

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

DIVERSIDADE GENÉTICA DE TRÊS ESTOQUES DE
PIAPARA (*Leporinus elongatus*), UTILIZANDO RAPD

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

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

MARINGÁ
Estado do Paraná
fevereiro – 2007

“Há homens que lutam um dia e são bons.
Há outros que lutam um ano e são melhores.
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.
Porém, há os que lutam toda a vida.
Esses são os imprescindíveis”.

Bertolt Brecht

DEDICO

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

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

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

AGRADECIMENTOS

À Deus.

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

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

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

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International, à piscicultura de Rolândia e ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná, pelas amostras fornecidas.

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

Aos mestres Jayme Aparecido Povh e Nelson Maurício Lopera Barrero, pelo companheirismo, competência, amizade, carinho dedicado e constante apoio em todas as etapas deste trabalho.

Agradeço em especial à minha família, pelo amor, torcida e incentivo em todos os momentos.

Aos amigos Iraúza, Thiago, Fabiane, Juninho e Franciely pelo carinho, incentivo e companheirismo.

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

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

À Zeni, técnica do laboratório, pelo companheirismo.

Aos meus vizinhos Wellington, Murilo, Ivan, Jurandir, Carly e Marco Aurélio pela amizade e incentivo.

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

BIOGRAFIA

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

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

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

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

No dia 28 de fevereiro de 2007, submeteu-se à banca para defesa da Dissertação.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE APÊNDICES.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
I-INTRODUÇÃO	1
II-REFERÊNCIAS.....	10
III-DIVERSIDADE GENÉTICA DE TRÊS ESTOQUES DE PIAPARA (<i>Leporinus elongatus</i>), UTILIZANDO RAPD.....	14
Resumo.....	14
Abstract.....	14
Introdução.....	15
Material e Métodos.....	17
Resultados e Discussão.....	19
Conclusão.....	25
Referências.....	26
IV- CONCLUSÕES.....	29
V-APÊNDICE.....	30
Apêndice A.....	31

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1. Seqüências nucleotídicas dos <i>primers</i> , porcentagem de bases pirimidínicas G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os estoques de piapara (<i>Leporinus elongatus</i>).....	20
TABELA 2. Porcentagem de fragmentos polimórficos e índice de Shannon dos estoques de reprodutores e larvas de piapara (<i>Leporinus elongatus</i>), obtidos pelo programa Popgene 1.31.....	21
TABELA 3. Valores de diversidade genética entre os estoques (<i>Gst</i>) e o número de migrantes por geração (<i>Nm</i>) para os estoques de reprodutores e larvas de piapara (<i>Leporinus elongatus</i>) da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C), obtidos pelo programa Popgene 1.31.....	23
TABELA 4. Matriz da distância genética de Nei (1972) entre os estoques de piapara (<i>Leporinus elongatus</i>) da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C), obtidos pelo programa Popgene 1.31.....	24

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1. Dendrograma baseado nos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei (1972), obtidos com marcadores RAPD. Os indivíduos dos estoques de <i>L. elongatus</i> , da Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C), foram agrupados pelo método UPGMA, obtidos pelo programa Popgene 1.31.....	25

LISTA DE APÊNDICE

	Página
FIGURA A. Gel de agarose mostrando o padrão de amplificação do DNA nos estoques de piapara (<i>Leporinus elongatus</i>) com o <i>primer</i> W 19. O primeiro estoque é composto por 28 reprodutores pertencentes à Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International, o segundo, apresenta 29 reprodutores de Rolândia e o terceiro estoque é composta por 27 larvas, fornecidas pelo Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná.....	31

RESUMO

Recentemente a produção aquícola brasileira tem apresentado um grande progresso. Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, a piapara (*Leporinus elongatus*), tem sido amplamente preconizada. Com objetivo de avaliar os programas de repovoamento, foram analisadas a variabilidade e a divergência genética de três estoques de piapara com a técnica de RAPD. O primeiro estoque pertence à Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A); o segundo à piscicultura de Rolândia (B) e o terceiro ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C). Os dez primers para RAPD utilizados produziram 105 fragmentos polimórficos, conferindo um polimorfismo de 98,1% para os três estoques avaliados. A porcentagem de locos polimórficos e índice de Shannon foi superior para o estoque A. Porém, todos valores foram elevados, indicando uma alta diversidade intrapopulacional. Os valores de *Gst*, indicam que houve uma baixa diferenciação genética entre os estoques A x B e uma moderada diferenciação entre os demais. O *Nm* foi maior entre os estoques A x B. A distância genética e o dendrograma indicam que os estoques A x B são menos distantes geneticamente.

ABSTRACT

Recently the Brazilian aquiculture production has presented a great progress. Amongst cultivated native species in Brazil, piapara (*Leporinus elongatus*) has been widely praised. With the objective of to evaluate restock programs, the variability and genetic divergence of three piapara supplies had been analyzed, using RAPD technique. The first supply belongs to the Aquiculture and Hydrology Station of Duke Energy International (A); second to the Rolândia fish culture (B) and third to the Restock Program of Paraná Rivers (C). Ten primers used for RAPD produced 105 polymorphic loci, conferring a polymorphism of 98.1% for the three evaluated supplies. Polymorphism loci percentage and Shannon index were higher for a supply. However, all values were high, indicating high intrapopulation diversity. The G_{st} values indicate a low genetic variation between A x B stocking and a moderate differentiation amongst others. The N_m was higher between A x B supplies. Genetic distance and dendrogram, indicate that A x B supplies are less distant genetically.

