

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

MARCIO DOUGLAS GOES

Estratégias de acasalamento com sêmen fresco e criopreservado na reprodução artificial de *Rhamdia quelen*: parâmetros reprodutivos e variabilidade genética dos parentais e das proles

Palotina

2016

MARCIO DOUGLAS GOES

Estratégias de acasalamento com sêmen fresco e criopreservado na reprodução artificial de *Rhamdia quelen*: parâmetros reprodutivos e variabilidade genética dos parentais e das proles

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável do Setor Palotina, da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável.

Área de concentração: Produção de organismos aquáticos

Orientador: Prof. Dr. Robie Allan Bombardelli

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Palotina

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

G598 Goes, Marcio Douglas
Estratégias de acasalamento com sêmen fresco e criopreservado na reprodução artificial, de *Rhamdia quelen*: parâmetros reprodutivos e variabilidade genética dos parentais e das proles.- Palotina, 2016.
63f.: il.; tab., graf.

Orientador: Robie Allan Bombardelli
Coorientador: Ricardo Pereira Ribeiro
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Curso de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável, 2016.

1. Aquicultura. 2. Criopreservação. 3. Jundiá. 4. Microsatélites.
I.. Bombardelli, Robie Allan. II. Ribeiro, Ricardo Pereira. III. Universidade Federal do Paraná..

CDU 636.98



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor PALOTINA
Programa de Pós Graduação em AQUICULTURA E
DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL
Código CAPES: 40001016078P2

TERMO DE APROVAÇÃO

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 **MARCIO DOUGLAS GOES**, intitulada: "**ESTRATÉGIAS DE ACASALAMENTO COM SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO NA REPRODUÇÃO ARTIFICIAL DE Rhamdia quelen: PARÂMETROS REPRODUTIVOS E VARIABILIDADE GENÉTICA DOS PARENTAIS E DAS PROLES**", após terem inquirido o aluno 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, 12 de Fevereiro de 2016.


Prof ROBIE ALLAN BOMBARDELLI (UFPR)
(Presidente da Banca Examinadora)


Prof LILIAN DENA DOS SANTOS (UFPR)


Prof THAIS SOUTO BIGOTTO (UNIOESTE)

Aos meus pais e avós

Aos professores

À minha amada esposa

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável da Universidade Federal do Paraná, por possibilitar a obtenção deste título.

À Tractebel Energia S.A. pelo auxílio financeiro por meio do Programa de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), projeto sob protocolo nº PD-0403-0026/2011.

À Universidade Estadual do Oeste do Paraná, que por meio do LaTRAAC (Laboratório de Tecnologia da Reprodução de Animais Aquáticos Cultiváveis), possibilitou a estrutura para realização do experimento.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisas PEIXEGEN, da Universidade Estadual de Maringá, onde pude realizar as análises de variabilidade genética.

Ao meu orientador Prof. Robie Allan Bombardelli, por me passar parte de seus conhecimentos no decorrer desses anos. Durante a graduação e o mestrado, ele foi meu mentor e um amigo valioso.

Ao meu co-orientador Prof. Ricardo Pereira Ribeiro, por abrir as portas do Laboratório de Biologia Molecular do PEIXEGEN, para que pudesse realizar as análises relacionadas à variabilidade genética.

Ao Prof. Nelson Mauricio Lopera-Barrero, pelo auxílio nas análises estatísticas para interpretação dos dados de variabilidade genética. Sua disponibilidade, paciência e encorajamento expandiram meus conhecimentos nos resultados deste trabalho.

À Profa. Thaís Souto Bignotto pelas sugestões construtivas durante o desenvolvimento do trabalho, pelo auxílio nas práticas de reprodução e extração do DNA e por disponibilizar um de seus orientados, Herivelto Beck de Souza, para ajudar nos trabalhos de reprodução.

Este trabalho contou com a ajuda de uma grande equipe de apoio em dois laboratórios: no LaTRAAC, agradeço aos colegas Cesar Pereira Rebechi de Toledo, Giovano Neumann, Rogerio Anderson Druzian, Marise Theisen, Rodrigo Aguiar da Silva, Edvaldo Geraldo Junior, Robson Araújo dos Santos, Cintia Nara Buratto, Sérgio Eduardo Zenni e Lucas Manoel Batista Pangoni. Especialmente, agradeço ao meu amigo e colega de graduação Giovano Neumann, que auxiliou no desenvolvimento das reproduções e nas análises de qualidade de sêmen.

No PEIXEGEN, agradeço ao Pedro Luiz de Castro, Jaisa Casetta e Bruna Galuch Pontillo, que auxiliaram nas análises do DNA.

Agradeço também aos meus parentes de Toledo, que sempre me acolheram com muito

amor, dando razão às nossas viagens à Toledo, aos objetivos do meu trabalho e desta dissertação.

Agradeço à minha esposa, Elenice Souza dos Reis Goes. Ela me deu incentivo e apoio para continuar, e mesmo quando parecia não haver solução nos problemas da vida acadêmica, ajudou-me a concentrar todas as energias no preparo desta dissertação. Além disso, minhas habilidades laboratoriais também foram desenvolvidas sob sua orientação, por isso agradeço-lhe pelo empenho no ensino da investigação científica, me mostrando o valor do trabalho duro e das horas de bancada.

Agradeço também ao grande e bom Deus, pois sem Ele em nossas vidas, nada somos.

Estratégias de acasalamento com sêmen fresco e criopreservado na reprodução artificial de *Rhamdia quelen*: parâmetros reprodutivos e variabilidade genética dos parentais e das proles

RESUMO

Objetivando avaliar os parâmetros reprodutivos e a variabilidade genética de proles de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de diferentes sistemas reprodutivos, conduziu-se um experimento em esquema fatorial 2x2, onde os fatores experimentais foram o emprego do sêmen fresco e criopreservado, e o acasalamento individual e por *pool* de gametas na fertilização artificial, além do acasalamento natural, totalizando cinco tratamentos. Para cada fator (sêmen fresco e sêmen criopreservado) e no acasalamento natural, foram utilizados seis jundiás (3♂ e 3♀). Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nas fecundidades absoluta e relativa das fêmeas, taxas de fertilização e eclosão dos ovos. Para percentual de larvas normais, o uso de sêmen fresco acarretou em maior ($P<0,01$) percentual de larvas normais, em comparação com o uso do sêmen criopreservado e do acasalamento natural. Nos índices de variabilidade genética das proles, o uso de sêmen fresco no acasalamento por *pool* resultou em maior número efetivo dos alelos e maior heterozigosidade esperada. A progênie do acasalamento natural apresentou maior heterozigosidade observada e menor coeficiente de endogamia entre as demais. O maior coeficiente de endogamia foi encontrado na progênie do sistema com uso de sêmen fresco e acasalamento individual, seguido da progênie proveniente de sêmen fresco e acasalamento por *pool* e das progênies com uso do sêmen criopreservado. Na contribuição parental dos machos, houve dominância reprodutiva de um macho no sistema utilizando sêmen fresco, e nos sistemas sêmen criopreservado e acasalamento natural, houve dominância de dois machos. Conclui-se que o uso do acasalamento por *pool* de gametas e o acasalamento natural resultam em maior variabilidade genética das progênies, e o uso de sêmen criopreservado não afeta a variabilidade genética das proles, mas diminui a percentual de larvas normais.

Palavras-chave: aquicultura; criopreservação; jundiá; microsatélites.

Mating strategies using fresh and cryopreserved semen in artificial breeding of *Rhamdia quelen*: reproductive parameters and genetic variability of parents and offspring

ABSTRACT

The reproductive parameters and the genetic variability of offspring of silver catfish (*Rhamdia quelen*) from different breeding systems was evaluated in a 2x2 factorial experiment, in which the experimental factors were the use of fresh and cryopreserved semen, and individual mating and mating by pool of gametes in artificial fertilization, in addition to natural spawning, totaling five treatments. For each factor (fresh semen and cryopreserved semen) and in natural spawning, there were used six silver catfish (3♂ and 3♀). No differences ($P > 0.05$) were detected for absolute and relative fertility of females, fertilization and egg hatching rates. The use of fresh semen resulted in higher ($P < 0.01$) percentage of normal larvae in comparison with the use of cryopreserved semen and natural spawning. As for the genetic variability of the offspring, using fresh semen for mating by pool resulted in a higher effective number of alleles and higher expected heterozygosity. Offspring from natural spawning showed the highest observed heterozygosity and the lowest inbreeding coefficient. The highest inbreeding coefficient was found in the offspring of the system using fresh semen and individual mating, followed by the offspring using fresh semen and mating by pool and offspring using cryopreserved semen. Regarding the parental contribution of males, there was reproductive dominance of a male in the system using fresh semen, and in systems using cryopreserved semen and natural mating, there was dominance of two males. It can be concluded that the use of mating by pool of gametes and natural spawning result in greater genetic variability of offspring, and the use of cryopreserved semen has no influence on the genetic variability of offspring, but reduces the percentage of normal larvae.

Key words: aquaculture; cryopreservation; silver catfish; microsatellites.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Desenho experimental adotado para condução dos acasalamentos do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).	19
Figura 2. Histogramas de frequências alélicas por <i>locus</i> para os reprodutores de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) utilizados em diferentes protocolos de acasalamento.	29
Figura 3. Histogramas de frequências alélicas por <i>locus</i> para progênes de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) utilizados em diferentes protocolos de acasalamento.	30
Figura 4. Contribuição parental dos machos (a) e fêmeas (b) nos sistemas reprodutivos utilizando <i>pool</i> de sêmen criopreservado e <i>pool</i> de ovócitos (Criopreservado); <i>pool</i> de sêmen fresco e <i>pool</i> de ovócitos (Fresco) e no acasalamento natural (Natural), em acasalamentos de três fêmeas para três machos de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos marcadores microssatélites utilizados	25
Tabela 2. Fecundidade absoluta (n° de ovos.fêmea ⁻¹) e relativa (n° de ovos.g de fêmea ⁻¹) de fêmeas de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>) submetida a diferentes protocolos de acasalamento.....	26
Tabela 3. Taxas de fertilização, taxas de eclosão e percentual de larvas normais de jundiás (<i>Rhamdia quelen</i>) submetidos a diferentes protocolos de acasalamento.	27
Tabela 4. Valores médios de número de alelos por <i>locus</i> (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de parentais de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) submetidos a diferentes protocolos de acasalamento.	31
Tabela 5. Valores médios de número de alelos por <i>locus</i> (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>) provenientes de diferentes protocolos de acasalamento.	32
Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) e coeficiente de ancestralidade (F_{ST}) para os diferentes agrupamentos entre parentais de jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	33
Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) e coeficiente de ancestralidade (F_{ST}) para os diferentes agrupamentos de proles provenientes da reprodução do jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>)	34
Tabela 8. Número de alelos por <i>locus</i> (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), riqueza alélica (A_R), alelos nulos (A_n), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de reprodutores de (<i>Rhamdia quelen</i>).....	46
Tabela 9. Valores médios de número de alelos por <i>locus</i> (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), riqueza alélica (A_R), alelos nulos (A_n) heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies (<i>Rhamdia quelen</i>).....	47
Tabela 10. Valores médios de número de alelos por <i>locus</i> (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies (<i>Rhamdia quelen</i>).....	48
Tabela 11. Valores médios de número de alelos por <i>locus</i> (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies (<i>Rhamdia quelen</i>).....	49

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL	1
1.1	Espécie estudada: o jundiá (<i>Rhamdia quelen</i>).....	1
1.2	Reprodução artificial de peixes	1
1.3	Criopreservação de sêmen.....	3
1.3.1	Danos ao DNA pela criopreservação.....	4
1.4	Variabilidade genética	5
1.4.1	Marcadores moleculares	6
1.5	Sistemas reprodutivos e influência na variabilidade genética.....	7
2	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	9
	OBJETIVOS.....	14
	ESTRATÉGIAS DE ACASALAMENTO COM SÊMEN FRESCO E CRIOPRESERVADO NA REPRODUÇÃO ARTIFICIAL DE <i>Rhamdia quelen</i> : PARÂMETROS REPRODUTIVOS E VARIABILIDADE GENÉTICA	15
1	INTRODUÇÃO.....	16
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	17
2.1	Animais e delineamento experimental	17
2.2	Manipulação hormonal e coleta de gametas.....	19
2.3	Avaliação do sêmen.....	20
2.4	Criopreservação do sêmen.....	21
2.5	Fertilização artificial.....	21
2.6	Acasalamento natural	22
2.7	Parâmetros reprodutivos das fêmeas e das proles	22
2.8	Análises da variabilidade genética	23
2.9	Análises estatísticas	25
3	RESULTADOS	26
3.1	Parâmetros reprodutivos	26
3.2	Variabilidade genética	27
3.3	Contribuição parental	34
4	DISCUSSÃO	36
5	CONCLUSÕES	40
6	REFERÊNCIAS	41
7	MATERIAL SUPLEMENTAR	45

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Espécie estudada: o jundiá (*Rhamdia quelen*)

A aquicultura nacional vem crescendo substancialmente nos últimos anos. Em 2011, a produção aquícola foi de 628.704,3 toneladas, representando um incremento de 31,1% em relação à produção de 2010 (MPA, 2013).

Dentre as espécies cultivadas na aquicultura nacional, o jundiá tem grande potencial de cultivo na região sul do Brasil, devido à rusticidade e tolerância às baixas temperaturas (Barcellos et al., 2003; Braun, et al., 2006). Nesta região, segundo o Censo Aquícola Nacional de 2008 (MPA, 2012), estão instaladas 99% das unidades produtivas de jundiá, sendo que em 2011 a produção total de jundiá correspondeu a 1.747,3 toneladas (MPA, 2013).

Rhamdia quelen (Quoy & Gaimard, 1824) é uma espécie de água doce, pertencente à família Heptapteridae (Bockmann e Guazzelli 2003), com ocorrência desde o sul do México até o centro de Argentina (Gomes et al., 2000). O jundiá possui hábito alimentar onívoro, podendo crescer em temperaturas de água mais baixas do que a maioria das outras espécies de peixes nativas brasileiras de interesse comercial (Vargas et al., 2014). A espécie caracteriza-se também pela facilidade para reprodução, além do bom sabor de sua carne e aceitabilidade por parte do consumidor (Gomes et al., 2000).

