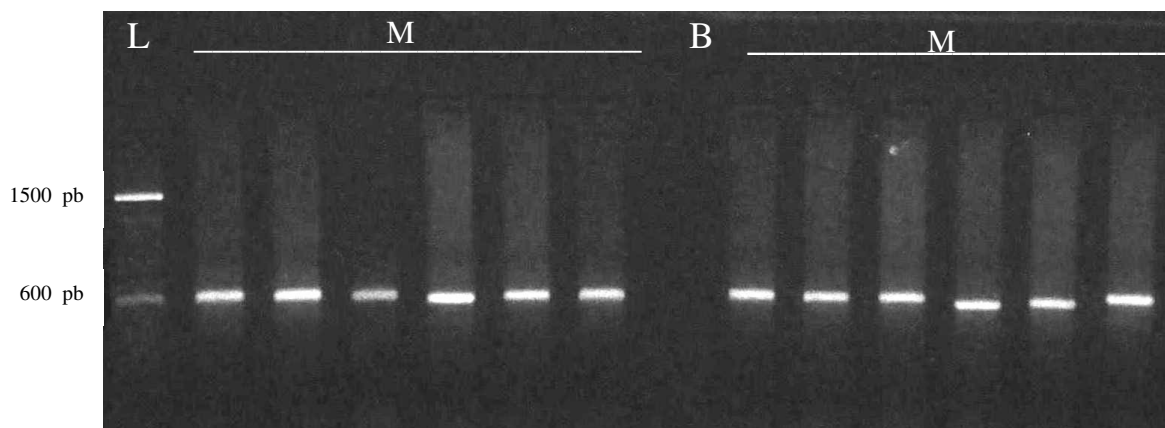


Figura 2. Perfis eletroforéticos dos produtos de amplificação da região controle de *Piaractus mesopotamicus*, M – Matrizes, L- padrão molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen), B- Controle negativo.

As análises realizadas com o marcador *D-loop* foi realizada em 65 indivíduos, produziram uma matriz de dados com nove haplótipos (tabela 1), dentre os quais os haplótipos 1 e 2 foram compartilhados entre matrizes (M), progênes (F1) e os de ambiente natural (AN). O haplótipo 1 é o mais frequente e o haplótipo 9 é restrito às matrizes. Os demais haplótipos são raros e exclusivos ou das matrizes ou da população de ambiente natural.

Tabela 1. Sítios nucleotídicos polimórficos em sequência (472 pb) da extremidade 5' da cadeia pesada da região mitocondrial *D-loop* de *Piaractus mesopotamicus* de plantel de matrizes (M), progênes (F₁) e de ambiente natural (AN), da bacia do alto rio Paraná.

Haplótipo	Sítio Nucleotídico	População			
	2 2 3 3 6 6 6 7 7 1 1 2 2 2 2 2 3 3 4 4 2 9 0 2 7 8 9 0 6 2 9 3 3 7 7 5 2 7 7 2	M	F ₁	AN	Total
Hapl-1	A G T C A T A T A T T G A T T T T C T C	23	4	8	35
Hapl-2 C	10	1	7	18
Hapl-3 C C . . . C .	-	-	1	1
Hapl-4	G C T . .	-	-	1	1
Hapl-5 C C . . . C	1	-	-	1
Hapl-6 C . A . . . C	1	-	-	1
Hapl-7	. A C . . C . C T	-	-	1	1
Hapl-8	. A C . . . C C . C . . T	-	-	1	1
Hapl-9	. . C . - - - - G C . . G T	6	-	-	6
		41	5	19	65

A Figura 3 ilustra a complexa relação entre os haplótipos, sugerindo que ocorra diversidade genética entre as populações. O tamanho dos círculos é proporcional ao número de amostras correspondentes a cada haplótipo, podendo ser observado também cada passo mutacional. O haplótipo 9 fica evidente ser restrito às matrizes.