I - INTRODUÇÃO

A produção aquícola brasileira passou de 20,5 mil toneladas, em 1990, para 210 mil toneladas, em 2001, com um aumento de 925%, enquanto a aquíicultura mundial teve um crescimento de 187% no mesmo período, o que fez com que o país ocupasse a 19^a. posição na produção de organismos aquáticos (Borghetti *et al.*, 2003). De acordo com o estudo “O estado da aquíicultura mundial em 2006”, realizado pela subcomissão de Aquíicultura da FAO em Nova Déli, na Índia; em 1980, apenas 9% dos peixes consumidos no mundo vinham da aquíicultura. Hoje, o índice é de 43%. Esse percentual equivale a 45,5 milhões de peixes de cativeiro por ano, que totalizam cerca de U\$\$ 63 bilhões. Porém, o Brasil apresenta uma série de condições que poderiam aumentar ainda mais sua produtividade, tais como condições climáticas adequadas, baixo custo da terra, uma grande variedade de espécies com valor econômico adaptáveis aos cultivos, profissionais qualificados e com experiência internacional, mercado consumidor potencial, infraestrutura de apoio e escoamento para exportação, linhas de crédito, ausência de poluição e contaminação acentuada dos ecossistemas aquáticos e também é um grande produtor e exportador de soja e outros grãos que formam a base da maior parte da alimentação dos peixes (Lovshin, 2000).

De acordo com a FAO (2002), um hectare cultivado com peixes produz mais do que com qualquer outro animal. Também é crescente a demanda mundial por alimento de origem aquática devido tanto a expansão populacional como a preferência por alimentos saudáveis (Bailey, 1997; Valenti *et al.*, 2000). Por isso, a aquicultura vem assumindo importância cada vez maior no panorama do abastecimento alimentar mundial.

Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, a piapara é amplamente preconizada para pisciculturas, principalmente nos estados da região Sudeste e Sul, pois em cativeiro apresentam bom ganho em peso e boa conversão alimentar, podendo atingir mais de 1,0 kg de peso no período de um ano (Moreira *et al.*, 2001).

Apesar de ter ~~uma~~ grande importância econômica, houve uma redução na quantidade de indivíduos coletados de piapara nos últimos anos, isso deve ter ocorrido provavelmente devido ~~as~~ alterações em seu habitat. Dessa forma, o *Leporinus elongatus* é uma espécie promissora para o cultivo, desde que seja realizado um manejo adequado, baseado em critérios genéticos (Martins *et al.*, 2003).

O cultivo de espécies nativas na piscicultura apresenta diversas vantagens, tais como, existência de adaptação às condições climáticas regionais, capacidade de ingestão de alimentos em baixa temperatura, resistência a agentes causadores de doenças; maior viabilidade na formação de plantel de reprodutores, hábito de consumo dos peixes na região. Porém, modificações causadas nos ambientes naturais, tais como desmatamento da vegetação ciliar dos rios; despejo de efluentes domésticos e industriais; sobrepesca ao longo do ano (inclusive em maior intensidade na época de piracema); aproveitamentos hidrelétricos gerando descontinuidade dos rios, têm provocado a depleção dos estoques naturais de algumas espécies nativas, sendo necessário o desenvolvimento de métodos de conservação, reprodução e repovoamento (Vinatea, 2004).

O *Leporinus elongatus* pertence à ordem Characiformes, família Anostomidae, é também conhecido popularmente como piapara, piaba, piau (Reis *et al.*, 2003). Os representantes da ordem Characiformes encontram-se distribuídos pelos continentes africano e americano, desde o México até a Patagônia. Esta ordem representa um dos maiores grupos de peixes de água doce do mundo, com 237 gêneros e 1.343 espécies (Nelson, 1994). Estes organismos apresentam uma enorme diversidade de formas, vivendo nos mais variados tipos de ambientes aquáticos, exibindo uma ampla diversidade em sua dieta, desde detritívoros e herbívoros até predadores piscívoros. O *L. elongatus* é herbívoro, preferencialmente frugívoro, e-se escondem-se em troncos e outros substratos existentes no seu habitat (Filho e Ribeiro, 1991).

Nos últimos anos, programas de aquíicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, com vistas não somente a ampliar a produção como também manter a diversidade genética dos estoques (Martins *et al.*, 2002). O conhecimento da diversidade genética dos estoques naturais ou cultivados de peixes é de fundamental importância para o manejo correto destes estoques. Surpreendentemente as informações sobre a diversidade genética dessa espécie são incipientes.

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações, quer cativas, quer selvagens (Kotoulas *et al.*, 1997; McConnell *et al.*, 1997; Birstein *et al.*, 1998; Policansky e Maguson, 1998).

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

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

Esses marcadores permitem a verificação tanto de relações filogenéticas entre espécies quanto de segregação reprodutiva entre populações isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum, também têm contribuído grandemente para a elucidação de questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, sobre sua origem e características peculiares, sobre o sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (Kotoulas *et al.*, 1997; McConnell *et al.*, 1997; Birstein *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 1998; Policansky e Maguson, 1998; Sunnucks, 2000).

Portanto, é evidente a utilidade cada vez maior dos estudos com marcadores moleculares considerando as características biológicas dos peixes, a grande diversidade da ictiofauna neotropical e a importância da pesca em diversas regiões do mundo (Ward e Grewe, 1995; Marques, 2002).

A biologia molecular desenvolveu-se de maneira expressiva, após a descoberta da estrutura do DNA em 1953 por Watson e Crick (Alberts *et al.*, 1997). Até o início dos anos 70, o DNA era uma molécula difícil de ser analisada bioquimicamente. Hoje, graças à evolução das técnicas de manipulação do DNA, ela é uma das moléculas mais fáceis de ser estudada. O desenvolvimento da reação em cadeia da polimerase (PCR, do Inglês,

“Polymerase Chain Reaction”) possibilitou avanços significativos na manipulação do material genético (Martins *et al.*, 2002).