A crescente demanda por alevinos de jundiá requer a maximização da sua produção, através de estratégias de manejo dos reprodutores e de uma gestão eficiente da reprodução (Coldebella et al., 2011).

1.2 Reprodução artificial de peixes

De modo geral, o sucesso da piscicultura está estreitamente relacionado com a

capacidade de propagação das espécies por meio da produção de proles destinadas à criação voltada à engorda e abate ou para a formação do plantel de reprodutores (Furuya e Furuya, 2001). Nesse sentido, as técnicas de reprodução artificial de peixes são importantes para viabilizar a disponibilidade de alevinos em quantidade e qualidade necessária para atender à demanda dos sistemas produtivos.

O controle da função reprodutiva envolve todas as medidas para que ocorra a maturação, desova e produção de ovos fertilizados (Mylonas et al., 2010). A maturação pode abranger somente a manipulação das condições ambientais ou pode incluir a utilização de hormônios exógenos (Mylonas et al., 2010).

Na maioria das espécies criadas com objetivos comerciais e principalmente as espécies reofílicas brasileiras, o uso de hormônios é obrigatório para a prática de reprodução artificial (Almeida, 2013). O tipo de hormônio, dose, método de administração e procedimentos de aquisição de gametas podem variar dependendo da biologia reprodutiva da espécie, sendo necessária também uma compreensão do controle endócrino da gametogênese, maturação final e desova (Mylonas et al., 2010).

Além disso, a determinação de parâmetros quantitativos dos gametas, como a concentração espermática, permite controlar e otimizar as taxas de fertilização e, conseqüentemente, promover o uso racional de reprodutores em sistemas de cultivo (Sanches et al., 2011). Outras avaliações seminais pré-fertilização são: motilidade, duração da motilidade, concentração e características morfológicas dos espermatozoides (Felizardo et al., 2010).

Outra forma de obtenção dos ovos fertilizados, sem a utilização da coleta dos gametas a seco é o uso de um acasalamento natural. Nesse sistema, após a indução hormonal, as matrizes e reprodutores são alojados em um tanque circular com sistema de circulação de água forçada, a fim de simular condições ambientais para ocorrer a fertilização direta e aleatória pelos machos

no momento da desova (Castro, 2015). O escoamento da água na porção central mediante um cano direciona os ovos para uma estação coletora (incubadora cilindro-cônica) (Castro, 2015). Esse sistema permite uma diminuição no manejo dos animais, fator importante para peixes susceptíveis ao estresse por manejo e manipulação (Lopera-Barrero et al., 2010), podendo diminuir a mortalidade entre os reprodutores.

Porém, neste sistema observa-se a desvantagem da necessidade de retirada dos ovos do tanque e transferência para as incubadoras (Murgas et al., 2012), processo que pode prejudicar a evolução dos embriões e aumentar a possibilidade de infecção destes por fungos (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004).

Portanto, a desova a seco ainda é o sistema mais utilizado para reprodução de peixes reofílicos, visto que possibilita o controle do momento da desova e da fertilização dos ovos, além do uso do sêmen criopreservado.

1.3 Criopreservação de sêmen

A criopreservação é uma ferramenta poderosa, que permite a armazenagem de amostras de sêmen por tempo indeterminado. É definida como a preservação e armazenamento de material vivo ou não na temperatura do nitrogênio líquido (-196°C) durante um longo período de tempo (Routray et al., 2007).

Diversos benefícios são associados à criopreservação do sêmen, como sincronização da disponibilidade de gametas de ambos os sexos, economia de sêmen, simplificação da gestão dos reprodutores, transporte de gametas entre diferentes pisciculturas, e armazenamento de germoplasma para programas de melhoramento ou conservação de espécies (Cabrita et al., 2010). Entretanto, o uso de sêmen criopreservado não é habitual em reproduções rotineiras na piscicultura comercial, mas é uma ferramenta essencial para bancos de germoplasma (Pérez-Cerezales et al., 2009).

Apesar dos benefícios associados à criopreservação, esta técnica provoca vários tipos de danos nos espermatozoides, tais como perda de integridade da membrana plasmática e da sua funcionalidade, perda da motilidade e diminuição dos níveis de ATP, o que resulta na redução das taxas de fertilidade (Cabrita et al. 2005). Além disso, estudos recentes apontam que a criopreservação do sêmen provoca danos ao DNA das células, especialmente no que se refere a sua fragmentação (Cabrita et al. 2005; Pérez-Cerezales et al. 2009; Cabrita et al., 2011; Rani e Munuswamy, 2014).

1.3.1 Danos ao DNA pela criopreservação

A integridade do DNA do sêmen é essencial para a transmissão equilibrada de informação genética para as gerações futuras (Fernández-Gonzalez et al., 2008). Danos ao DNA causados pela criopreservação do sêmen não estão bem caracterizados, porém estudos prévios relataram quebras na cadeia simples e dupla, atribuídas a eventos oxidativos devido a geração de radicais livres durante o armazenamento (Pérez-Cerezales et al., 2009).

A maneira em que uma molécula de DNA é danificada durante a criopreservação parece ser uma combinação complexa de processos (Cabrita et al., 2010). As espécies reativas ao oxigênio (EROS) formadas durante a criopreservação podem modificar o DNA por oxidação e causar quebra de cadeia (Box et al., 2001). Estes danos oxidativos também podem afetar o DNA, pois são uma das causas da sua fragmentação (Pérez-Cerezales et al., 2009).

Esse estresse oxidativo químico e osmótico reduz a motilidade dos espermatozoides, viabilidade e capacidade de fertilização (Ball, 2008).

Além da produção de EROS, sugere-se também que a formação de cristais de gelo ou estresse osmótico pode quebrar o DNA por pressões mecânicas ou apoptose, que poderiam ocorrer durante o congelamento/descongelamento (Medeiros et al., 2002). Além disso, a susceptibilidade do DNA pode variar entre espécies (Pérez-Cerezales et al, 2009), indivíduos

ou durante o período reprodutivo (Cabrita et al, 2010).

Muitos esforços têm sido feitos recentemente para entender as injúrias ao DNA provocadas pela criopreservação, utilizando diferentes metodologias, tais como o ensaio cometa (eletroforese em gel de célula única), ensaio de TUNEL (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Nick-End-Labeling*), ensaio da estrutura da cromatina espermática e análise de sequências de DNA específicas utilizando PCR (reação em cadeia polimerase) em tempo real, uma vez que os danos ao DNA podem afetar a fertilidade ou o desenvolvimento do embrião (Cabrita et al., 2010).

Assim, Cabrita et al. (2005) sugerem que mais estudos devem ser realizados para avaliar a interação entre estes danos ao DNA e as taxas de eclosão, principalmente com relação à variabilidade genética das progênes.

1.4 Variabilidade genética

A habilidade de um organismo sobreviver e se reproduzir em diferentes ambientes está intimamente ligada à variabilidade genética da espécie (Santos e Renesto, 2013). A proteção da variabilidade genética é uma questão importante para a sustentabilidade e conservação das espécies (Vogiatzi et al. 2014).

Conforme Muniz (2007), a variabilidade genética entre as progênes é criada pela segregação cromossômica independente e pela recombinação genética durante a meiose. Assim, a aquicultura pode inadvertidamente diminuir a variabilidade genética presente em populações selvagens, pela seleção e melhoramento de espécimes ou pelo uso de um pequeno número de pais como reprodutores (Almeida et al. 2013).

O monitoramento genético através dos marcadores moleculares pode permitir o controle a endogamia e minimizar a redução da variabilidade genética e, portanto, é uma ferramenta que pode auxiliar no manejo reprodutivo (Povh, 2007).

1.4.1 Marcadores moleculares

Entre as técnicas de análise genética, os marcadores moleculares, também conhecidos como marcadores genéticos ou ainda biomarcadores, ocupam papel de destaque devido ao grande potencial de utilização para a obtenção de informações genéticas das espécies (Gasques et al., 2013).

Algumas classes de marcadores moleculares e bioquímicos são: aloenzimas/isoenzimas, RAPD (polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), SPAR (reação de amplificação com primer único), RFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), AFLP (polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), VNTR (número variável de repetições em *tandem* – minissatélites) e STR (repetições curtas em *tandem*) ou SSR (Sequências Simples Repetidas) (Marques, 2002), este último também conhecido como microssatélites. Estes métodos são baseados em PCR (reação em cadeia da polimerase), uma técnica *in vitro* que permite a amplificação de sequências específicas de ácido desoxirribonucléico (DNA) ou de ácido ribonucléico (RNA), sendo este último realizado a partir da síntese de DNA complementar (cDNA) (Mesquita et al, 2001). Esta técnica está possibilitando a caracterização da estrutura genética de diversas populações de peixes (Henriques, 2014).

Os microssatélites são os marcadores mais utilizados em estudos genéticos de peixes, por apresentarem alto polimorfismo, codominância e herança simples (Tavares et al., 2014). Consistem de pequenas sequências de 1 a 4 nucleotídeos repetidos em *tandem* (Penteado et al., 2011), sendo marcadores codominantes de DNA que possuem padrão de herança mendeliana (Henriques, 2014).

Os microssatélites garantem uma análise mais específica nas estruturas populacionais, pois apresentam taxas mais altas de mutação genética em relação a outras partes do DNA e,

portanto, são ótimos para estudar os acasalamentos e fluxo gênico (Yue e Orban, 2002).

Para que programas de conservação e produção de peixes apresentem resultados satisfatórios imediatos e de longo prazo, é imprescindível realizar o monitoramento genético dessas populações (Lopera Barrero et al., 2009), pois a diminuição da variabilidade genética em estoques de pisciculturas ocorre sobretudo por manejo reprodutivo inadequado (Frost et al., 2006).

1.5 Sistemas reprodutivos e influência na variabilidade genética

As estratégias de manejo reprodutivo dos peixes podem reduzir os níveis de variabilidade genética das proles e promover prejuízos a médio ou a longo prazo. Por exemplo, Porta et al. (2006a) observaram grande perda da variabilidade genética em apenas uma geração de linguado (*Solea senegalensis*) devido ao inadequado manejo reprodutivo. Assim, os estudos devem avaliar o número de reprodutores e tipo de sistema reprodutivo (por extrusão ou acasalamento natural), pois esse manejo pode afetar diretamente a variabilidade genética da progênie (Lopera-Barrero et al., 2014). O resultado dessas ações pode causar problemas de endogamia, adaptabilidade e sobrevivência das progênies (Povh et al., 2008).

Povh et al (2008), ao estudar populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com o intuito de monitoramento genético, encontraram valores altos de variabilidade genética nos alevinos, em comparação com os reprodutores do mesmo local, significando que o manejo adotado nessa piscicultura conseguiu manter a base genética nas progênies.

O uso do acasalamento natural, para algumas espécies, é conhecido por proporcionar conservação da variabilidade genética, comparado com a desova a seco (Reynalte-Tataje et al., 2013; Lopera-Barrero et al., 2014). Ensaios realizados com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*), sugerem uma grande redução da variabilidade genética em sistema de reprodução empregando-se a desova e fertilização a seco, em comparação ao sistema de acasalamento natural (Povh,

2007).

Porém, para outras espécies, o uso do acasalamento natural pode levar à dominância reprodutiva de alguns machos, e reduzir a variabilidade genética. Comparando os dois sistemas reprodutivos (desova a seco e acasalamento natural) para a piracanjuba (*Brycon orbignanus*), Castro (2015) observou que na desova a seco, a participação de cada macho na paternidade da progênie distribuiu-se mais homoganeamente, enquanto no acasalamento natural as relações de dominância de alguns machos sobre outros, interferiram diretamente para que os indivíduos dominantes deixassem um maior número de filhos. Sekino et al. (2003) relataram que a menor variabilidade genética encontrada na progênie de falso-alabote-japonês (*Paralichthys olivaceus*) foi devido à dominância de poucos machos na progênie, em que apenas um macho, de um total de seis, foi responsável por 99% da progênie.

Outro problema que pode ocorrer no acasalamento natural é a desova de somente algumas fêmeas, do total alocado no tanque de reprodução. Avaliando a reprodução de linguado (*Solea senegalensis*) em acasalamento natural, Porta et al. (2006b) concluíram que a grande redução da variabilidade genética na progênie foi devido à reprodução de apenas uma fêmea e dois machos, de um total de nove fêmeas e onze machos.

Apesar disso, a desova a seco também pode levar à dominância do sêmen de alguns machos, visto que Ribolli & Zaniboni-Filho (2009) observaram uma importante redução no número efetivo de reprodutores em acasalamentos de jundiá (*Rhamdia quelen*) na proporção de uma fêmea para um *pool* de sêmen de quatro machos, em relação aos acasalamentos individuais, fato possivelmente relacionado com a qualidade do sêmen. Assim, a utilização de um *pool* de sêmen na desova a seco pode reduzir a contribuição genética individual, uma vez que favorece alguns machos sobre os outros (Ribolli & Zaniboni-Filho, 2009).

Portanto, os estudos para avaliar a variabilidade genética das proles em diferentes sistemas de acasalamento são importantes para sugerir formas de diminuir a endogamia em

estoques mantidos em cativeiro, visto que esta endogamia pode levar ao declínio da produtividade, especialmente pelas perdas em crescimento e até mesmo à fixação de genes deletérios (Oliveira et al., 2011).

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almeida FL. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. Belo Horizonte 2013;37(2):174-180.

Almeida FSD, Lopes CM, Orsi ML, Sirol RN, Sodré LMK. Genetic monitoring by rapid markers for repopulation programs of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characiformes). *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 2013;35(2):119-126.

Ball BA. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Animal Reproduction Science* 2008;107:257–267.

Barcellos LJG, Kreutz LC, Rodrigues LB, Quevedo RM, Cericato L, Conrad J, Terra S. Haematological and biochemical characteristics of male jundia (*Rhamdia quelen* Quoy & Gaimard pimelodidae): Change after acute stress. *Aquaculture Research* 2003;34:1465-1469.

Bockmann FA, Guazzelli GM. Family Heptapteridae (Heptapterids). In: Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America, Porto Alegre: EDIPUCRS; 2003, p.406–431.

Box HC, Dawidzik JB, Budzinski EE: Free radical-induced double lesions in DNA. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001;31:856–868.