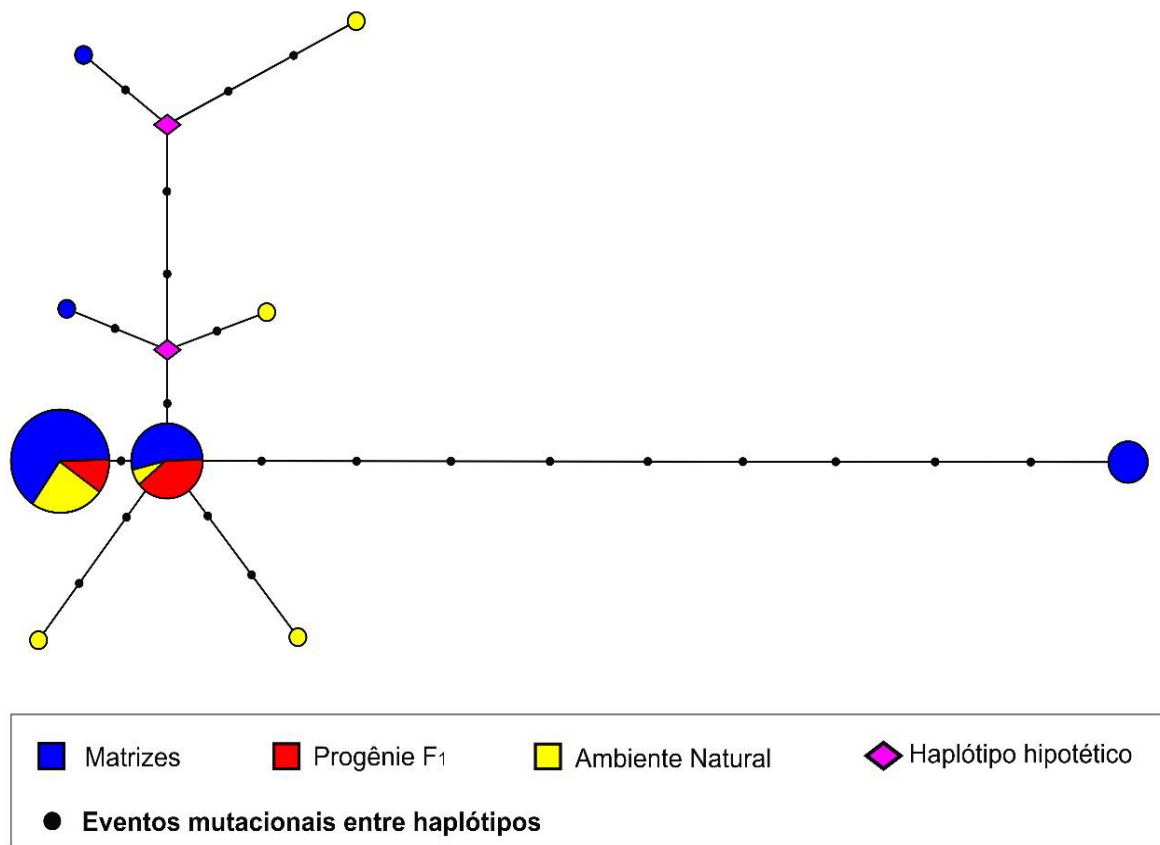


Figura 3. Rede de haplótipos obtida de 65 sequências nucleotídicas da região *D-loop* do DNA mitocondrial de *Piaractus mesopotamicus* da bacia do alto rio Paraná e de matrizes e progênes F₁ de piscicultura.

Utilizando o modelo Tamura 3-parâmetros foi gerada a árvore de máxima verossimilhança (Figura 4), que apresenta diversidade entre as populações naturais em cativeiro e prole. Como pode ser observado na Tabela 2, dos 65 indivíduos utilizados na análise, 41 são matrizes, 5 são prole e 19 de ambiente natural. As diversidades haplotípicas e nucleotídicas para matrizes e para amostras do ambiente natural são semelhantes, apenas a F1 difere, sendo provável que seja pelo número reduzido de amostras utilizadas.