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi concebida por Kary Mullis (Matioli & Passos-Bueno, 2001). A técnica consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP) e de oligonucleotídeos sintéticos, complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. Esses oligonucleotídeos, denominados “iniciadores” ou *primers*, funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3’ da cada *primer*. Cada ciclo de PCR envolve: a desnaturação da molécula de DNA alvo, obtida por elevação da temperatura para 92°C a 95°; anelamento dos *primers* por redução da temperatura até o ponto ideal para a formação das pontes de hidrogênio entre cada par de *primer* e a fita molde; e extensão da síntese da nova fita de DNA (Regitano *et al.*, 2001). Esta extensão envolve a adição de nucleotídeos utilizando como molde a seqüência-alvo, de maneira que uma cópia desta seqüência é feita no processo. Este ciclo é repetido por algumas dezenas de vezes. Uma vez que a quantidade de DNA da seqüência dobra a cada ciclo, a amplificação segue uma progressão geométrica de maneira que, depois de 20 ciclos, é produzido mais de um milhão de vezes a quantidade inicial de seqüência alvo. Esta escala de amplificação permite, portanto, iniciar com quantidades mínimas de DNA (da ordem de alguns picogramas ou nanogramas) e terminar a reação com grandes quantidades de DNA de uma seqüência específica de interesse (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Os produtos da amplificação podem ser visualizados diretamente em gel de agarose ou poliacrilamida (Marques, 2002).

Particularmente, a tecnologia de PCR tem sido amplamente aplicada na identificação de marcadores de DNA úteis na aquicultura e na conservação de estoques naturais de espécies de peixes (Martins *et al.*, 2002). O grande avanço na área de marcadores baseados em PCR ocorreu em 1990, com a idéia de se utilizar *primers* mais curtos e de seqüência arbitrária para dirigir a reação de amplificação, eliminando assim a necessidade do conhecimento prévio de seqüência. Esta técnica foi desenvolvida independentemente por dois grupos nos Estados Unidos. Williams *et al.*, (1990) patentearam a tecnologia com o nome mais comumente utilizado, RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), DNA polimófico amplificado ao acaso.

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

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

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

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

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

Dentre as técnicas moleculares, a de RAPD teêm sido rotineiramente utilizada para caracterização de populações, espécies e linhagens, pois, com base em eventos recentes, permitem a inferência de relações de parentesco entre indivíduos de uma dada população e da história de divergência entre populações de uma mesma espécie (Marques, 2002; Povh *et al.*, 2005). Segundo Moreira *et al.* (2003), a técnica de RAPD é uma ferramenta adequada para o melhoramento genético em peixes.

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

Nos últimos anos, a principal preocupação das pesquisas e trabalhos sobre genética e melhoramento de peixes no Brasil está sendo orientada para a caracterização dos bancos genéticos de populações nativas (Lopes *et al.*, 2002). Segundo Maguelly (1998), a qualidade genética ou valor reprodutivo dos reprodutores não é conhecida, nem controlada. Com isso, a introdução de formas juvenis nos corpos de água naturais, resultante de desova entre indivíduos geneticamente aparentados, provoca uma depleção na qualidade e variabilidade genética das populações selvagens. Dessa forma, introduções resultantes da liberação pela intervenção humana, quer para fins de produção, repovoamento ou em alguns casos de forma acidental, podem acarretar em grandes prejuízos ecológicos. O crescente aumento do cultivo de espécies nativas em confinamento acarreta numa diminuição da pesca extrativista nos rios, o que, em última análise, possibilita auxiliar na recomposição dos estoques naturais destas populações, desde que realizado o manejo adequado.

De acordo com Moreira *et al.* (2001), um dos grandes problemas da piscicultura é a cosangüinidade. Muitas pisciculturas descuidam-se do material genético de seu plantel, que após gerações de cruzamento com indivíduos aparentados (endogamia), ocorre diminuição da variabilidade genética, aumentando a homozigose, em função disto ocorrendo maiores chances de genes deletérios e detrimenais se expressarem. No primeiro caso provoca a morte e no segundo provoca redução no crescimento, na produção

de ovos, na sobrevivência, na viabilidade e na menor tolerância à temperatura e qualidade de água, entre outras. Os autores também relatam que a cosangüidade não intencional ocorre porque os estoques de reprodutores são pequenos e/ou fechados, o que pode destruir rapidamente a variação genética da população e aumentar a cosangüinidade, a qual diminuirá a produtividade e aumentará os custos de produção.

A técnica de RAPD pode ser empregada para o monitoramento genético, obtendo-se informações sobre o fluxo gênico, sobre a estimativa da variabilidade e da divergência genética dentro e entre populações naturais de peixes (Lopes *et al.*, 2002), com intuito de melhorar a produtividade em programas de seleção (Appleyard e Mater, 2000).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os programas de repovoamento de piapara (*Leporinus elongatus*), estimando a variabilidade e a divergência genética de três estoques, pertencentes à Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (*Geração Paranapanema*), Piscicultura de Rolândia e ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná.

II - REFERÊNCIAS

- ALBERTS, B. *et al.* *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 1294p.
- APPLEYARD, S.A.; MATHER, P.B. Investigation to the mode of inheritance of alloenzyme and Random Amplified Polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research*, Oxford, v.31, p. 435-445, 2000.
- BAILEY, C. Aquaculture and basic human needs. *World Aquaculture*, Amsterdam, v. 28, p. 28-31, 1997.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Oxford, v.73, p. 117-123, 1994.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v.219, p. 157-167, 2003.
- BIRSTEIN, V.J. *et al.* Molecular identification of *Acipenser sturio* specimens: A warning note for recovery plants. *Biol. Conserv.*, v.84, p. 97-101, 1998.
- BORGHETTI, N.R.B. *et al.* *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128p.