Braun N, De Lima RL, Moraes B, Loro VL, Baldisserotto B. Survival, growth and biochemical parameters of silver catfish, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824), juveniles exposed to different dissolved oxygen levels. *Aquaculture Research* 2006;37:1524-1531.

Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005;50(2):144-153.

Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirao J, Pérez-Cerezales S, Herráez, MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* 2010;26(5):623-635.

Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal reproduction Science* 2011;125(1):189-195.

Castro PL. Contribui o genética e reprodutiva de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodu o acasalamento natural e extrusão. Disserta o (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual de Maringá, 2015.

- Coldebella IJ, Neto JR, Mallmann CA, Veiverberg CA, Bergamin GT, Pedron FA, Ferreira D, Barcellos LJG. The effects of different protein levels in the diet on reproductive indexes of *Rhamdia quelen* females. *Aquaculture* 2011;312(1):137-144.
- Coldebella IJ, Emanuelli T, Veiverberg CA, Pretto A, Rossato S, Ferreira D, Neto JR. Effect of different dietary lipid levels on the reproduction of *Rhamdia quelen* (Quoy and Gaimard, 1824). *Aquaculture Nutrition* 2013;19(5):751-764.
- Felizardo VO, Mello RA, Murgas LDS, Andrade ES, Drumond MM, Rosa PV. Effect of cryopreservant combinations on the motility and morphology of curimba (*Prochilodus lineatus*) sperm. *Animal Reproduction Science* 2010;122(3-4):259-263.
- Fernández-Gonzalez R, Moreira PN, Pérez-Crespo M, Sánchez-Martín M, Ramirez MA, Pericuesta E, Gutiérrez-Adán A. Long-term effects of mouse intracytoplasmic sperm injection with DNA-fragmented sperm on health and behavior of adult offspring. *Biology of Reproduction* 2008;78(4):761-772.
- Frost LA, Evans BS, Jerry DR. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 2006;261:1056-1064.
- Furuya WM, Furuya VRB. Reprodução de Peixes. IN: MOREIRA HLM, VARGAS L, RIBEIRO RP, ZIMMERMANN S. Fundamentos da Moderna Aquicultura. Canoas: ULBRA; 2001, p. 200.
- Gasques LS, Beloni KP, Oliveira JR. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do Scielo. *Arquivos Ciências Veterinária Zoologia* 2013;16(1):47-50.
- Gomes LC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 2000;30:179-185.
- Gressler LT, Riffel APK, Parodi TV, Saccol EMH, Koakoski, G, Costa ST, Baldisserotto B. Silver catfish *Rhamdia quelen* immersion anaesthesia with essential oil of *Aloysia triphylla* (L'Hérit) Britton or tricaine methanesulfonate: effect on stress response and antioxidant status. *Aquaculture Research* 2014;45(6):1061-1072.
- Henriques JM. (2014). Análise da diversidade genética em Curimatá (*Prochilodus*) da Bacia do Prata e Amazônia. Tese (Doutorado). Universidade Estadual Paulista, Botucatu SP.
- Lopera-Barerro NM, Ribeiro RP, Povh JA, Vargas L, Jacometo CB, Gomes PC. Diversidad genética de lotes de *Piaractus mesopotamicus* usados em programas de repoblamiento y sus implicaciones en la conservación. *Agrociencia* 2009;43:249-256.
- Lopera-Barrero NM, Vargas L, Sirol RN, Ribeiro RP, Povh JA, Mangolin CA. Genetic characterization of *Brycon orbignyanus* using the semi-natural system. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2010;62(1):184-191.
- Lopera-Barrero NM, Alvarez CAR, Rodriguez-Rodriguez MP, Povh JA, Vargas L, Streit Júnior DP, Sirol RN, Ribeiro RP. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon*

orbignyanus obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. Semina: Ciências Agrárias 2014;35: 541-554.

Marques DKS. Aplicação da Biologia Molecular em Programas de Conservação de Recursos Pesqueiros. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 22 p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 36).

Medeiros CMO, Forell F, Oliveira ATD, Rodrigues JL. Current status of sperm cryopreservation: why isn't it better? Theriogenology 2002;57:327–344.

Mesquita RA, Anzai EK, Oliveira RN, Nunes FD. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. Pesquisa Odontologica Brasileira 2001;15(4):314-319.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim estatístico da pesca e aquicultura: Brasil 2011. Brasília, 2013. <
http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Boletim%20MPA%202011_FINAL.pdf >. Acesso em: 21 set 2013.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. Censo Aquícola 2008. Brasília, 2012. Disponível em http://www.mpa.gov.br/images/Docs/Informacoes_e_Estatisticas/Censo_maior2013-2.pdf Acesso em 15 abr 2014.

Murgas LDS, Felizardo VO, Ferreira MR, Veras GC, Andrade ES, Paula DAJ. Eficiência reprodutiva em espécies nativas de peixes de água doce. Ciência Animal 2012;22(1):197-206.

Mylonas CC, Fostier A, Zanuy S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. General and comparative endocrinology 2010;165(3):516-534.

Muniz, FRS. Análise de variabilidade genética em populações segregantes de soja. Tese (Doutorado em Agronomia). 2007. Universidade Estadual Paulista.

Oliveira SN, Ribeiro RP, Lopera-Barrero NM, Candioto FB, Resende EK, Legat AP. Análise genética de três gerações de tilápia do Nilo (linhagem GIFT) utilizando marcador molecular RAPD. Acta Scientiarum. Animal Sciences 2011;33:207-212.

Penteado PR, Kavalco KF, Pazzo R. Amplificação cruzada de seis loci microssatélites isolados de *Astyanax mexicanus* para espécies do gênero com distribuição Sul-Americana. Evolução e Conservação da Biodiversidade 2011;2:11-15.

Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez-Pastor F, Paz P, Herráez MP. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. Theriogenology 2009;71:605–613.

Porta J, Porta JM, Matínez-Rodríguez G, Alvarez MC. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. Aquaculture 2006a;251:46-55.

Porta J, Porta JM, Matínez-Rodríguez G, Del Carmen Alvarez, M. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. Aquaculture 2006b;256:159-166.

Povh JA. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. 2007. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá.

Povh JA, Lopera-Barrero NM, Ribeiro RP, Lupchinski Junior E, Gomes PC, Lopes TS. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria* 2008;35:25-35.

Rani KU, Munuswamy N. Effect of DNA damage caused by cryopreservation of spermatozoa using a modified Single cell gell electrophoresis in the freshwater catfish. *Journal of Coastal Life Medicine* 2014;2(7):515-519.

Reynalte-Tataje DA, Lopes CA, Ávila-Simas S, Garcia JRE, Zaniboni-Filho E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning? *Natural Science* 2013;5:1-6.

Ribolli J, Zaniboni-Filho E. Individual contributions to *pooled*-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology* 2009;7:629-634.

Routray P, Verma DK, Sarkar SK, Sarangi N. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. *Fish Physiology and Biochemistry* 2007; 33(4): 413-427.

Sanches EA, Marcos RM, Baggio DM, Tessaro L, Balen RE, Bombardelli RA. Estimativa da concentração espermática do sêmen de peixe pelo método de espermatócrito. *Revista Brasileira de Zootecnia* 2011;40(6):1163-1167.

Santos MR, Renesto E. Genetic variability in *Oligosarcus paranensis* (Teleostei: Characiformes) from the São Francisco river, Ivaí river basin–Paraná State, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 2013;35(3):389-394.

Sekino M, Saitoh K, Yamada T, Kumagai A, Hara M, Yamashita Y. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture* 2003;221:255-263.

Tavares RA, Piedras SRN, Nunes MD, Almeida DB, Moreira CGA, Fernandes JM, et al. Identification of microsatellite loci with amplification potential in "pejerrey" (*Odontesthes humensis*). *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2014;66(6):1941-1945.

Vargas RJ, Garcia AS, Baggio SR, Cargnin-Ferreira E, Fracalossi D M. A combination of plant oils promotes adequate growth of the freshwater catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard 1824). *Aquaculture Research* 2014; 46(12): 3046–3055.

Vogiatzi E, Kalogianni E, Zimmerman B, Giakoumi S, Barbieri R, Paschou P, Tsigenopoulos, CS. Reduced genetic variation and strong genetic population structure in the freshwater killifish *Valencia letourneuxi* (Valenciidae) based on nuclear and mitochondrial markers. *Biological Journal of the Linnean Society* 2014;111(2):334-349.

Yue GH, Orban L. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology Notes* 2002;2:99-100.

Zaniboni-Filho E, Nuñez APO. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In:

Cyrino, J.E.P., Urbinati, E.C., Fracalossi, D.M., Castagnolli, N, editores. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva, São Paulo: TecArt; 2004, p.533.

OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros reprodutivos e a variabilidade genética de proles de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de diferentes protocolos de acasalamento, empregando-se desova natural e, fertilização à seco com sêmen fresco e criopreservado.

**ESTRATÉGIAS DE ACASALAMENTO COM SÊMEN FRESCO E
CRIOPRESERVADO NA REPRODUÇÃO ARTIFICIAL DE *Rhamdia quelen*:
PARÂMETROS REPRODUTIVOS E VARIABILIDADE GENÉTICA**

RESUMO

Objetivando avaliar os parâmetros reprodutivos e a variabilidade genética de proles de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de diferentes sistemas reprodutivos, conduziu-se um experimento em esquema fatorial 2x2, onde os fatores experimentais foram o emprego do sêmen fresco e criopreservado, e o acasalamento individual e por “*pool*” de gametas na fertilização artificial, além do acasalamento natural, totalizando cinco tratamentos. Para cada fator (sêmen fresco e sêmen criopreservado) e no acasalamento natural, foram utilizados seis jundiás (3♂ e 3♀). Não foram observadas diferenças ($P>0,05$) nas fecundidades absoluta e relativa das fêmeas, taxas de fertilização e eclosão dos ovos. Para percentual de larvas normais, o uso de sêmen fresco acarretou em maior ($P<0,01$) percentual de larvas normais, em comparação com o uso do sêmen criopreservado e do acasalamento natural. Nos índices de variabilidade genética das proles, o uso de sêmen fresco no acasalamento por *pool* resultou em maior número efetivo dos alelos e maior heterozigosidade esperada. A progênie do acasalamento natural apresentou maior heterozigosidade observada e menor coeficiente de endogamia entre as demais. O maior coeficiente de endogamia foi encontrado na progênie do sistema com uso de sêmen fresco e acasalamento individual, seguido da progênie proveniente de sêmen fresco e acasalamento por *pool* e das progênies com uso do sêmen criopreservado. Na contribuição parental dos machos, houve dominância reprodutiva de um macho nos acasalamentos utilizando sêmen fresco, e nos acasalamentos com uso de sêmen criopreservado e acasalamento natural, houve dominância de dois machos. Conclui-se que o uso do acasalamento por *pool* de gametas e o acasalamento natural resultam em maior variabilidade

genética das progênies, e o uso de sêmen criopreservado não afeta a variabilidade genética das proles, mas diminui a percentual de larvas normais.

Palavras-chave: aquicultura; criopreservação, jundiá, microsatélites.

1 INTRODUÇÃO

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um peixe neotropical com ocorrência desde o sul do México até o centro de Argentina (Gomes et al., 2000), sendo uma espécie importante para aquicultura na América do Sul e também considerada como modelo biológico para estudos reprodutivos (Koakoski et al., 2012).

A reprodução em cativeiro de peixes neotropicais geralmente envolve a indução hormonal para promover a maturação final e desova, sendo que a maioria dos processos utiliza a técnica de extrusão para remover os gametas, seguida pela fertilização dos ovócitos a seco (Reynalte-Tataje et al., 2013), utilizando sêmen fresco ou criopreservado (Tsvetkova et al., 1996). O acasalamento natural, onde não há interferência humana durante a liberação dos gametas, também vem sendo estudado para peixes neotropicais, em função de poder reduzir a mortalidade e melhorar a taxa de fertilização (Lopera-Barrero et al., 2010; Reynalte-Tataje et al., 2013).

A utilização de protocolos inadequados de acasalamento e/ou fertilização artificial pode resultar em perda da variabilidade genética das proles (Porta et al. 2006a; Lopera-Barrero et al., 2010 e 2014). Esta diminuição da variabilidade genética pode ocorrer pela seleção e melhoramento de espécimes ou pelo uso de um pequeno número de pais para o acasalamento (Almeida et al., 2013). O resultado dessas ações pode causar problemas de endogamia, adaptabilidade e sobrevivência das progênies (Povh et al., 2008).

Além disso, alguns autores sugerem que a criopreservação do sêmen também pode afetar as taxas de eclosão e a variabilidade genética das progênies, pois apesar dos benefícios

associados à criopreservação, esta técnica pode provocar vários danos nos espermatozoides, podendo afetar sua funcionalidade (Cabrita et al. 2005) e diminuir a taxa de fertilização (Tsvetkova et al., 1996). Ademais, estudos recentes apontam que a criopreservação do sêmen provoca danos ao DNA das células, através de sua fragmentação (Cabrita et al. 2005; Pérez-Cerezales et al. 2009; Cabrita et al., 2011; Rani e Munuswamy, 2014).

Portanto, estudos relacionados com a determinação de protocolos de acasalamento e/ou fertilização artificial que promovam a manutenção da variabilidade genética das proles merecem destaque, pois os seus resultados podem subsidiar o sucesso ou o fracasso de programas de melhoramento genético ou de programas de conservação da biodiversidade de populações selvagens.

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os parâmetros reprodutivos e a variabilidade genética de proles de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de diferentes protocolos de acasalamento, empregando-se desova natural e fertilização à seco com sêmen fresco e criopreservado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais e delineamento experimental

Foram utilizadas 27 fêmeas ($270,18 \pm 21,80$ g) e 27 machos ($209,20 \pm 13,07$ g) de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de um estoque de reprodutores que estavam alojados em viveiros escavados de 200 m², revestidos com alvenaria e com fundo de terra, cujo abastecimento de água foi realizado apenas para compensar as perdas por evaporação e infiltração. Os peixes foram previamente alimentados com ração comercial contendo 32% de proteína bruta e 3.200 kcal de energia bruta/kg.