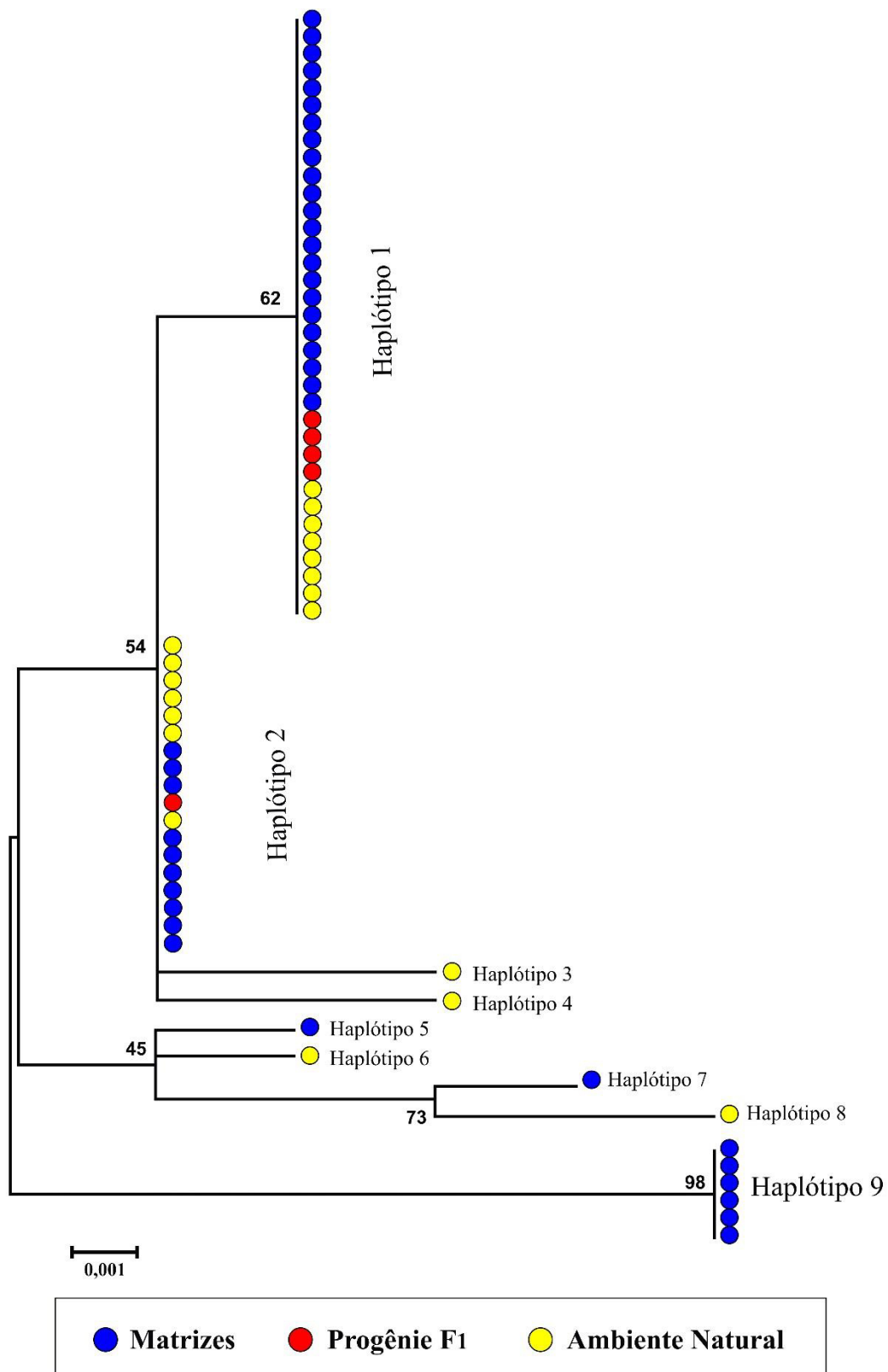


Figura 4. Árvore de máxima verossimilhança construída a partir da sequência mitocondrial *D-loop* de *Piaractus mesopotamicus* da bacia do alto rio Paraná e de matrizes e progênie F₁ de piscicultura, com o modelo Tamura 3-Parâmetros e 10.000 reamostragens.

Tabela 2. Índice de diversidade haplotípica e nucleotídica em sequência da região *D-loop*, com 472 pb, de populações de *Piaractus mesopotamicus* de plantel de matrizes de piscicultura, progênes F₁ e de ambiente natural da bacia do alto rio Paraná.