- CALLEJAS, C.; OCHANDO, M.D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. *Journal of Fish Biology*, London, v.53. p. 208-215, 1998.
- DINESH, K.R. *et al.* RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprint in fishes. *Zoological Science*, Tokyo, v.10, n.5, p. 849-954, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220p.
- FAO. *The state of World's Fisheries and Aquaculture: 2000*. Rome. Italy: FAO Information Division; 2002.
- FAO. *O estado da aqüicultura mundial em 2006*. Nova Déli. Índia: FAO Information Division; 2006.
- FILHO, T.; RIBEIRO, A. *Piscicultura ao alcance de todos*. São Paulo: Nobel, 1991.
- KOTOULAS, G. *et al.* Population genetics and fisheries management: the case of the swordfish, *Xiphias gladius*. In: 5TH HELLENIC SYMPOSIUM ON OCEANOGRAPHY AND FISHERIES. Kavala, Greece, 1997. p. 75-78.
- LOPES, R. *et al.* Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Revista Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento*, ano 5, n. 29, Nov/Dez, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>>Aceso em: 5 jan. 2006.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. Tilapia aquaculture in the Americas. Louisiana. *The World Aquaculture Society*, v.2, p. 133-140, 2000.
- LYNCH, M; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, Oxford, v.3, p. 91-99, 1994.
- MAGHELLY, O.R. *Limitações e perspectivas do melhoramento genético de peixes de água doce no Estado de Santa Catarina*. 1998. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 1998.
- MARQUES, D.K.S. *Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros*. Corumbá: EMBRAPA – Pantanal. Documentos 36, 2002, 22p.

- MARTINS, C. *et al.* Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. *Biotechnologia. Ciência & Desenvolvimento*, n.28 – setembro/outubro 2002.
- MARTINS, C. *et al.* Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, n.26, 2003.
- MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R. dos S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: MATIOLI, S.R. *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p. 153-161.
- McCONNELL, S.K.J. *et al.* Molecular loci reveal highly significant genetic differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks from the east coast of Canada. *Molecular Ecology*, v.6, p.1075-1089, 1997.
- MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach. 1998. p. 17-28.
- MOREIRA, H.L.M. *et al.* The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: *World Aquaculture Society*. Salvador: INVE, 2003. v.2, p. 460.
- MOREIRA, H.L.M. *et al.* *Fundamentos da moderna aquíicultura*. Canoas: ULBRA, 2001.
- NELSON, J.S. *Fishes of the world*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1994, p.600.
- OLIVEIRA, A.V. *et al.* Diversity and genetic distance in populations of *Steidachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetic (in press)*.
- PÉREZ, T. *et al.* A Evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, Oxford. v.7, p. 1347-1357, 1998.
- PARKER, P.G. *et al.* What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, Durham, v.79, n.2, p. 361-382, 1998.
- POLICANSKY, D.; MAGUSON, J.J. Genetics, metapopulations, and ecosystem management of fisheries. *Ecol. Appl.* 8(1), p. 119-123, 1998.

- POVH, J. A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.
- REGINATO, L.C.A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. Brasília: EMBRAPA, 2001. p. 25-39.
- REIS, R.E. *et al.* Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, 2003. p. 742.
- SAIKI, R.K. *et al.* Primerdirected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491, 1988.
- SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, London, v.15, p. 199-203, 2000.
- TAKAGI, M.; TANIGUSHI, N. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. *Fisheries Science*, v. 61, n. 5, p. 884-885, 1995.
- VALENTI, W.C. *et al.* *Aqüicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável*. Brasília: CNPq, 2000. 399p.
- VINATEA A. L. *Fundamentos de aqüicultura*. Florianópolis: Ed. USFC, 2004. 348p.
- WARD, R.D.; GREWE, P.M. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. *Molecular genetics in fisheries*. London: Chapman & Hall, 1995. p. 29-54.
- WILLIAMS, J.G. *et al.* DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* v. 18, p. 6531-6535, 1990.

III – DIVERSIDADE GENÉTICA DE TRÊS ESTOQUES DE PIAPARA (*Leporinus elongatus*), UTILIZANDO RAPD

RESUMO. Recentemente a produção aquícola brasileira tem apresentado um grande progresso. Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, a piapara (*Leporinus elongatus*), tem sido amplamente preconizada. Com objetivo de avaliar os programas de repovoamento, foram analisadas a variabilidade e a divergência genética de três estoques de piapara com a técnica de RAPD. O primeiro estoque pertence à Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A); o segundo à piscicultura de Rolândia (B) e o terceiro ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C). Os dez primers para RAPD utilizados produziram 105 fragmentos polimórficos, conferindo um polimorfismo de 98,1% para os três estoques avaliados. A porcentagem de locos polimórficos e índice de Shannon foi superior para o estoque A. Porém, todos valores foram elevados, indicando uma alta diversidade intrapopulacional. Os valores de *Gst*, indicam que houve uma baixa diferenciação genética entre os estoques A x B e uma moderada diferenciação entre os demais. O *Nm* foi maior entre os estoques A x B. A distância genética e o dendrograma indicam que os estoques A x B são menos distantes geneticamente.

Palavras-chave: Divergência genética, locos polimórficos, peixe, RAPD, reprodutores, variabilidade genética.

ABSTRACT. Recently the Brazilian aquiculture production has presented a great progress. Amongst cultivated native species in Brazil, piapara (*Leporinus elongatus*) has been widely praised. With the objective of to evaluate restock programs, the variability and genetic divergence of three piapara supplies had been analyzed, using RAPD technique. The first supply belongs to the Aquiculture and Hydrology Station of Duke Energy International (A); second to the Rolândia fish culture (B) and third to the Restock Program of Paraná Rivers (C). Ten primers used for RAPD produced 105 polymorphic loci, conferring a polymorphism of 98.1% for the three evaluated supplies. Polymorphism loci percentage and Shannon index were higher for a supply. However, all values were high, indicating high intrapopulation diversity. The *Gst* values indicate a low genetic variation between A x B stocking and a moderate differentiation amongst others. The *Nm* was higher between A x B supplies. Genetic distance and dendrogram, indicate that A x B supplies are less distant genetically.

Key words: Genetic divergence, polymorphic loci, fish, RAPD, reproducers, genetic variability.