Os peixes foram submetidos à reprodução artificial por meio de acasalamento natural e

fertilização artificial empregando-se sêmen fresco e sêmen criopreservado. As reproduções com sêmen fresco e criopreservado foram realizadas utilizando acasalamento individual de três fêmeas com três machos. Para tanto, o sêmen de cada reprodutor foi utilizado para fertilizar individualmente os ovócitos de cada fêmea. Também foram realizados o *pool* de sêmen e de ovócitos, provenientes dos mesmos três machos e das três fêmeas. Destes *pools* foram retiradas amostras de gametas, os quais também foram submetidos a fertilização artificial. O mesmo procedimento foi adotado para o sêmen criopreservado, com outros três machos e outras três fêmeas. Estes procedimentos foram realizados em triplicata.

Para tanto, foi adotado um delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial 2x2 e três repetições (Figura 1), onde os fatores experimentais foram o emprego do sêmen fresco e criopreservado e, o acasalamento individual e o acasalamento por *pool* de gametas.

Além disso, outras três fêmeas e outros três machos foram utilizados para o acasalamento natural. De forma semelhante, estes procedimentos foram realizados em triplicata. Neste caso, adotou-se um delineamento experimental inteiramente casualizado, composto por cinco tratamentos e três repetições (Figura 1). Os tratamentos foram considerados como o acasalamento individual e o acasalamento por *pool* com sêmen fresco, o acasalamento individual e o acasalamento por *pool* com sêmen criopreservado, realizados anteriormente, e o acasalamento natural.

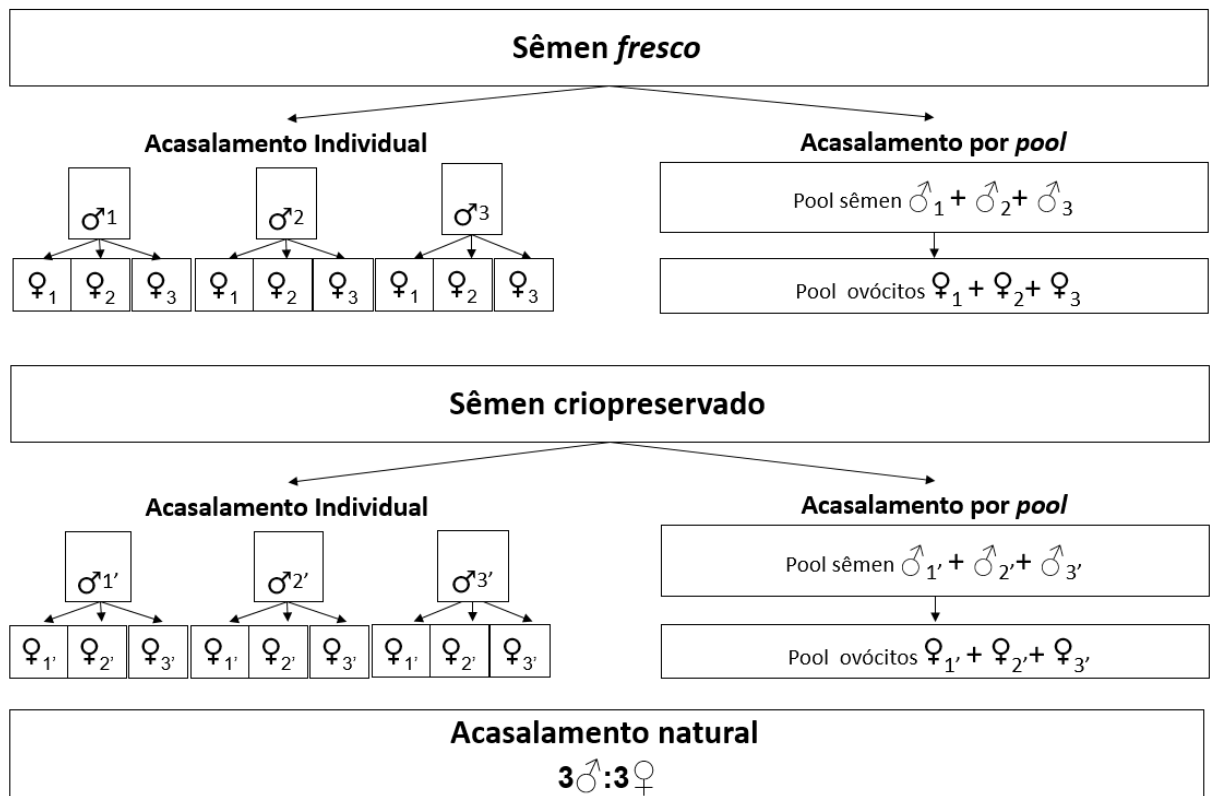


Figura 1. Desenho experimental adotado para condução dos acasalamentos do jundiá (*Rhamdia quelen*).

2.2 Manipulação hormonal e coleta de gametas

Os peixes selecionados para realização dos experimentos foram pesados, identificados e separados por sexo em tanques individuais, instalados em sistema de recirculação de água com filtro mecânico, filtro biológico e aquecimento elétrico.

As fêmeas foram submetidas à manipulação hormonal para indução da maturação final por meio da aplicação de 5,5 mg de extrato de pituitário de carpa (EPC)/kg de peso vivo. Esta manipulação hormonal foi dividida em duas aplicações, sendo 10% do total na primeira aplicação e o restante aplicado após 12 horas. Os machos receberam 2,5 mg de EPC/kg, aplicado em dose única, realizada concomitantemente com a segunda dose das fêmeas (Baldisserotto e Gomes, 2010; Adames et al., 2015).

Antes da coleta dos gametas, os peixes foram anestesiados em solução de benzocaína

na proporção de 1 g/10mL de álcool/10L de água (Stoskopf, 1993). A coleta dos gametas foi realizada conforme Bombardelli et al. (2006), após um período de 240 horas-grau (10h; água à 24°C), contadas a partir da segunda aplicação hormonal. Os gametas foram coletados a seco, sob leve pressão abdominal no sentido céfalo-caudal. Os primeiros ovócitos e as primeiras parcelas de sêmen foram desprezados para evitar possível contaminação por urina ou fezes. O restante dos ovócitos foi coletado diretamente em placa de Petri e o sêmen em um tubo de ensaio graduado.

2.3 Avaliação do sêmen

Os parâmetros de movimento espermático do sêmen fresco, foram realizadas em triplicata pelo sistema CASA (*Computer-Assisted Analysis*) conforme Adames et al. (2015). Para a ativação espermática, foi empregada uma relação de diluição de 1:70 (sêmen: água). Desta mistura 10 µL foram colocados em câmara hematimétrica de Neubauer e avaliados em microscópio óptico em objetiva de 40X (Nikon E200). As análises foram realizadas com um segundo de imagem, obtidas 10 segundos após o início da ativação espermática, sendo determinadas a motilidade espermática, linearidade, velocidade curvilínea, velocidade espermática média do caminho e velocidade espermática em linha reta (Adames et al., 2015). Os dados de velocidade espermática (velocidade curvilínea, velocidade espermática média do caminho e velocidade espermática em linha reta) foram agrupados pela análise de componentes principais (PCA), gerando uma nova variável chamada velocidade espermática (Tessaro et al., 2012). A concentração espermática foi determinada por contagem do número de espermatozoides em câmara de Neubauer (Wirtz e Steinmann, 2006)

2.4 Criopreservação do sêmen

O sêmen destinado a criopreservação foi diluído na proporção de 1:3 (v:v) em solução contendo 5% de glicose, 5% de leite em pó e 10% de metanol (Adames et al., 2015) e envasado em palhetas de 0,25 mL. Em seguida as palhetas foram submetidas ao pré-congelamento em botijão de vapor de nitrogênio pelo período de 18 horas (Adaptado de Carolsfeld et al., 2003) e, finalmente transferidas e armazenadas em nitrogênio líquido. Após dez dias, o sêmen foi descongelado em banho-maria a 25°C pelo período de 8 a 10 segundos e submetido às análises espermáticas descritas para o sêmen fresco.

2.5 Fertilização artificial

Nos ensaios de fertilização artificial dos ovócitos, 3 mL de ovócitos ($2564,68 \pm 644,79$ ovócitos) foram misturados à um volume de sêmen que disponibilizou 90.000 espermatozoides móveis:ovócito (Bombardelli et al., 2006). O sêmen fresco apresentava $2,81 \pm 0,35 \times 10^9$ espermatozoides/mL, com $84,03 \pm 3,23\%$ de espermatozoides móveis, velocidade espermática de $57,71 \pm 3,43 \mu\text{m/s}$ e linearidade de $0,93 \pm 0,01$. O sêmen criopreservado apresentava $2,68 \pm 0,52 \times 10^9$ espermatozoides/mL, com $54,49 \pm 3,42\%$ de espermatozoides móveis, velocidade de $52,48 \pm 3,31 \mu\text{m/s}$ e linearidade de $0,95 \pm 0,01$.

Em seguida foram adicionados 20 mL de água à 24°C para promover a ativação dos espermatozoides e dos ovócitos. O material foi suavemente homogeneizado por 60 segundos e, em seguida transferido para as incubadoras experimentais confeccionadas em PVC e com volume útil correspondente a 2,5 L, instaladas em um sistema de recirculação de água com 1.500 L, dotado de filtro mecânico, filtro biológico e aquecimento elétrico.

2.6 Acasalamento natural

Os machos e as fêmeas utilizados nos ensaios de acasalamento natural foram submetidos aos mesmos procedimentos de manipulação hormonal. Após a última aplicação hormonal, machos e fêmeas foram alojados em tanques de fibra de vidro de 500 L, instalados em sistema de recirculação de água, com alto fluxo, contendo filtro mecânico e controle térmico por meio de aquecimento elétrico. Cada tanque de acasalamento foi acoplado à um segundo tanque de utilizado para a coleta de ovos (Reynalte-Tataje et al., 2013).

2.7 Parâmetros reprodutivos das fêmeas e das proles

De todos os protocolos de acasalamento, foram mensuradas a fecundidade absoluta (Fecundidade absoluta = número de ovócitos/fêmea) e relativa do peso corporal (Fecundidade relativa = número de ovócitos/g de fêmea acasalada).

Doze horas após a fertilização artificial, foram mensuradas as taxas de fertilização dos ovócitos por meio da amostragem de 300 ovos de cada unidade experimental (Adames et al., 2015). Após a eclosão dos ovos, 300 larvas de cada unidade experimental foram transferidas para aquários de PVC para crescimento até o sexto dia de vida e posteriormente destinadas para as avaliações genéticas. Durante este período, as larvas foram alimentadas *ad libitum*, seis vezes ao dia com náuplios de *Artemia salina*. Todas as larvas foram fixadas em álcool etílico 92°, para posterior mensuração das taxas de eclosão ($\% \text{ de eclosão} = \frac{\text{número de pós-larvas}}{\text{n}^\circ \text{ total de ovos incubados}} \times 100$), percentual de larvas morfológicamente normais e parâmetros genéticos. O percentual de larvas normais foi realizado conforme Jeziarska et al. (2000) e Adames et al. (2015). Foram consideradas larvas normais aquelas sem qualquer alteração na coluna vertebral, cabeça, sistema visual, saco vitelino, sistema digestório ou nadadeiras rudimentares.

2.8 Análises da variabilidade genética

Para as análises de variabilidade genética, foram coletadas amostras de nadadeira caudal (0,5 cm² aproximadamente) dos reprodutores. De um dos ensaios de reprodução, foram coletadas dez larvas de cada um dos nove acasalamentos individuais (3♀x3♂), totalizando 90 larvas por tratamento. De forma semelhante, foram coletadas 90 larvas de um ensaio de acasalamento natural.

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008). Foram adicionados 550 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl), 30 µL de detergente SDS 20% e 10 µL de proteinase K (200 µg/mL), em microtubos de 1,5 mL contendo as amostras de nadadeira ou larvas. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 12 horas. O DNA foi precipitado com 600 µL de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos, precipitado com 700 µL de álcool etílico absoluto e incubado a -20°C por uma hora. O DNA foi centrifugado, lavado com 700 µL de álcool etílico absoluto e novamente centrifugado, sendo então ressuspenso em 70 µL de tampão TE (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA), tratado com 10 µL de RNase (30 µg/mL) em banho-maria a 37°C por uma hora, e em seguida estocado em freezer a -20°C.

O DNA foi quantificado em fluorímetro Qubit, utilizando o kit Qubit dsDNA BR Assay (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), conforme recomendações do fabricante. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng/µL. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese horizontal utilizando gel de agarose 1%, corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA), conduzida em tampão TBE 0,5X (250 mM Tris-HCl, 30 mM ácido bórico e 41,5 mM EDTA) a 70 V por 120 minutos, e posteriormente a imagem foi capturada utilizando aparelho transluminador com luz ultravioleta através do sistema de fotodocumentação L-PIX Image 1.0.1 (Loccus biotecnologia, São Paulo, SP, Brasil).

O DNA foi amplificado via PCR em um volume de reação de 15 μ L, utilizando tampão 1X Buffer 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP, 0,1 μ M de cada primer (*forward* e *reverse*), 0,5 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) e 20 ng do DNA alvo. As reações foram amplificadas em um termociclador Applied Biosystems Veriti (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Foram utilizados dez loci microssatélites descritos para *Rhamdia quelen* por Ríos et al. (2013) (Tabela 1). Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por dez minutos e em seguida foram realizados 35 ciclos, cada um consistindo de: 45 segundos de desnaturação a 94°C, 50 segundos de anelamento (temperatura específica de cada *locus* – Tabela 1) e 50 segundos de extensão a 72°C, após realizou-se uma extensão final a 72°C por dez minutos.

Os conjuntos de 10 μ L dos produtos amplificados e 5 μ L de tampão de corrida (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) foram submetidos à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida - 29:1) e uréia 6 M, conduzidas em solução tampão TBE 0,5X (250 mM Tris-HCl, 30 mM ácido bórico e 41,5 mM EDTA) a 180 V durante 8 horas.

Para visualização dos alelos microssatélites, os géis foram corados com nitrato de prata segundo metodologia descrita por Bassam et al. (1991) com algumas modificações. O gel foi submetido a uma solução de fixação (10% álcool etílico absoluto, 0,5% ácido acético) por 20 min, depois outra solução contendo 6 mM de nitrato de prata por 30 min e posteriormente, com uma prévia lavagem com água destilada, foi submerso numa solução reveladora com 0,75 M NaOH e 0,22% de formol 40%. Os géis foram fotografados com uma câmera digital X-785 OLIMPUS.