População	Nº amostras sequenciadas	Nº haplótipos	Diversidade Haplotípica (h)	Diversidade Nucleotídica (π)
Matrizes	41	5	0,618 \pm 0,062	0,00439 \pm 0,00090
Progênes F ₁	5	2	0,400 \pm 0,237	0,00085 \pm 0,00102
Natural	19	6	0,713 \pm 0,073	0,00352 \pm 0,00106
Total	65	9	0,633 \pm0,048	0,00397 \pm0,00073

De acordo com a análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 3), testada para averiguar a hipótese de estruturação entre as amostras, os valores demonstram que a maior porcentagem de variação está contida dentro do grupo amostral (97,56%), se comparado entre as populações (2,44%). Não foi detectada diferenciação genética entre as populações (Matrizes Progênes F₁ e a Natural).

Tabela 3. Análise de Variância Molecular (AMOVA) com base em sequências *D-loop* de populações de *Piaractus mesopotamicus* de plantel de matrizes de piscicultura, progênes F₁ e de ambiente natural da bacia do alto rio Paraná.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre populaces	2	2,595	0,02295	2,44NS
Dentro das populações	62	56,821	0,91646	97,56
Total	64	59,415	0,93941	

Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,02443NS

NS = P > 0,05

3.2 MARCADOR NUCLEAR ISSR

Os resultados da amplificação do ISSR com os *primers* (AACC)₄, (TAGG)₄ e (GGAC)₃A foram analisadas pela codificação dos locos polimórficos definidos pela presença ou ausência dos fragmentos (Figura 5) gerando uma matriz de dados binários, a escolha foi realizada pela presença das bandas mais nítidas e que se repetem caso seja utilizado as mesmas condições de amplificação. Em todos os indivíduos analisados o número de bandas

nítidas variou de quatro a seis e o tamanho dos fragmentos oscilou de 310 a 1900 pares de bases.

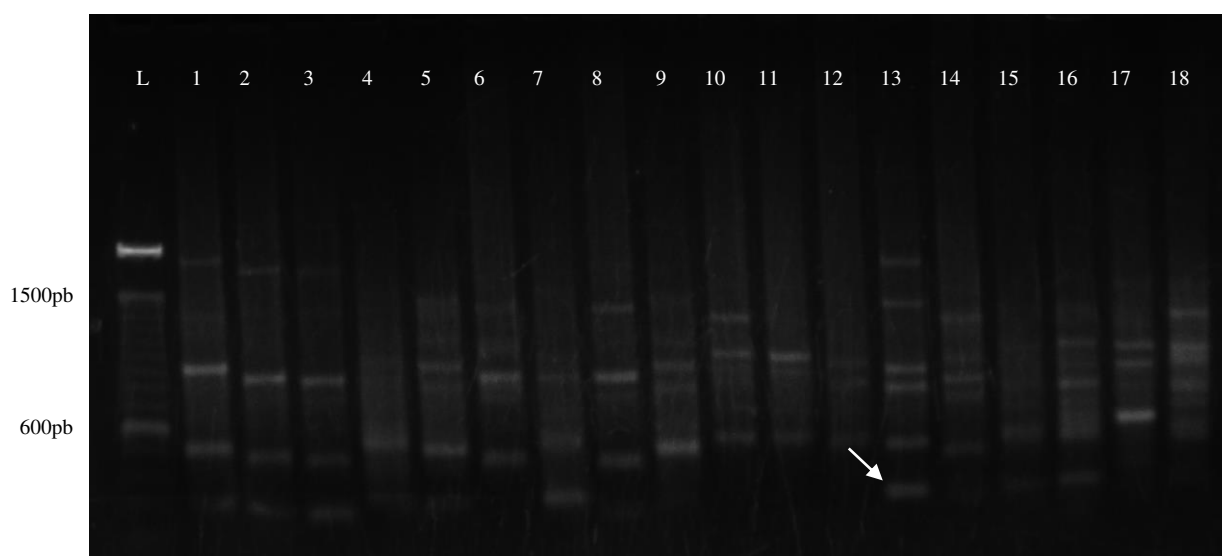


Figura 5. Fragmentos de DNA de *Piaractus mesopotamicus*, amplificados com o primer (GGAC)₃A. L- padrão molecular (*Ladder* 100 pb, Invitrogen). 1 a 18 (matrizes). Seta branca indica a presença de locus polimórfico entre os indivíduos.