INTRODUÇÃO

A produção aquícola brasileira passou de 20,5 mil toneladas, em 1990, para 210 mil toneladas, em 2001, com um aumento de 925%, enquanto a aquicultura mundial teve um crescimento de 187% no mesmo período, o que fez com que o país ocupasse a 19^a posição na produção de organismos aquáticos (Borghetti *et al.*, 2003). De acordo com o estudo “O estado da aquicultura mundial em 2006”, realizado pela subcomissão de Aquicultura da FAO em Nova Déli, na Índia; em 1980, apenas 9% dos peixes consumidos no mundo vinham da aquicultura. Hoje, o índice é de 43%. Esse percentual equivale a 45,5 milhões de peixes de cativeiro por ano, que totalizam cerca de U\$\$ 63 bilhões. Porém, o Brasil apresenta uma série de condições que poderiam aumentar ainda mais sua produtividade, tais como clima adequado, baixo custo da terra, uma variedade de espécies com valor econômico adaptáveis aos cultivos, profissionais qualificados e com experiência internacional, mercado consumidor potencial, infra-estrutura de apoio e escoamento para exportação, linhas de crédito, ausência de poluição e contaminação acentuada dos ecossistemas aquáticos e também é um grande produtor e exportador de soja e outros grãos que formam a base da maior parte da alimentação dos peixes (Lovshin, 2000).

Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, a piapara (*Leporinus elongatus*), é amplamente preconizada para piscicultura, principalmente nos estados da região Sudeste e Sul, pois em cativeiro apresentam bom ganho em peso e boa conversão alimentar, podendo atingir mais de 1,0 kg de peso no período de um ano (Moreira *et al.*, 2001).

Apesar de ter uma grande importância econômica, houve uma redução na quantidade de indivíduos coletados de piapara nos últimos anos, isso deve ter ocorrido provavelmente devido as alterações em seu habitat. Dessa forma, o *L. elongatus* é uma espécie promissora para o cultivo, desde que seja realizado um manejo adequado baseado em critérios genéticos (Martins *et al.*, 2003).

A espécie *Leporinus elongatus* pertence à ordem Characiformes, família Anostomidae, é também conhecida popularmente como piapara, piaba, piau (Reis *et al.*, 2003). Os representantes da ordem Characiformes encontram-se distribuídos pelos continentes africano e americano, desde o México até a Patagônia. Esta ordem representa um dos maiores grupos de peixes de água doce do mundo com 237 gêneros e 1.343 espécies (Nelson, 1994). Estes

organismos apresentam uma enorme diversidade de formas, vivendo nos mais variados tipos de ambientes aquáticos, exibindo uma ampla diversidade de ítems em sua dieta, desde detritívoros e herbívoros até predadores piscívoros. O *L. elongatus* é herbívoro, preferencialmente frugívoro, e esconde-se em troncos e outros substratos existentes no seu habitat (Filho e Ribeiro, 1991).

O conhecimento da diversidade genética dos estoques naturais ou cultivados de peixes é de fundamental importância para o manejo correto destes estoques. Surpreendentemente as informações sobre a diversidade genética dessa espécie são incipientes. Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações, quer cativas, quer selvagens. Esses marcadores permitem a verificação tanto de relações filogenéticas entre espécies quanto de segregação reprodutiva entre populações isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (Kotoulas *et al.*, 1997; McConnell *et al.*, 1997; Birstein *et al.*, 1998; Policansky e Maguson, 1998).

Desta forma, a determinação da variabilidade e da divergência genética é de grande importância para o progresso do melhoramento genético. A técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic*) tem sido utilizada com muito sucesso para a estimativa do valor de diversidade genética em populações, espécies e linhagens de peixes (Povh *et al.*, 2005). A ampla utilização da técnica RAPD deve-se principalmente a sua rapidez, relativa acessibilidade, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico para extração de DNA e a não necessidade do conhecimento prévio do genoma (Bártfai *et al.*, 2003). A técnica RAPD é a de menor custo, pequeno número de etapas, pouco tempo para obter os resultados e facilidade de implementação (Milach, 1998). Segundo Moreira *et al.* (2003), a técnica de RAPD é uma ferramenta adequada para o melhoramento genético em peixes.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os programas de repovoamento de piapara (*Leporinus elongatus*), estimando a variabilidade e a divergência genética de três estoques, pertencentes à Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (*Geração Paranapanema*), Piscicultura de Rolândia e ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO

Para avaliar a variabilidade e a divergência genética foram utilizadas três populações estocadas de piapara (*Leporinus elongatus*), pertencentes à Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (*Geração Paranapanema*) (A) localizada no município de Salto Grande (SP), a segunda pertencente à piscicultura de Rolândia, PR (B) e a terceira pertencente ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C).

Foram utilizadas 57 amostras de reprodutores, sendo 28 indivíduos pertencentes a Duke Energy, 29 indivíduos à piscicultura de Rolândia e 27 amostras de larvas fornecidas pelo Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná.

Estes estoques de piapara são destinados à produção de alevinos para o programa de repovoamento dos Rios do Paraná, financiado pelo Governo do Estado do Paraná.

EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA

Para a extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Bardakci e Skibinski (1994), modificada por Povh *et al.* (2005). Os fragmentos de nadadeira caudal de aproximadamente 0,5 cm², preservados a -20°C com etanol 70%, foram colocados em microtubos com tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 200 µg/ml de proteinase K, e em seguida incubados em banho-maria a 50°C “overnight”. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-Tris pH 8,0 e três de clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de volume de etanol absoluto e um décimo de volume de acetato de sódio em relação ao volume recuperado, e foi incubado por duas horas a -20°C. Em seguida, o DNA foi centrifugado, lavado com 2 ml de etanol 70%, e ressuspendido em 60 µl de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA) e tratado com 30 µg/ml de RNase. O DNA permaneceu por 40 minutos em banho-maria a 37°C, sendo, em seguida, conservado a -20°C.

A estimativa da quantidade de DNA presente em cada amostra foi feita pela comparação com DNA do fago λ, de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE (40 mM tris-base; 10 mM ácido bórico; 2M EDTA pH8,0) e a imagem

capturada por um sistema da EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5). Com base nestas estimativas, as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng/μl.