O tamanho dos alelos obtidos foi estimado por comparação com marcadores de peso molecular de 50 e 100 pb (Invitrogen, Carlsbad CA, EUA) pelo programa Kodak EDAS 290 Analysis System (Kodak, New Haven, CT, EUA).

Tabela 1. Características dos marcadores microssatélites utilizados (Ríos et al., 2013)

<i>Locus</i>	Número de acesso GENBANK	Sequência de primers (5'-3')	Temperatura de anelamento
Rhq2	KC117543	F: CCTCTTTCTCCTTCCCGTTT R: GCACTTGTTCTGTCTGTCC	58°C
Rhq7	KC117544	F: CTGCGGGAAGGTCTCTGTC R: GTCTCCGGCTCCTGGTATC	58°C
Rhq8	KC117545	F:AGTGCATGGATGGTCAATAGG; R: TCGTGATTGGAGGTGAGATG	58°C
Rhq13	KC117546	F: CCAGCTCCCAACAGTGAAAT; R: CGTGGAGAGGGTTCGTATGT	58°C
Rhq15	KC117547	F:AGTCTAATGTCTTAACCGCTGA; R: CGGTATCCTCTTTGGTATGC	54°C
Rhq16	KC117548	F:CGAGGAAGTGATGTTCTATTGT; R: ACACGGAGGATTGGTGATT	58°C
Rhq20	KC117549	F: TCGTGAGCAATGTGGTTATGT; R: GCCGCGAGATTAGTTTGTGT	58°C
Rhq26	KC117550	F: AACTACGCAGCCATTTACGG; R: CGGTTCGTGGGATGTCTATTC	58°C
Rhq28	KC117551	F:CCTCAGTGGTGGTAAGAGCAG; R: TCGAGCTTCCATGATACAAA	58°C
Rhq29	KC117552	F: TATACCTGCGCGTACCTGCT; R: TGCTAGGTGAATTACTGTGTCG	58°C

2.9 Análises estatísticas

Os dados obtidos para os parâmetros reprodutivos dos diferentes tratamentos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) à um nível de 5% de significância e, em caso de diferenças significativas foi aplicado o teste de Tukey para verificar diferenças entre médias. As análises foram realizadas pelo *software* STATISTICA 7.1[®] (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Quanto às análises de DNA, o número e frequência de alelos, a heterozigosidade observada e esperada foram estimados usando o programa PopGene 1.31 (Yeh et al., 1999). Os valores riqueza alélica e coeficiente de endogamia (Fis) foram estimados utilizando o programa

FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). O equilíbrio de Hardy Weinberg (Wright, 1978) foi calculado utilizando o programa GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995). O programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005) foi utilizado para determinar a diferenciação genética por meio das estimativas de F_{ST} (Weir e Cockerham, 1984) e para a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992). A presença de alelos nulos foi determinada pelo programa MicroChecker 2.2.3 (Oosterhout et al., 2004). A determinação da paternidade da progênie foi realizada através do programa PAPA versão 2.0 (Duchesne et al., 2002).

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros reprodutivos

As fêmeas submetidas à desova a seco com sêmen fresco ou criopreservado ou submetidas ao acasalamento natural apresentaram as mesmas fecundidades ($P > 0,05$) (Tabela 2), sendo liberados em média 21.142 ovos.fêmea⁻¹ ou 83 ovos.g de fêmea⁻¹.

Tabela 2. Fecundidades absoluta (nº de ovos.fêmea⁻¹) e relativa (nº de ovos.g de fêmea⁻¹) de fêmeas de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetida a diferentes protocolos de acasalamento.

	Uso de sêmen		Acasalamento natural	Valor P
	Fresco	Criopreservado		
Fecundidade absoluta	16.770,38±4.493,29	21.561,33±2.308,20	32.370±25.491,33	0,3518
Fecundidade relativa	57,61±15,38	91,51±5,08	119,44±87,20	0,1620

Dados expressos em média ± erro padrão da média.

As taxas de fertilização dos ovócitos e as taxas de eclosão dos ovos não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelos diferentes sistemas de acasalamento (individual, *pool* ou natural), nem pelo uso do sêmen fresco ou criopreservado (Tabela 3). Quando avaliados separadamente, as taxas de fertilização e as taxas de eclosão também não foram influenciadas ($P > 0,05$) pelo uso do sêmen fresco ou criopreservado. O mesmo comportamento dos resultados foi verificado quando avaliado separadamente os efeitos do acasalamento individual ou do acasalamento por

pool (Tabela 3).

Por outro lado, os maiores ($P < 0,05$) percentuais de larvas normais foram obtidas quando os ovócitos foram fertilizados com sêmen fresco, independentemente se o acasalamento foi individual ($95,34 \pm 0,60\%$) ou por *pool* ($95,06 \pm 1,07\%$) (Tabela 3). Quando avaliado separadamente, o sêmen fresco produziu maior ($P < 0,05$) percentual de larvas normais em comparação com o sêmen criopreservado (Tabela 3). Finalmente, quando avaliado separadamente, o acasalamento individual ou o acasalamento por *pool* produziram os mesmos ($P > 0,05$) percentuais de larvas normais (Tabela 3).

Tabela 3. Taxas de fertilização, taxas de eclosão e percentual de larvas normais de jundiás (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes protocolos de acasalamento.

Variáveis (%)	Uso de sêmen fresco		Uso de sêmen criopreservado		Acasalamento natural	Valor P
	Acasalamento por <i>pool</i>	Acasalamento individual	Acasalamento por <i>pool</i>	Acasalamento individual		
Fertilização	70,43±3,94	70,93±3,99	76,04±12,82	73,61±3,88	51,30± 18,37	0,6561
Eclosão	32,87±10,10	36,79± 3,53	52,01±18,54	45,53±4,66	30,94± 24,10	0,4580
Percentual de larvas normais	95,06±1,07 ab	95,34±0,60 a	88,37±2,76 b	87,86±2,16 b	80,75±0,04 c	0,0003*

Variáveis (%)	Uso de semen		Valor P
	Fresco	Criopreservado	
Fertilização	70,88±3,60	73,85± 3,65	0,6354
Eclosão	36,40±3,29	46,18±4,47	0,1430
Percentual de larvas normais	95,31± 0,55 a	87,91± 1,96 b	0,0443*

Variáveis (%)	Tipo de acasalamento		Valor P
	<i>Pool</i>	Individual	
Fertilização	73,24± 6,13	72,27± 2,76	0,9119
Eclosão	42,44±10,37	41,16±2,96	0,8917
Percentual de larvas normais	91,72± 1,99	91,60± 1,22	0,9728

Dados expressos em média \pm erro padrão da média. *Médias na mesma linha seguidas de letras distintas diferem entre si pelo teste de Tukey ($P < 0,05$)

3.2 Variabilidade genética

Dos dez *loci* microssatélites utilizados (Tabela 1), apenas um (Rhq29) não apresentou

padrão de bandas específico, sendo excluído das análises. Os demais *loci* (Rhq2, Rhq7, Rhq8, Rhq13, Rhq15, Rhq16, Rhq20, Rhq26 e Rhq28) apresentaram amplificação nítida, com alta especificidade, produzindo um total de 47 alelos polimórficos. O tamanho dos alelos variou entre 150 pb (Rhq15) e 345 pb (Rhq26). Foram observados um máximo de sete alelos para o *locus* Rhq2 e um mínimo de três alelos para Rhq13 e Rhq 8.

Para as frequências alélicas dos parentais (Figura 2), o maior valor (0,833) foi observado no sistema criopreservado para o *locus* Rhq7, alelo 282 pb. Os parentais dos acasalamentos utilizando sêmen fresco apresentaram alelos exclusivos nos *loci* Rhq2, Rhq15 e Rhq16. Alelos exclusivos também foram observados nos parentais do acasalamento com sêmen criopreservado (*loci* Rhq2 e Rhq 26) e no acasalamento natural (*loci* Rhq16 e Rhq28). Com relação a frequência alélica das progênes (Figura 3), a maior média (0,811 – 258 pb) foi observada no sistema de acasalamento por *pool* utilizando o sêmen fresco, para o *locus* Rhq8. Alelos exclusivos foram observados somente na progênie do sistema acasalamento natural, para o *locus* Rhq28 e Rhq 2. De modo geral, as frequências alélicas se mantiveram estáveis entre os parentais e as progênes, sendo que a maioria dos alelos de maior frequência nos reprodutores foram encontrados também nas proles.

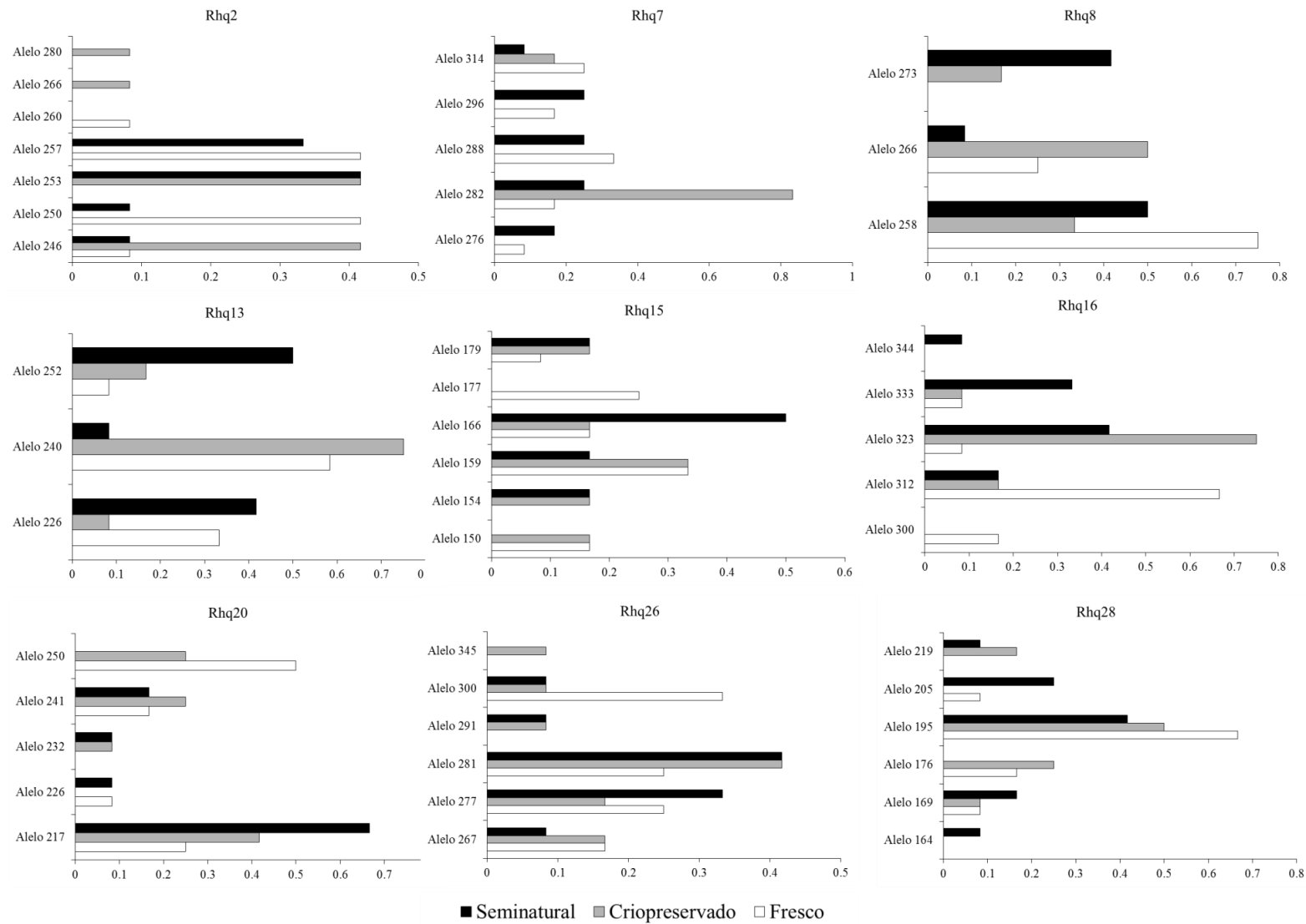


Figura 2. Histogramas de frequências alélicas por *locus* para os reprodutores de jundiá (*Rhamdia quelen*) utilizados em diferentes protocolos de acasalamento.