Foi construído um dendrograma *neighbor-joining* (figura 6), que apresenta ramos longos, mostrando a distância entre os 9 haplótipos, similar aos resultados encontrados com o marcador molecular mitocondrial. Demonstra ainda, que existe diversidade entre as matrizes (M), progênes (F1) e a população de ambiente natural (AN), e que nenhum padrão de distribuição estruturada foi evidenciada.

A análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 4) também demonstra não haver diferenciação genética, conforme o Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,01484 entre as populações estudadas.

Tabela 4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) de populações de *Piaractus mesopotamicus* de plantel de matrizes de piscicultura, progênes F₁ e de ambiente natural da bacia do alto rio Paraná, baseada em marcadores moleculares ISSR.

Fonte de Variação	GL	Soma de Quadrados	Componentes de Variação	Porcentagem de Variação
Entre populaces	2	2,523	0,01284	1,48NS
Dentro das populações	95	81,007	0,85271	98,52
Total	97	83,531	0,86555	

Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,01484NS

NS = $P > 0,05$

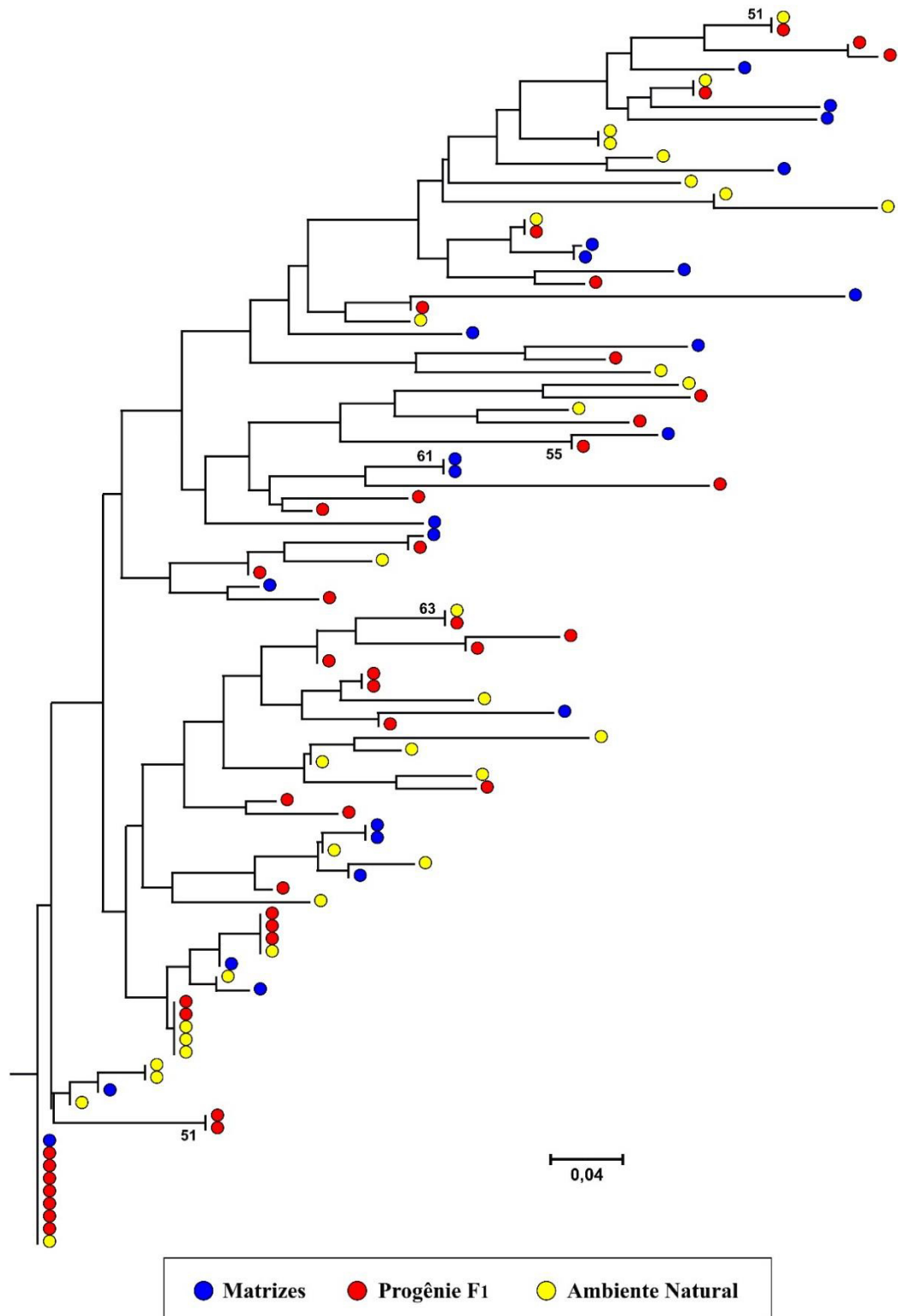


Figura 6. Dendrograma *neighbor-joining* baseado em complementos aritméticos da similaridade de Jaccard entre indivíduos de *Piaractus mesopotamicus* da bacia do alto rio Paraná e de matrizes e

progênes F_1 de piscicultura, com o modelo Tamura 3-Parâmetros e 10.000 reamostragens de *bootstrap*. Valores de *bootstrap* inferiores a 50 foram omitidos.

4 DISCUSSÃO

Em estoques produzidos para programas de repovoamento, o nível de variabilidade genética depende de vários fatores dentre eles a origem, o número de reprodutores utilizados, o manejo reprodutivo adotado e a diversidade genética dos peixes que formaram o estoque (LOPES *et al.*, 2009).

Alguns produtores, utilizando as facilidades crescentes propiciadas pela piscicultura, vêm conquistando espaço junto ao mercado com plantéis de matrizes cultivadas extraídas de populações nativas (SOUZA *et al.*, 2006). As amostras obtidas na piscicultura (matrizes) provêm de diferentes bacias hidrográficas, são provenientes do Pantanal, da planície de inundação do alto rio Paraná e também de pisciculturas de Cuiabá/MT, o que pode causar complicações ecológicas, genéticas a médio e longo prazo, por sofrerem diferentes níveis de impactos ambientais.