AMPLIFICAÇÃO

As condições de amplificações foram baseadas nas descritas por Williams *et al.* (1990), com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15 μl, no qual se utilizou tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 mM de MgCl₂, 0,46 mM de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTPs, uma unidade de Taq DNA Polimerase, e 10 ng de DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas num termociclador “Eppendorf Mastercycler[®] Gradient”, programado para 40 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 96°C, por cinco minutos e um passo final de extensão a 72°C, por sete minutos. Cada ciclo consistiu de um minuto a 94°C, um minuto e trinta segundos a 36°C e dois minutos a 72°C.

Foram avaliados 60 *primers* do Kit Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, EUA). Para avaliar os diferentes estoques foram selecionados 10, que apresentaram bom padrão de amplificação.

Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,7%. Foram utilizados 15 μl do produto amplificado e 2 μl de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em 60 volts por quatro horas em um cuba horizontal usando tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). Foi utilizado um controle negativo (N) para cada reação, onde sua amplificação foi executada adicionando-se todos os componentes, citados anteriormente, exceto o DNA alvo.

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

ANÁLISE DOS DADOS

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão DNA Ladder de 100 pb (15 bandas com tamanho entre 100 e 2072 pb).

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

A variabilidade genética para cada estoque foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos e pelo índice de diversidade de Shannon, e a variabilidade genética entre os estoques foi determinada pela diversidade genética de Nei (1987) (*Gst*) e pelo número de migrantes por geração (*Nm*). Para estas análises foi utilizado o programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

A divergência genética entre os estoques foi analisada através da distância genética de Nei (1972). A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, foi construído um dendrograma da distância genética, baseado em Nei (1972), pelo algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*). Utilizou-se para essas análises o programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

QUALIDADE DO DNA

Pela análise em gel de agarose, observou-se que não ocorreu degradação do DNA em nenhuma das amostras e que também não houve excesso de proteína que pudesse prejudicar a amplificação. Desta forma, a extração de DNA de fragmentos de nadadeira utilizada neste trabalho mostrou-se eficiente. Segundo Wasko *et al.* (2003) a extração de DNA de fragmentos de nadadeira apresenta bons resultados, sendo mais simples que a extração de DNA do músculo ou do sangue.

LOCOS POLIMÓRFICOS

Dos sessenta *primers* do kit Operon (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) avaliados, foram selecionados os 10 melhores, com base no número e na nitidez dos fragmentos produzidos.

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

Tabela 1. Seqüências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de bases pirimidínicas G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os estoques de *piapara* (*Leporinus elongatus*).

Table 1. Primers Nucleotidic sequences, G + C pyrimidic base percentage, number of loci, number of polymorphic loci and size of amplified fragment in piapara (Leporinus elongatus) supplies.

<i>Primers</i>	Seqüência de nucleotídeos (3' → 5')	% (G+C)	Nº de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos	Tamanho dos fragmentos (pb)
A-16	AGC CAG CGA A	60	15	15	200-2072
X-01	CTG GGC ACG A	70	11	11	480-1700
X-03	TGG CGC AGT G	70	9	9	500-2072
X-11	GGA GCC TCA G	70	12	11	400-2072
W-01	CTC AGT GTC C	60	9	9	400-2200
W-02	ACC CCG CCA A	70	11	11	300-2072
W-03	GTC CGG AGT G	70	10	10	400-2500
W-04	CAG AAG CGG A	60	8	8	400-2172
W-08	GAC TGC CTC T	60	9	9	350-1500
W19	CAA AGC GCT C	60	13	12	200-2100
Total	-	-	107	105	200-2500

Todos os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD para as três populações. O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis geradas por *primer* nos três estoques variaram de oito a 15 e o tamanho desses produtos amplificados permaneceram entre 200-2500 pb. Não foram encontrados fragmentos exclusivos para as três populações avaliadas. Dos 107 locos analisados para os 10 *primers* randômicos, 105 foram polimórficos (98,1%) e dois monomórficos (1,9%).

Valores semelhantes quanto ao número de *primers* utilizados e polimorfismo genético foram encontrados por Prioli *et al.* (2002), que com 10 *primers*, obtiveram 87 locos, com um total de 90,0% de polimorfismo para o gênero *Astyanax*. Oliveira (2001), trabalhando com populações de gênero *Steindachnerina* identificou valores semelhantes de número de *primers* e número e tamanho de fragmentos, onde, com nove *primers* obteve um número de fragmentos que variou de oito a 16 e o tamanho dos produtos amplificados permaneceu entre 330-2400 pb; destes 76 fragmentos foram polimórficos. Dados superiores foram encontrados por Almeida *et al.* (2003), que analisando populações de *Pimelodus maculatus* obtiveram um total de 210 locos utilizando 15 *primers*, variando de seis a 19 locos. Valores inferiores de polimorfismo foram encontrados por Lopera-Barrero (2005), que trabalhando com estoques de piracanjuba (*Brycon orbignianus*), encontrou um total de 87 fragmentos dos quais 61 locos eram polimórficos (70,11%); por Povh *et al.* (2005) que tabalhando com linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) obtiveram 90 locos com nove *primers*, dos quais 50% dos

locos eram polimórficos e por Foresti (2001) que trabalhando com estoques de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) obteve 78,94% e 45,45% de porcentagem de locos polimórficos para estas espécies respectivamente.

VARIABILIDADE GENÉTICA

A porcentagem de fragmentos polimórficos e os valores do índice de Shannon dos estoques de reprodutores da Duke Energy (A), da piscicultura de Rolândia (B) e de larvas fornecidas pelo Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C) estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Porcentagem de fragmentos polimórficos e índice de Shannon dos estoques de reprodutores e larvas de piapara (*Leporinus elongatus*), obtidos pelo programa Popgene 1.31.

Table 2. Polymorphic loci percentage and Shannon index of reproducers and larvae supplies of piapara (*Leporinus elongatus*), gotten by Popgene 1.31 program.