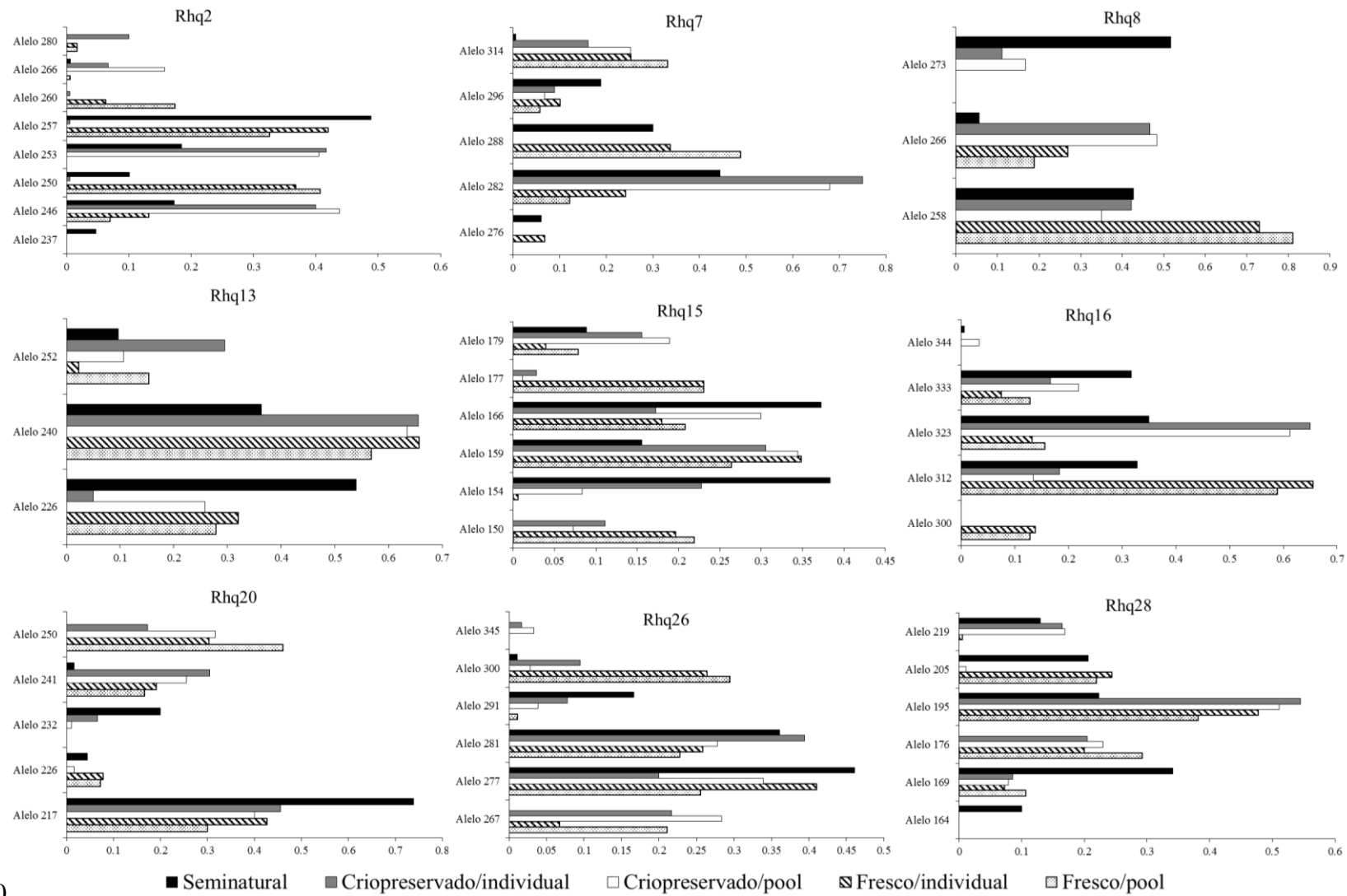


Figura 3. Histogramas de frequências alélicas por *locus* para progênes de jundiá (*Rhamdia quelen*) utilizados em diferentes protocolos de acasalamento.

Analisando somente os parentais (Tabela 4), os animais utilizados no acasalamento natural apresentaram o maior número médio de alelos e também maior número efetivo de alelos (4,222 e 3,053, respectivamente), seguido dos parentais do sistema que utilizou sêmen fresco (3,889 e 2,867, respectivamente) e criopreservado (3,778 e 2,747, respectivamente). Foram encontrados o mínimo de dois alelos no acasalamento utilizando sêmen fresco (Rhq8) e no criopreservado (Rhq7), e o máximo de seis alelos no sistema utilizando sêmen criopreservado (Rhq26) (Tabela 8 – Material Suplementar).

A maior média para heterozigosidade observada foi encontrada nos parentais utilizados no acasalamento com uso do sêmen fresco (0,537), seguida do acasalamento natural (0,500) e do acasalamento com uso do sêmen criopreservado (0,482). Quanto à heterozigosidade esperada, o acasalamento natural apresentou o maior valor (0,714), sendo que nesse tratamento também foi observada a maior média para o coeficiente de endogamia (0,320). Para os parentais, não houve desvio ($P > 0,05$) no equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os parentais dos acasalamentos com sêmen criopreservado apresentaram alelos nulos no locus Rhq15, e para o locus Rhq7 houve presença de alelos nulos para os parentais do acasalamento natural (Tabela 8 – Material Suplementar).

Tabela 4. Valores médios de número de alelos por locus (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de parentais de jundiá (*Rhamdia quelen*) submetidos a diferentes protocolos de acasalamento.

Variável	Parentais		
	Uso de sêmen fresco	Uso de sêmen criopreservado	Sistema Acasalamento natural
Na	3,889	3,778	4,222
Ne	2,867	2,747	3,053
Ho	0,537	0,482	0,500
He	0,667	0,631	0,714
F _{IS}	0,210	0,255	0,320
HWE	>0,05	>0,05	>0,05

Nos índices de variabilidade genética das proles (Tabela 5), pode-se observar que o uso

de sêmen fresco no acasalamento por *pool* resultou em maior número efetivo dos alelos (3,027) e maior heterozigidade esperada (0,638). A progênie do acasalamento natural apresentou maior heterozigidade observada (0,566) e menor coeficiente de endogamia (0,101) entre as demais. O maior coeficiente de endogamia foi encontrado na progênie do acasalamento com sêmen fresco e fertilização individual (0,229), seguido da progênie sêmen fresco e acasalamento por *pool* (0,167) e das progênies com uso do sêmen criopreservado (0,154 no acasalamento individual e 0,140 no acasalamento por *pool*).

Tabela 5. Valores médios de número de alelos por *locus* (Na), número efetivo de alelos por *locus* (Ne), heterozigidade observada (Ho), heterozigidade esperada (He), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies de jundiá (*Rhamdia quelen*) provenientes de diferentes protocolos de acasalamento.

Variável	Uso de sêmen fresco		Uso de sêmen criopreservado		Acasalamento natural
	Acasalamento por <i>pool</i>	Acasalamento individual	Acasalamento por <i>pool</i>	Acasalamento individual	
Na	4,111	4,222	4,222	4,333	4,222
Ne	3,027	2,897	2,768	2,805	2,842
Ho	0,532	0,483	0,536	0,517	0,566
He	0,638	0,625	0,623	0,611	0,629
F_{IS}	0,167	0,229	0,140	0,154	0,101
HWE	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

Variável	Uso de sêmen	
	Fresco	Criopreservado
Na	4,444	4,667
Ne	3,003	2,844
Ho	0,507	0,526
He	0,636	0,621
F_{IS}	0,204	0,153
HWE	<0,001	<0,001

Variável	Tipo de acasalamento	
	<i>Pool</i>	Individual
Na	4,888	4,888
Ne	3,498	3,354
Ho	0,533	0,500
He	0,692	0,675
F_{IS}	0,229	0,260
HWE	<0,001	<0,001

Quando avaliado separadamente, o sêmen criopreservado originou progênies com maior heterozigidade observada (0,526) e menor coeficiente de endogamia (0,153). Avaliando separadamente o tipo de acasalamento, verificou-se que o acasalamento por *pool* de ovócitos e

de sêmen resulta em progênie com maior número efetivo de alelos (3,498), maior heterozigosidade observada (0,533) e esperada (0,692), além de menor coeficiente de endogamia (0,229). Alelos nulos foram observados para todas as progênies nos *loci* Rhq2, Rh8 e Rhq13 (Tabela 10 – Material Suplementar).

Todas as progênies apresentaram desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,0001$) (Tabela 5). Os resultados dos índices de variabilidade genética por *locus* e por progênie podem ser observados nas Tabelas 9, 10 e 11 do Material Suplementar.

A análise de variância molecular (AMOVA) para diferentes agrupamentos entre os parentais (Tabela 6) evidenciou maior variação dentro dos grupos do que entre os agrupamentos utilizados. Moderada diferenciação genética foi observada na comparação entre os parentais dos diferentes sistemas reprodutivos, com os valores de coeficiente de ancestralidade variando de 0,10048 a 0,13021.

Tabela 6. Análise de variância molecular (AMOVA) e coeficiente de ancestralidade (F_{ST}) para os diferentes agrupamentos entre parentais de jundiá (*Rhamdia quelen*)

	Fonte de variação	Soma de quadrados	de Componentes da variância	Porcentagem de variação	F_{ST}
Parentais sêmen fresco x Parentais sêmen criopreservado	EG	8,167	0,437	13,02*	0,13021
	DG	64,250	2,920	86,98	
	Total	72,417	3,357		
Parentais sêmen fresco x Parentais acasalamento natural	EG	7,375	0,355	10,28*	0,10276
	DG	68,333	3,106	89,72	
	Total	75,708	3,461		
Parentais sêmen criopreservado x Parentais acasalamento natural	EG	7,083	0,338	10,05*	0,10048
	DG	66,583	3,026	89,95	
	Total	73,667	3,364		

EG: entre grupos; DG: dentro de grupos. * $P < 0,05$.

Na análise de variância molecular (AMOVA) para progênies de diferentes sistemas reprodutivos (Tabela 7), também foi observada maior variação dentro dos grupos do que entre

os agrupamentos utilizados. Conforme o coeficiente de ancestralidade (F_{ST}), alta diferenciação genética foi observada entre as proles obtidas com o sêmen fresco e criopreservado (0,15243). Também se verificou alta diferenciação genética ($F_{ST}>0,15$) nos agrupamentos *pool* fresco x *pool* criopreservado, individual fresco x individual criopreservado e sistema com sêmen fresco x acasalamento natural. Comparando as proles obtidas pelo acasalamento com *pool* de gametas e individual, pode-se observar F_{ST} de 0,00727, valor que indica pequena diferenciação genética entre estes grupos.

Tabela 7. Análise de variância molecular (AMOVA) e coeficiente de ancestralidade (F_{ST}) para os diferentes agrupamentos de proles provenientes da reprodução do jundiá (*Rhamdia quelen*)

Agrupamento de proles provenientes da reprodução utilizando	Fonte de variação	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação	F_{ST}
Sêmen fresco x Sêmen criopreservado	EG	182,619	0,499	15,24*	0,15243
	DG	1994,397	2,777	84,76	
	Total	2177,017	3,277		
Acasalamento por <i>pool</i> x Acasalamento individual	EG	10,969	0,022	0,73*	0,00727
	DG	2166,047	3,016	99,27	
	Total	2177,017	3,038		
Acasalamento por <i>pool</i> com sêmen fresco x Acasalamento por <i>pool</i> com sêmen criopreservado	EG	99,667	0,538	16,23*	0,16233
	DG	994,367	2,777	83,77	
	Total	1094,033	3,315		
Acasalamento individual com sêmen fresco x Acasalamento individual com sêmen criopreservado	EG	93,325	0,503	15,55*	0,15548
	DG	978,689	2,733	84,45	
	Total	1072,014	3,237		
Sêmen fresco x Acasalamento natural	EG	119,831	0,487	15,01*	0,15010
	DG	1485,881	2,761	84,99	
	Total	1605,711	3,249		
Sêmen criopreservado x Acasalamento natural	EG	117,670	0,478	14,79*	0,14786
	DG	1484,561	2,759	85,21	
	Total	1602,231	3,238		

EG: entre grupos; DG: dentro de grupos. * $P<0,05$.

3.3 Contribuição parental

Na contribuição parental dos machos (Figura 4), pode-se observar que no acasalamento

com uso de sêmen fresco, houve dominância reprodutiva de um macho, que foi responsável por 62% da prole. No acasalamento utilizando sêmen criopreservado, dois machos foram responsáveis por 83% da progênie, e no acasalamento natural, dois machos contribuíram com 92% do total de larvas.

Observando a contribuição parental das fêmeas (Figura 4), pode-se verificar que as fêmeas utilizadas nos acasalamentos com sêmen fresco e criopreservado contribuíram de forma similar para a formação das progênies. Porém, no acasalamento natural, observou-se que somente duas fêmeas foram responsáveis pela prole, sendo que nesse tratamento uma fêmea possivelmente não liberou ovócitos, não contribuindo assim na constituição da progênie.

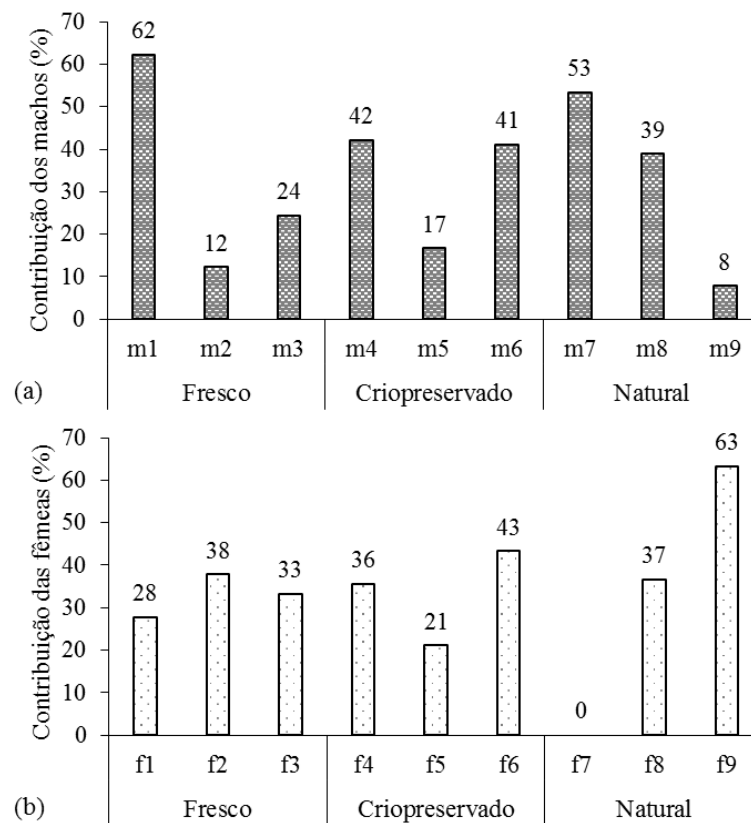


Figura 4. Contribuição parental dos machos (a) e fêmeas (b) nos sistemas reprodutivos utilizando *pool* de sêmen criopreservado e *pool* de ovócitos (Criopreservado); *pool* de sêmen fresco e *pool* de ovócitos (Fresco) e no acasalamento natural (Natural), em acasalamentos de três fêmeas para três machos de jundiá (*Rhamdia quelen*)

4 DISCUSSÃO

Apesar de os índices de fecundidade e das taxas de fertilização dos ovócitos provenientes de diferentes protocolos de acasalamento serem semelhantes, atenção deve ser dada aos acasalamentos naturais do *Rhamdia quelen*, pois são escassas as informações disponíveis sobre este tema para peixes neotropicais (Reynalte-Tataje et al., 2013), onde se verificam altos índices de variabilidade dos dados e ainda não estão definidos os parâmetros básicos como a proporção sexual ou o fluxo de água a ser utilizado. De forma semelhante, a ocorrência de maior percentual de larvas com algum tipo de alteração morfológica, provenientes dos protocolos de acasalamento natural, possivelmente estiveram relacionadas com o intenso manejo e manipulação dos ovos (Van Eenennaam et al., 2012), especialmente durante o seu carreamento para a caixa de coleta pelo fluxo de água, pela coleta e transferência para as incubadoras.