A variabilidade genética tem dois componentes, diversidade e diferenciação. A diversidade está associada à quantidade de variação genética enquanto a diferenciação tem a ver com a distribuição de variações genéticas entre as populações. ASHIKAGA (2013) ressalta que a variabilidade genética dos indivíduos e a forma com que esta variabilidade é distribuída dentro de uma população, identificada como sua estrutura genética populacional, constituem fatores fundamentais para a compreensão do material biológico. A importância deste conceito reside no fato de que o conhecimento da estrutura genética das populações de uma determinada espécie de peixe de interesse econômico como é o caso do pacu, objetiva além da conservação da espécie, a maximização de uma captura sustentável (HILSDORF *et al* 2006)

Vários pesquisadores se utilizam dos marcadores ISSR e *D-loop* para trabalhos com variabilidade genética visto que os mesmos têm sido eficientes em detectar polimorfismos intra e interpopulacionais. Ao analisar as amostras, foram identificados nove haplótipos com o marcador *D-loop*, dos quais três são compartilhados e sete são exclusivos, dentre os quais seis são únicos e o haplótipo 9 ocorre em seis indivíduos. Vale ressaltar que ao menos duas matrizes estudadas no trabalho foram utilizadas para gerar a F_1 analisada, visto que dois haplótipos diferentes estão presentes na prole analisada. Uma hipótese para a ocorrência de

haplótipos exclusivos é a de que, nas populações em que não foram encontrados, esses haplótipos sejam raros e ocorram em uma baixa frequência.

No presente estudo, os resultados mostraram que a diversidade entre as populações naturais em cativeiro e prole, sendo que as diversidades haplotípicas e nucleotídicas para matrizes e para amostras do ambiente natural são semelhantes. As diversidades haplotípicas são relativamente altas. Em princípio é uma evidência de que o plantel de matrizes não é endogâmico, ou seja, não é originário de reprodução entre indivíduos aparentados. Por outro lado, também evidencia que a população natural não está em risco por estreitamento da base genética. Mesmo que as progênies apresentem índices de diversidade menores.