Populações	% de Fragmentos Polimórficos	Índice de Shannon
A	88,8%	0,4470
B	85,1%	0,4394
C	81,3%	0,4086

A porcentagem de fragmentos polimórficos foi superior para o estoque A (88,8%) quando comparados ao estoque B (85,1%) e C (81,3%). Porém, todos valores foram elevados, indicando uma alta variabilidade.

Segundo Pineda (2004), os peixes cultivados em ambientes controlados podem estar expostos a uma diminuição da sua variabilidade genética, devido ao cruzamento de indivíduos geneticamente aparentados e as práticas de manejo inadequadas, ocasionando homogeneização do componente genético dos descendentes. Os resultados do presente trabalho mostram que a variabilidade genética obtida pela porcentagem de fragmentos polimórficos foi alta, denotando que as condições de manejos realizados para as duas populações estoques e para a de larva têm garantido a manutenção da variabilidade genética.

Chiari e Sodré (2001), também estudaram espécies da família Anostomidae e encontraram valores inferiores de variabilidade genética pela porcentagem de fragmentos polimórficos (29,3% a 58,7%). Oliveira (2004), analisando relações genéticas entre

populações do gênero *Cicla* introduzidas na bacia do rio Paraná, encontrou baixos valores percentuais de fragmentos polimórficos dentro de populações, com valores entre 0% e 42,2%, evidenciando baixa variabilidade genética intrapopulacional. A proporção de fragmentos polimórficos encontrada por Almeida *et al.* (2003) também foram inferiores ao encontrado (60,2%, 51,9% e 52,4%) para *Pimelodus maculatus* no baixo, médio e alto rio Tietê, respectivamente.

Os valores encontrados de índice de Shannon foram superiores para o estoque A (0,4470), enquanto que para os estoques B e C os valores foram 0,4394 e 0,4086 respectivamente. Estes valores indicam, do mesmo modo que a porcentagem de locos polimórficos, que a variabilidade genética dos três estoques foi elevada. Pode-se afirmar também que ocorreu uma alta diversidade genética intrapopulacional.

Prioli (2001), encontrou valores superiores de índice de Shannon estudando espécies naturais do gênero *Astyanax*, onde a estimativa da diversidade genética foi de 0,5114 para amostras da população da bacia do rio Paraná e de 0,5257 para a população amostrada no rio Iguazu. Segundo o autor, as populações também indicavam níveis semelhantes nas duas bacias hidroráficas. Panarari (2003), estudando populações naturais de corvina (*Plagioscion squamosissimus*), encontrou menores valores de índice de Shannon com valores de 0,0269 para a população de Porto Rico, 0,0481 para a do reservatório de Itaipu e 0,0792 para a de Tocantins.

Já, Lopera-Barrero (2005), trabalhando com populações cultivadas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), também encontrou valores de índice de Shannon semelhantes para as populações de Castilho (0,3184) em relação aos indivíduos da sua progênie (0,3433) e para a população de Porto Ferreira, indicando que a variabilidade genética das populações é muito semelhante e é mantida na progênie. Povh *et al.* (2005), também estudando populações estocadas, encontraram menores valores de índice de Shannon em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com valores de 0,1040 para a linhagem Bouaké da geração de reprodutores de 1997, 0,068 para a Bouaké de 2002, 0,198 para a Chitralada de 1997 e 0,2140 para a Chitralada de 2002.

Os valores de diversidade genética entre os estoques (Gst) e o número de migrantes por geração (Nm) são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Valores de diversidade genética entre os estoques (Gst) e o número de migrantes por geração (Nm) para os estoques de reprodutores e larvas de piapara (*Leporinus elongatus*) da Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C), obtidos pelo programa Popgene 1.31.

*Table 3. Values of genetic diversity between supplies (Gst) and migrates number per generation (Nm) for reproducers and larvae supplies of piapara (*Leporinus elongatus*) from Aquiculture and Hydrology Station of Duke Energy International (A), Rolândia fish culture (B) and Restock Program of Paraná Rivers (C), gotten by Popgene 1.31 program.*

Populações	Gst		Nm
	Teta	χ^2	
A x B	0,0234	2,6676	20,8801
A x C	0,1224	13,464	3,5834
B x C	0,1199	13,4288	3,6706

A diversidade genética entre populações (Gst), parâmetro que mede o grau de diferenciação entre populações, foi mais elevado entre os estoques A x C (0,1224), enquanto que entre os estoques A x B e B x C os valores encontrados foram 0,0234 e 0,1199 respectivamente. Segundo Wright (1978), valores de Teta, que correspondente ao Gst , de 0,00 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética, valores de 0,05 a 0,15 indicam média diferenciação genética, e valores de 0,15 a 0,25 indicam alta diferenciação genética, portanto, os valores obtidos indicam que houve uma baixa diferenciação genética entre os estoques A x B e uma média diferenciação entre os estoques A x C e B x C. Pelo teste de χ^2 , o Gst foi significativo entre os estoques A x C e B x C e não significativo entre A x B. Tal resultado reflete uma pequena heterogeneidade entre os estoques estudados.

Galdino *et al.* (2000) também encontraram moderada diferenciação genética entre populações nativas de *Pseudoplatystoma corruscas* (valores variando de 0,030 a 0,112), *Leporinus elongatus* (0,1492) e *Hemisorubim platyrhynchos* (0,08), situadas no alto rio Paraná e reservatório de Itaipu. Segundo os autores, embora em níveis baixos, foi detectada diferenciação genética entre as populações de *P. corruscas* e *L. elongatus*, não sendo detectado entre as populações de *H. platyrhynchos*. Sekine *et al.* (2002) também trabalhando com populações nativas de *P. corruscas* do alto rio Paraná e reservatório de Itaipu, encontraram valores de diferenciação genética moderada, sendo 0,090 a 0,112 respectivamente.