A maior ocorrência de larvas com anormalidades morfológicas nas proles provenientes dos acasalamentos com o sêmen criopreservado, em comparação ao sêmen fresco, podem estar associadas aos danos causados aos espermatozoides durante a criopreservação. Dentre vários, os danos celulares causados ao material genético têm recebido destaque e, frequentemente estão sendo relatados danos como a fragmentação do DNA dos espermatozoides submetidos a criopreservação (Cabrita et al. 2005; Pérez-Cerezales et al. 2009; Cabrita et al., 2011; Rani e Munuswamy, 2014) e outros tipos de alterações no DNA, tais como substituições de nucleotídeos, deleções e inserções (Kopeika et al., 2014).

Além disso, os danos no DNA do sêmen criopreservado do *Chondrostoma nasus* estão positivamente correlacionados com os defeitos nos embriões, especialmente no coração, olhos e boca, anormalidade no otólito e deformidade da coluna vertebral (Devaux et al., 2015). O uso do sêmen criopreservado também leva à diminuição da sobrevivência dos embriões de *Oncorhynchus mykiss* (Pérez-Cerezales et al., 2010) e, pode reduzir em até 23,37% a

sobrevivência dos embriões do *Misgurnus fossilis* (Kopeika et al., 2004). Apesar disso, os resultados desta pesquisa sugerem que o sêmen criopreservado mantém sua capacidade de fertilização dos ovócitos, fato este também documentado para a *Oncorhynchus mykiss* (Pérez-Cerezales et al., 2010).

Embora sejam reconhecidos os danos ao DNA do sêmen pelo processo de criopreservação, neste estudo não se pôde relacionar a criopreservação do sêmen com diminuição da variabilidade genética das progênes, como proposto por Cabrita et al. (2005). Hipóteses sugerem que, se a criopreservação do sêmen causa danos ao DNA, estes danos poderiam ser reparados pelo sistema de reparação intrínseca do ovócito após a fertilização (Kopeika et al., 2014).

Analisando os danos ao DNA em sêmen criopreservado de *Oncorhynchus mykiss*, Pérez-Cerezales et al. (2010) concluíram que pelo menos 10% dos danos ao DNA do sêmen podem ser reparados pelo sistema de reparação do DNA do ovócito após a fertilização, durante a primeira clivagem. Possivelmente, a reparação do DNA faz com que o processo de recombinação genética não seja afetado, não comprometendo de forma significativa a variabilidade genética da progênie. Além disso, embora os nove marcadores microssatélites utilizados neste estudo possam representar o genoma do *Rhamdia quelen*, existe uma grande possibilidade de a criopreservação causar danos ao DNA das proles em regiões do genoma fora dos locais abrangidos pelos microssatélites, não sendo possível detectá-los com um número limitado de marcadores moleculares.

Em comparação com as proles provenientes dos acasalamentos com sêmen fresco, a maior heterozigosidade observada na progênie obtida com uso do sêmen criopreservado em acasalamento por *pool* pode estar relacionada à contribuição parental dos machos e não ao processo de criopreservação. Esta hipótese pode ser corroborada pelas evidências de dominância reprodutiva de apenas um macho, que foi responsável por 62% da progênie obtida

com os acasalamentos com sêmen fresco, enquanto que, com o uso do sêmen criopreservado, a contribuição individual de cada macho foi mais homogênea (42; 41 e 17%). Conseqüentemente, isto pode ter resultado em maior heterozigosidade observada, e menor coeficiente de endogamia. Efeitos semelhantes de dominância reprodutiva do sêmen foram relatados para o *Rhamdia quelen* (Ribolli e Zaniboni-Filho, 2009) e outras espécies neotropicais (Povh et al., 2010; Alonso et al., 2012; Lopera-Barrero et al., 2014), contudo, os mecanismos que envolvem este processo ainda não são claros.

De modo geral, independentemente se as proles foram obtidas pelo uso do sêmen fresco ou sêmen criopreservado, o acasalamento por meio de *pool* de gametas garante maior variabilidade genética das proles, uma vez que este protocolo promove o maior número efetivo de alelos, maior heterozigosidade observada e esperada e menor coeficiente de endogamia. Isso se deve ao fato de que no acasalamento individual, a variabilidade genética das proles fica limitada, pois o material genético de cada reprodutor contém no máximo dois alelos por *locus*, o que diminui a combinação de alelos na prole resultante (Yasui, 1998). No acasalamento por *pool* de gametas, a presença de vários materiais genéticos permite uma maior combinação de alelos na prole, o que possivelmente aumenta sua variabilidade genética, corroborando os resultados do presente estudo. Porém, ressalta-se que o acasalamento deve ser feito com *pool* de ovócitos e de sêmen (3♂:3♀), pois Ribolli e Zaniboni-Filho (2009) verificaram que a utilização de *pool* de sêmen em ovócitos de somente uma fêmea (4♂:1♀) favorece gametas de alguns machos sobre outros, reduzindo desta forma a variabilidade genética da progênie de jundiá (*Rhamdia quelen*).

Apesar do acasalamento natural apresentar dominância reprodutiva de dois machos e duas fêmeas, as proles apresentaram o maior valor de heterozigosidade observada e menor coeficiente de endogamia em relação aos demais protocolos de acasalamento. Em geral, o processo de acasalamento natural de peixes neotropicais é pouco compreendido e muitas vezes

os resultados das pesquisas são contraditórios. Reynalte-Tataje et al. (2013) e Lopera-Barrero et al. (2014) sugerem a eficiência do acasalamento natural na conservação da variabilidade genética das proles, quando comparado com a desova a seco. O acasalamento natural apresenta vantagens, pois permite a sincronização natural na liberação dos gametas, permitindo que o *pool* gênico de poucos indivíduos seja representado com maior heterogeneidade na progênie e preservando a variabilidade genética (Cacho et al., 2007; Lopera-Barrero et al., 2014). Por outro lado, a variabilidade genética das proles proveniente do acasalamento natural pode ser comprometida pela dominância reprodutiva de alguns machos ou devido à ausência de desova de algumas fêmeas ou espermiacão de alguns machos (Sekino et al., 2003; Porta et al., 2006b), normalmente ocasionada pela ineficiência na escolha de machos e fêmeas aptos à reprodução. Contudo, dependendo do destino das proles, seja para programas de melhoramento genético ou programas de conservação da biodiversidade, a escolha por protocolos de acasalamento que promovam a manutenção ou a melhora da variabilidade genética são preferíveis em relação a outros que garantam a produção de maior quantidade de larvas.

O desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg encontrado para as progênies de todos os tratamentos pode ser resultado da presença de alelos nulos nos *loci* Rhq2, Rh8 e Rhq13. Os alelos nulos podem ser resultado de amostragem não-randômica, dos sistemas de acasalamento ou endogamia (Souza et al., 2012). Conforme Dakin e Avise (2004), desvios significativos no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser explicados por uma baixa eficiência de amplificação dos *loci* utilizados, com posterior aumento da quantidade de alelos nulos. Além disso, desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg em estoques mantidos em cativeiro podem ser ocasionados pela eventual deriva genética desses animais, que se isolaram e diferenciaram-se nesses ambientes, em um efeito conhecido como *Wahlund*, que tende a ampliar-se com o passar das gerações (Romana-Eguia et al. 2004).

Quanto aos coeficientes de ancestralidade, pequena variação genética foi observada

somente na comparação entre as proles do acasalamento por *pool* e individual (0,00727), fato esperado já que estas progênes tinham os mesmos parentais. Nos demais agrupamentos analisados, pode-se observar alta diferenciação entre as proles, possivelmente devido a presença de moderada diferenciação entre os machos e as fêmeas, ocorrida possivelmente pela presença de alelos exclusivos nos parentais.

Portanto, neste estudo pode-se comprovar que a variabilidade genética da progênie de jundiá (*Rhamdia quelen*) é mais afetada pelo tipo de acasalamento utilizado na fertilização a seco (*pool* de gametas ou individual), do que pelo tipo de sêmen (fresco ou criopreservado), e que a dominância reprodutiva do sêmen apresenta grande influência sobre a heterogeneidade genética das proles. Apesar da variabilidade genética não ser afetada pelo tipo de sêmen, ressalta-se que o sêmen criopreservado leva à produção de menor número de larvas normais em comparação com proles advindas de acasalamento com sêmen fresco. O uso do acasalamento natural, embora possa originar proles com maior variabilidade genética em relação aos demais protocolos de acasalamento, produziu menor quantidade de larvas normais, mostrando que possivelmente a variabilidade genética não está relacionada com defeitos nas larvas de jundiá (*Rhamdia quelen*).

5 CONCLUSÕES

Conclui-se que a fertilização artificial a seco utilizando acasalamento por *pool* de gametas e o acasalamento natural resultam em maior variabilidade genética das progênes de jundiá (*Rhamdia quelen*). O uso do sêmen criopreservado não afeta a variabilidade genética das proles, mas diminui a produção de larvas normais.

6 REFERÊNCIAS

- Adames MS, Toledo, CPR, Neumann G, Buzzi AH, Buratto CN, Piana PA, Bombardelli RA. Optimization of the sperm: oocyte ratio and sperm economy in the artificial reproduction of *Rhamdia quelen* using fructose as a sperm motility modulator. *Animal Reproduction Science* 2015;161:119-128.
- Almeida FSD, Lopes CM, Orsi ML, Sirol RN, Sodré LMK. Genetic monitoring by rapid markers for repopulation programs of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characiformes). *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 2013;35(2):119-126.
- Alonso F, Honji RM, Moreira RG, Pandolfi M. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: Anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. *Physiology & Behavior* 2012;106(5):612-618.
- Baldisserotto B, Gomes LC. Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. 2th ed. Santa Maria: UFSM; 2010.
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 1991;196:80-83.
- Bombardelli RA, Mörschbacher EF, Campagnolo R, Sanches EA, Syperreck MA. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). *Revista Brasileira de Zootecnia* 2006;35(4):1251-1257.
- Cabrita E, Robles V, Rebordinos L, Sarasquete C, Herráez MP. Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 2005;50(2):144-153.
- Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirao J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* 2010;26(5):623-635.
- Cabrita E, Ma S, Diogo P, Martínez-Páramo S, Sarasquete C, Dinis MT. The influence of certain aminoacids and vitamins on post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal reproduction science* 2011;125(1):189-195.
- Cacho MSRF, Yamamoto ME, Chellappa S. Mating system of the amazonian cichlid angel fish, *Pterophyllum scalare*. *Brazilian Journal of Biology* 2007;67(1):161-165.
- Carolsfeld J, Godinho HP, Zaniboni Filho E, Harvey BJ. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* 2003;63(2):472-489.
- Dakin EE, Avise JC. Microsatellite nulls alleles in parentage analysis. *Heredity* 2004;93:504-509.
- Devaux A, Bony S, Plenet S, Sagnes P, Segura S, Suaire R, Olivier JM. Field evidence of reproduction impairment through sperm DNA damage in the fish nase (*Chondrostoma nasus*) in anthropized hydrosystems. *Aquatic Toxicology*, 2015; 169:113–122.

Duchesne P, Godbout MH, Bernatchez L. PAPA (Package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. *Molecular Ecology* 2002;2:191-193.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM. Analysis of molecular variant inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 1992;131:479-491.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin Ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 2005;4(1):47-50.

Gomes LC, Golombieski JI, Gomes ARC, Baldisserotto B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). *Ciência Rural* 2000;30:179-185.

Goudet J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001. Available at <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm> [Accessed Sept 16, 2015]

Jeziarska B, Lugowska K, Witeska M, Samowski P. Malformations of newly hatched common carp larvae. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Poznan* 2000;2(2):1-10.

Koakoski G, Oliveira TA, Rosa JGS, Fagundes M, Kreutz LC, Barcellos LJG. Divergent time course of cortisol response to stress in fish of diferente ages. *Physiology Behavior* 2012;106:129-132.

Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM, Holt WV. Effect of DNA repair inhibitor (3-aminobenzamide) on genetic stability of loach (*Misgurnus fossilis*) embryos derived from cryopreserved sperm. *Theriogenology* 2004;61(9):1661-1673.

Kopeika J, Thornhill A, Khalaf Y. The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos: principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence. *Human reproduction update* 2014;21(2):209-227.

Lopera-Barrero NM, Povh JA, Ribeiro RP, Gomes PC, Jacometo CB, Lopes TS. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). *Ciencia e Investigación Agraria* 2008;35(1):77-86.

Lopera-Barrero NM, Vargas L, Sirol RN, Ribeiro RP, Povh JA, Mangolin CA. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema Acasalamento natural. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 2010;62(1):184-191.

Lopera-Barrero NM, Alvarez CAR, Rodriguez-Rodriguez, MP, Povh JA, Vargas L, Streit Júnior DP, Sirol RN, Ribeiro RP. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. *Semina: Ciências Agrárias* 2014;35: 541-554.

Oosterhout CV, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 2004;4:535-538.

Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Cabrita E, Martínez-Pastor F, Paz P, Herráez MP. Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology* 2009;71:605–613

Pérez-Cerezales S, Martínez-Páramo S, Beirão J, Herráez MP. Fertilization capacity with rainbow trout DNA-damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction* 2010;139(6):989-997.

Porta J, Porta JM, Matínez-Rodríguez G, Alvarez MC. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole *Solea senegalensis* inferred by microsatellites. *Aquaculture* 2006a;251:46-55.

Porta J, Porta JM, Matínez-Rodríguez G, Alvarez MD. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. *Aquaculture* 2006b;256:159-166.

Povh JA, Lopera Barrero NM, Ribeiro RP, Lupchinski Jr E, Gomes PC, Lopes TS. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria* 2008;35:25-35.

Povh JA, Ribeiro RP, Sirol RN, Streit Junior DP, Moreira HLM, Siewerdt F, Lopera Barrero NM, Mangolin CA, 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* 2010;2(53):389-396.