A variabilidade genética encontrada nos indivíduos coletados em ambiente natural, matrizes e progênies é semelhante à encontrada por LOPERA-BARRERO *et al.* (2010), onde demonstram que essas populações apresentam variabilidade genética. Porém, alguns fatores dessa diversidade devem ser avaliados, como o número de matrizes disponíveis para o processo de reprodução. O plantel de matrizes estudado é maior do que a maioria dos planteis de estudos realizados anteriormente. Em alguns casos, a piscicultura utiliza apenas um casal de reprodutores, com consequências dramáticas para a diversidade genética. Tais resultados corroboram os que foram encontrados por JACOMETO *et al.* (2010), que analisaram estoques de *C. macropomum* e destacam que, ainda sendo comum encontrarmos resultados de perda de variabilidade genética em estoques mantidos em cativeiro, os resultados apontam que não houve evidência de perda de variabilidade. De acordo com o observado, ainda que ocorra algum nível de diversidade entre as populações, no padrão de agrupamento não se observa nenhuma separação dos indivíduos em subpopulações.

Os dados mostram que, considerando-se tanto as sequências *D-loop* quanto os marcadores ISSR, as composições moleculares das três populações não são exatamente iguais, mas não são suficientemente divergentes para indicar que as populações sejam diferentes. Resultados similares foram encontrados por ALMEIDA *et al.* (2003) com marcador RAPD em populações de *Pimelodus maculatus* do rio Tietê que eram geneticamente homogêneas. Ou seja, estes resultados indicam que não há diferenciação genética e que as populações estudadas podem ser consideradas geneticamente iguais. Em outras palavras, não há estruturação genética das populações. Evidentemente, não há migração de fato entre o plantel de matrizes e a população natural. Entretanto, os baixos valores de *Fst* revelam a origem comum das populações, o que equivaleria a intenso fluxo gênico entre as populações. Isto não surpreende, pois, o plantel de matrizes foi extraído em maioria de população natural.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O acesso a variabilidade genética dos estoques pesqueiros, juntamente com outros aspectos biológicos, é crucial para o sucesso e eficácia dos programas de repovoamento.

O estudo realizado com o pacu, um dos peixes nativos mais utilizados na piscicultura, evidenciou que as populações estudadas apresentam diversidade. Este fato sugere que o plantel de matrizes, progênies e os capturados em ambiente natural possam auxiliar no aumento do estoque, por evidenciar variabilidade genética da espécie. Porém, é altamente relevante enfatizar a necessidade de abordagens responsáveis em programas de repovoamento, amplamente aplicado por órgãos governamentais ou privados no Brasil, em sua maioria não há estudos mais abrangentes sobre a genética, ecologia ou também um acompanhamento ou avaliação detalhada sobre os peixes liberados bem como os prováveis impactos ocasionados no ambiente natural dessas espécies. Todos esses fatores devem ser estudados e avaliados, pois tudo que de alguma forma impacta o ambiente aquático deve ser relevante. Somente com essa abordagem integrada será possível vislumbrar viabilidade para os programas de repovoamento.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; GOMES L. C.; PELICICE. F.M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá, EDUEM, p.501, 2007.

ASHIKAGA, F. Y. **Análise da estrutura genética de *Brycon orbignyanus* na bacia do rio Paraná para fins de conservação**. Botucatu, 2013 Tese (doutorado em Universidade Estadual Paulista), Instituto de Biociências de Botucatu, 2013.

CRONIN, M. A.; SPERMAN, W. J.; WILMOT, R. L.; PATTON, J. C.; BICKHAIM, J. W. Mitochondrial DNA variation in chinook (*Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of polymerase chain reaction (PCR) products. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. v.50, p.708–715, 1993.

DOMINGOS, T. J.; MORAES, L.N.; MORESCO, R. M.; MARGARIDO, V. P.; VENERE, P. C. Genetic and morphological diversity of *Moenkhausia oligolepis* (Characiformes: Characidae) populations in the tributaries of the Araguaia River, Brazil: implications for taxonomy and conservation, **Genetics Molecular Research**, p.7979-7991, 2014.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Catalog of Fishes electronic version. Species by family/subfamily**. California Academy of Sciences. Available from:

<<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>>. Access in: 02/10/ 2015.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H.E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p.564-567. 2010.