Rani KU, Munuswamy N. Effect of DNA damage caused by cryopreservation of spermatozoa using a modified Single cell gell electrophoresis in the freshwater catfish. *Journal of Coastal Life Medicine* 2014;2(7):515-519.

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

Reynalte-Tataje DA, Lopes CA, Ávila-Simas S, Garcia JRE, Zaniboni-Filho E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning? *Natural Science* 2013;5:1-6.

Ribolli J, Zaniboni-Filho E. Individual contributions to *pooled*-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. *Neotropical Ichthyology* 2009;7:629-634.

Ríos N, Bouza C, Pardo BG, Guerra-Varela J, Gutierrez V, Martinez P, García G. Pyrosequencing for microsatellite discovery and validation of markers for population analysis in the non-model Neotropical catfish *Rhamdia quelen*. *Molecular Ecology Resources* 2013;13:546-549.

Romana-Eguia MRR, Ikeda M, Baisao ZU, Taniguchi N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 2004;236:131-150.

Sanches EA, Bombardelli RA, Marcos RM, Neumann G, Toledo CPR, Romagosa E. Sperm motility of *Rhamdia quelen* studied using computer-assisted analysis by open-source software.

Aquaculture Research 2010;42(1):1-4.

Sekino M, Saitoh K, Yamada T, Kumagai A, Hara M, Yamashita Y. Microsatellite-based pedigree tracing in a Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* hatchery strain: implications for hatchery management related to stock enhancement program. *Aquaculture* 2003;221:255-263.

Souza CA, Hashimoto DT, Pereira LHG, Oliveira C, Foresti F, Porto-Foresti F. Development and characterization of microsatellite loci in *Phractocephalus hemioliopterus* (Siluriformes: Pimelodidae) and their cross-species amplification in six related species. *Conservation Genetics Resources* 2012;4(2):499-501.

Stoskopf, M.K. *Fish medicine*. W.B. Saunders Company: Philadelphia; 1993.

Tessaro L, Toledo CPR, Neumann G, Krause RA, Meurer F, Natali MRM, Bombardelli RA. Growth and reproductive characteristics of *Rhamdia quelen* males fed on different digestible energy levels in the reproductive phase. *Aquaculture* 2012;326:74–80.

Tsvetkova LI, Cosson J, Linhart O, Billard R. Motility and fertilizing capacity of fresh and frozen-thawed spermatozoa in sturgeons *Acipenser Baeri* and *Acipenser ruthenus*. *Journal of Applied Ichthyology* 1996;12(2):107-112.

Van Eenennaam JP, Linares-Casenave J, Doroshov SI. Tank spawning of first generation domestic green sturgeon. *Journal of Applied Ichthyology* 2012;28(4):505-511.

Weir BS, Cockerham CC. Estimating F-Statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 1984;38:1358-1370.

Wirtz S, Steinmann P. Sperm characteristics in perch *Perca fluviatilis* L. *Journal of Fish Biology* 2006;68:1896–1902

Wright S. *Evolution and Genetics of Populations*. Chicago: University of Chicago 1978.

Yasui Y. The genetic benefits' of female multiple mating reconsidered. *Trends in Ecology & Evolution* 1998;13(6):246-250.

Yeh FC, Boyle TYZ, Xiyang JM. *PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis*. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research 1999.

7 MATERIAL SUPPLEMENTAR

Tabela 8. Número de alelos por *locus* (Na), número efetivo de alelos por locus (Ne), riqueza alélica (A_R), alelos nulos (An), heterozigidade observada (Ho), heterozigidade esperada (He), coeficiente de endogamia (FIS) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de reprodutores de *Rhamdia quelen*

<i>Locua</i>	Variáveis	Uso de sêmen fresco	Uso de sêmen criopreservado	Acasalamento natural
Rhq2	Na	4	4	5
	Ne	2,769	2,769	3,273
	A_R	4	4	5
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,333	0,667	0,500
	He	0,697	0,697	0,758
	F _{IS}	0,545	0,048	0,362
	HWE	0,079	1,000	0,1621
Rhq7	Na	5	2	5
	Ne	4,235	1,384	4,500
	A_R	5	2	5
	An	Não	Não	Sim
	Ho	0,667	0,333	0,333
	He	0,833	0,303	0,848
	F _{IS}	0,216	-0,111	0,630
	HWE	0,546	1,000	0,014
Rhq8	Na	2	3	3
	Ne	1,600	2,571	2,323
	A_R	2	3	3
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,167	0,333	0,500
	He	0,409	0,667	0,621
	F _{IS}	0,615	0,524	0,211
	HWE	0,269	0,047	0,653
Rhq13	Na	3	3	3
	Ne	2,182	1,674	2,323
	A_R	3	3	3
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,667	0,333	0,333
	He	0,591	0,439	0,621
	F _{IS}	0,143	0,259	0,487
	HWE	0,636	0,273	0,214
Rhq15	Na	5	5	4
	Ne	4,235	4,500	3,000
	A_R	5	5	4
	An	Não	Sim	Não
	Ho	0,500	0,000	0,333
	He	0,833	0,848	0,723
	F _{IS}	0,423	1,000	0,565
	HWE	0,028	0,001	0,037
Rhq16	Na	4	3	4
	Ne	2,057	1,674	3,130
	A_R	4	3	4
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,667	0,500	0,667
	He	0,561	0,439	0,742
	F _{IS}	-0,212	-0,154	0,111
	HWE	1	1	1
Rhq20	Na	4	4	4
	Ne	2,880	3,273	2,057
	A_R	4	4	4
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,833	0,833	0,667
	He	0,712	0,757	0,561
	F _{IS}	-0,190	-0,111	0,212
	HWE	0,478	1	1
Rhq26	Na	4	6	5
	Ne	3,789	4	3,273
	A_R	4	6	5
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,667	0,833	0,667
	He	0,803	0,818	0,758
	F _{IS}	0,184	-0,020	0,130
	HWE	0,4197	0,4628	1
Rhq28	Na	4	4	5
	Ne	2,057	2,880	3,600
	A_R	4	4	5
	An	Não	Não	Não
	Ho	0,333	0,500	0,500
	He	0,561	0,712	0,788
	F _{IS}	0,429	0,318	0,388
	HWE	0,030	0,342	0,091

Tabela 9. Valores médios de número de alelos por *locus* (Na), número efetivo de alelos por locus (Ne), riqueza alélica (A_R), alelos nulos (An) heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies *Rhamdia quelen*.

<i>Locus</i>	Variável	Fresco		Criopreservado		Acasalamento natural
		<i>pool</i>	Individual	<i>pool</i>	Individual	
Rhq2	Na	6	5	3	7	6
	Ne	3,255	3,002	2,629	2,872	3,178
	A _R	3,758	3,573	2,878	3,501	4,087
	An	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Ho	0,453	0,448	0,438	0,455	0,547
	He	0,697	0,671	0,623	0,655	0,689
	F _{IS}	0,351	0,333	0,298	0,306	0,207
	HWE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001
	Rhq7	Na	4	5	3	3
Ne		2,728	3,989	1,885	1,677	3,058
A _R		3,320	4,248	2,553	2,572	3,523
An		Não	Sim	Não	Não	Não
Ho		0,535	0,449	0,393	0,389	1,000
He		0,637	0,754	0,472	0,406	0,677
F _{IS}		0,161	0,405	0,168	0,042	-0,482
HWE		0,005	0,000	0,006	0,050	0,000
Rhq8		Na	2	2	3	3
	Ne	1,442	1,650	2,605	2,449	2,209
	A _R	1,926	1,980	2,891	2,767	2,511
	An	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
	Ho	0,044	0,022	0,389	0,444	0,157
	He	0,308	0,396	0,619	0,595	0,550
	F _{IS}	0,856	0,944	0,374	0,254	0,715
	HWE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Rhq13	Na	3	3	3	3
Ne		2,359	1,869	2,078	1,927	2,310
A _R		2,857	2,237	2,730	2,457	2,713
An		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Ho		0,409	0,348	0,258	0,222	0,420
He		0,579	0,467	0,522	0,484	0,570
F _{IS}		0,295	0,256	0,506	0,542	0,264
HWE		0,000	0,000	0,000	0,000	0,006
Rhq15		Na	5	6	6	6
	Ne	4,542	4,049	3,897	4,712	3,149
	A _R	4,476	4,265	4,304	4,794	3,557
	An	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
	Ho	0,708	0,382	0,535	0,556	0,389
	He	0,784	0,757	0,743	0,792	0,686
	F _{IS}	0,098	0,497	0,288	0,300	0,435
	HWE	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
	Rhq16	Na	4	4	4	3
Ne		2,477	2,122	2,261	2,066	3,028
A _R		3,511	3,289	3,135	2,815	3,046
An		Não	Não	Não	Não	Não
Ho		0,555	0,609	0,528	0,533	0,911
He		0,599	0,532	0,561	0,519	0,673
F _{IS}		0,074	-0,147	0,059	-0,028	-0,355
HWE		0,002	0,100	0,006	0,983	0,000
Rhq20		Na	4	4	5	4
	Ne	2,979	3,155	3,067	3,885	1,700
	A _R	3,489	3,554	3,281	3,468	2,556
	An	Não	Não	Não	Não	Não
	Ho	0,800	0,798	0,822	0,822	0,522
	He	0,668	0,687	0,678	0,667	0,414
	F _{IS}	-0,199	-0,163	-0,215	-0,231	-0,263
	HWE	0,000	0,033	0,001	0,001	0,046
	Rhq26	Na	5	4	6	6
Ne		4,023	3,234	3,627	3,879	2,696
A _R		3,998	3,532	3,987	4,417	3,021
An		Não	Não	Não	Não	Sim
Ho		0,678	0,786	0,778	0,722	0,478
He		0,756	0,695	0,728	0,746	0,633
F _{IS}		0,104	-0,133	0,068	0,033	0,246
HWE		0,000	0,0241	0,000	0,000	0,000
Rhq28		Na	4	5	5	4
	Ne	3,440	3,001	2,864	2,675	4,246
	A _R	3,692	3,579	3,629	3,504	4,447
	An	Sim	Sim	Não	Sim	Sim
	Ho	0,607	0,500	0,685	0,511	0,671
	He	0,713	0,670	0,654	0,630	0,769
	F _{IS}	0,150	0,255	-0,047	0,189	0,129
	HWE	0,014	0,001	0,0108	0,010	0,000

Tabela 10. Valores médios de número de alelos por *locus* (Na), número efetivo de alelos por locus (Ne), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies *R. quelen*.

<i>Locus</i>	Variável	Fresco	Criopreservado
Rhq2	Na	6	7
	Ne	3.189	2.784
	A_R	6	6.899
	Ho	0.450	0.446
	He	0.688	0.642
	F_{IS}	0.346	0.305
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq7	Na	5	3
	Ne	3.387	1.785
	A_R	5	3
	Ho	0.491	0.391
	He	0.706	0.441
	F_{IS}	0.305	0.114
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq8	Na	2	3
	Ne	1.546	2.538
	A_R	2	3
	Ho	0.033	0.416
	He	0.354	0.607
	F_{IS}	0.906	0.315
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq13	Na	3	3
	Ne	2.113	2.081
	A_R	3	3
	Ho	0.378	0.240
	He	0.528	0.521
	F_{IS}	0.284	0.540
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq15	Na	6	6
	Ne	4.327	4.464
	A_R	5.972	6
	Ho	0.544	0.544
	He	0.228	0.778
	F_{IS}	0.294	0.301
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq16	Na	4	4
	Ne	2.299	2.167
	A_R	4	4
	Ho	0.581	0.530
	He	0.566	0.540
	F_{IS}	-0.027	0.018
	HWE	0.00109	0.00696
Rhq20	Na	4	5
	Ne	3.165	3.095
	A_R	4	5
	Ho	0.798	0.822
	He	0.686	0.678
	F_{IS}	-0.165	-0.212
	HWE	0.00003	0.00000
Rhq26	Na	5	6
	Ne	3.743	3.908
	A_R	4.999	6
	Ho	0.731	0.750
	He	0.734	0.746
	F_{IS}	0.004	-0.005
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq28	Na	5	5
	Ne	3.255	2.771
	A_R	4.966	5
	Ho	0.553	0.598
	He	0.694	0.640
	F_{IS}	0.204	0.066
	HWE	0.00000	0.00064

Tabela 11. Valores médios de número de alelos por *locus* (N_a), número efetivo de alelos por locus (N_e), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS}) e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) de progênies *R. quelen*.

<i>Locus</i>	Variável	<i>pool</i>	Individual
Rhq2	N_a	7	7
	N_e	5.309	4.996
	A_R	7	7
	H_o	0.445	0.452
	H_e	0.814	0.802
	F_{IS}	0.453	0.437
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq7	N_a	4	5
	N_e	3.214	0.802
	A_R	4	5
	H_o	0.462	0.419
	H_e	0.690	0.673
	F_{IS}	0.331	0.379
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq8	N_a	3	3
	N_e	2.188	2.126
	A_R	3	3
	H_o	0.216	0.234
	H_e	0.544	0.531
	F_{IS}	0.603	0.559
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq13	N_a	3	3
	N_e	2.217	2.039
	A_R	3	3
	H_o	0.333	0.284
	H_e	0.550	0.511
	F_{IS}	0.395	0.443
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq15	N_a	6	6
	N_e	4.704	4.969
	A_R	6	6
	H_o	0.620	0.469
	H_e	0.789	0.801
	F_{IS}	0.215	0.415
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq16	N_a	5	4
	N_e	3.197	2.872
	A_R	5	4
	H_o	0.541	0.570
	H_e	0.689	0.653
	F_{IS}	0.214	0.127
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq20	N_a	5	5
	N_e	3.122	3.168
	A_R	4.999	5
	H_o	0.811	0.810
	H_e	0.681	0.686
	F_{IS}	-0.191	-0.181
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq26	N_a	6	6
	N_e	4.162	3.946
	A_R	6	6
	H_o	0.727	0.754
	H_e	0.761	0.748
	F_{IS}	0.045	-0.007
	HWE	0.00000	0.00000
Rhq28	N_a	5	5
	N_e	3.370	3.022
	A_R	5	5
	H_o	0.646	0.505
	H_e	0.705	0.671
	F_{IS}	0.084	0.247
	HWE	0.00000	0.00000