FURUYA W.M. Espécies Nativas. In: Moreira H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro y S. Zimmermann (Eds). **Fundamentos da Moderna Aqüicultura**. Canoas. ULBRA, p.83-90 2001.

GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá: EDUEM, p.241, 2007.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41, p.95-98, 1999.

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. 43p.

JACOMETO, C. B.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. 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**, Brasília, v.45, p.481-487, 2010.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v.25, p.1451-1452, 2009.

LIDANI, K. C. F.; LIMA, J. R.; TORRES, R. A.; GABRIEL, J. E.; MADEIRA, H. M. F.; CARNEIRO, P. C. F. Genetic Variability of Jundiá (*Rhamdia quelen*) in Captivity. **Revista Acadêmica, Curitiba**, v.4, p.47-53, 2006.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R. P. POVH, J. A.; SIROL, R. N.; MANGOLIN, C. A. Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microsatélite. Belo Horizonte, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, p.954-963, 2010.

LOPES, T. S; STREIT J. D. P; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J. R.. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropum*. Belo Horizonte, **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, vol.61, 2009.

LUI, R. L.; BLANCO, D. R.; MARGARIDO, V. P.; KUHN, G. C.; GOMES, V. N.; PRIOLI, A. J.; MOREIRA-FILHO, O. A recent transposition of river involving Paraná and São Francisco basins: Effects on the genetic variability and structure of the neotropical fish *Parauchenipterus galeatus* (Siluriformes, Auchenipteridae). **Mitochondrial DNA**, v.23, p.388-395, 2012.

MEYER, A.; KOCHER, T. D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A. C. Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, v.347, p.550–553. 1990.

PANARARI-ANTUNES, R. S.; PRIOLI, A. J.; GOMES, V. N.; JULIO JR, H. F.; AGOSTINHO, C. S.; SILVA FILHO, J. P.; BONI, T. A.; PRIOLI, L. M. Genetic divergence among invasive and native populations of *Plagioscion squamosissimus* (Perciformes, Sciaenidae) in Neotropical regions. **Journal of Fish Biology**, v.80, p.2434-2447, 2012.

PAVLICEK, A.; HRDÁ, S.; FLEGR, J. FreeTree - Freeware program for construction of phylogenetic trees on the basis of distance data and bootstrap/jackknife analysis of the tree robustness. Application in the RAPD analysis of the genus *Frenkelia*. **Folia Biologica**, v.45, p.97-99, 1999.

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. **Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília**, v.43, p.201-20, 2008.

POVH, J.A. RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; GOMES, P. C.; BLANCK, D. V.; VARGAS, L.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T.S. Monitoramento da variabilidade genética de pacu *Piaractus mesopotamicus* do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1191-1195. 2009.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JULIO JR, H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, M. C.; PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.25, p.421-430, 2002.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; SANTOS, S. C. A.; VARGAS, L.; STREIT JR, D. P.; RIBEIRO, R. P. Genetic diversity of *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: Characidae) broodstocks using in the restocking program of Tietê river, Brazil. **Biosci. J.**, v. 29, p.478-486, 2013.

SOUZA, A. B.; CARVALHO, D. C.; MELO, D. C.; SEERIG, A. S.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, E. A.; CREPALD, D. V.; FARIA, P. M. C. The effect of a reduced number of breeders on fish culture: loss of genetic resource for stocking programs. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.30, p.100-104, 2006.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution** . v.30, p.2725-2729, 2013.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p.4673-4680, 1994.

GONZÁLEZ-WANGÜEMERT, M.; FERNANDEZ, T. V.; PÉREZ-RUZAFÁ, A.; D'ANNA, M. G. G.; BADALAMENTI, F. Genetic considerations on the introduction of farmed fish in marine protected areas: The case of study of white seabream restocking in the Gulf of Castellammare (Southern Tyrrhenian Sea). **Journal of Sea Research**, v. 68, p. 41–48, 2011.