O número de migrantes por geração foi maior entre os estoques A x B (20,8801), enquanto que entre os estoques A x C (3,5834) e B x C (3,6706) o fluxo gênico foi inferior. De acordo com o elevado fluxo gênico encontrado no presente trabalho, sugere-se que os estoques A x B tiveram uma origem comum, o que justificaria a baixa diferenciação genética e o elevado fluxo gênico entre os estoques A x B e o moderado nível de diferenciação genética encontrado entre A x C e B x C.

Semelhantemente, Sekine *et al.* (2002), constataram que o fluxo de genes foi um fator ativo contra a diferenciação genética entre populações de *P. corruscans* do alto Paraná, reservatório de Itaipu e da jusante de Yacyretá (2,0 a 8,1 migrantes por geração).

DIVERGÊNCIA GENÉTICA

Os dados de distância genética de Nei (1972), calculados para os três estoques de piarara (*Leporinus elongatus*) estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Matriz da distância genética de Nei (1972) entre os estoques de piarara (*Leporinus elongatus*) da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da DUKE ENERGY INTERNATIONAL (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C), obtidos pelo programa Popgene 1.31.

Table 4. Matrix of Nei distance genetic (1972) between piarara (*Leporinus elongatus*) supplies of Aquiculture and Hydrology Station of DUKE ENERGY INTERNATIONAL (A), Rolândia fish culture (B) and Restock Program of Paraná rivers (c), gotten by Popgene 1.31 program.

Populações	A	B	C
A	-		
B	0,0202	-	
C	0,1174	0,1137	-

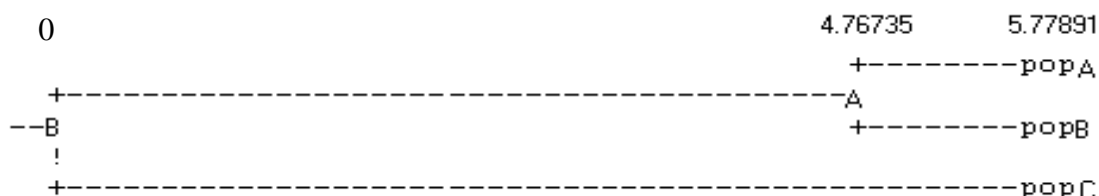
A distância de Nei leva em conta tanto os fragmentos polimórficos como os monomórficos e é apropriada para casos de processos evolutivos longos, onde a divergência entre as populações ocorreu por deriva genética ou mutação (Weir, 1990), sendo que seu valor é proporcional ao tempo de divergência por locus e por geração (Dias, 1998).

Os valores de distância genética de Nei encontrados indicam que os estoques A x B são menos distantes geneticamente (0,0202), enquanto que para os estoques A x C e B x C as distâncias foram maiores, cujos valores foram 0,1174 e 0,1137 respectivamente. Tais dados

são evidenciados através do dendrograma da distância genética, baseado em Nei (1972), mostrado na Figura 1.

Figura 1. Dendrograma baseado nos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei (1972), obtidos com marcadores RAPD. Os indivíduos dos estoques de *L. elongatus*, da Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C), foram agrupados pelo método UPGMA, obtidos pelo programa Popgene 1.31.

Figure 1. Dendrogram based on the arithmetical complements of Nei similarity coefficients (1972), gotten with RAPD markers. Individuals from *L. elongates* supplies, of Aquiculture and Hydrology Station of Duke Energy International (A), Rolândia fish culture(B) and Restock Program of Paraná rivers (C), had been grouped by UPGMA method, gotten by Popgene 1.31 program.



Galdino *et al.* (2000), também estudaram a espécie *Leporinus elongatus* e encontraram 0,0648 como valor de distância genética entre as populações à montante e jusante do rio Paraná, indicando que os saltos de Sete Quedas era uma barreira que promovia, ao menos parcialmente, o isolamento reprodutivo entre essas populações. Pioli *et al.* (2005), estudando três populações do gênero *Steindachnerina* (com mácula, sem mácula e mácula com coloração intermediária) da planície de inundação do alto rio Paraná, encontraram grande distância genética entre as populações com mácula e sem mácula e baixa distância entre as populações com mácula e intermediária.

Conclusões

A técnica de RAPD pode ser empregada para o monitoramento genético, obtendo-se informações sobre a estimativa da variabilidade e da divergência genética dentro e entre estoques de peixe, com intuito de melhorar a produtividade em programas de seleção e repovoamento.

Até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados com *Leporinus elongatus* com objetivo de avaliar a diversidade genética, portanto, o conhecimento da variabilidade e divergência genética dos estoques naturais ou cultivados desta espécie poderá contribuir para

o desenvolvimento de um manejo adequado, garantindo o monitoramento para que não ocorra redução de variabilidade genética nos programas de cultivo.

A variabilidade genética estimada pela técnica de RAPD nos estoques de piapara (*L. elongatus*), coletados na Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International, do estoque fornecido pela piscicultura de Rolândia e fornecido pelo Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná foi alta nos três estoques e ocorreu uma grande divergência genética entre os estoques, indicando que a ausência de seleção e o controle da seleção não intencional foram eficientes para preservar a diversidade genética dos reprodutores.

Referências

- ALMEIDA, F.S. *et al.* Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.
- APPLEYARD, S.A.; MATHER, P.B. Investigation to the mode of inheritance of alloenzyme and Random Amplified Polymorphic DNA markers in tilapia *Oreochromis mossambicus* (Peters). *Aquaculture Research*, Oxford, v.31, p. 435-445, 2000.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Edinburg, v. 75, p. 117-123, 1994.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v.219, p. 157-167, 2003.
- BIRSTEIN, V.J.; BETTS, J. DeSALLE, R. Molecular identification of *Acipenser sturio* specimens: A warning note for recovery plants. *Biol. Conserv.*, v.84, p. 97-101, 1998.
- BORGHETTI, N.R.B. *et al.* *Aqüicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo*. Curitiba: Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais, 2003. 128p.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Scientiarum*, Maringá, v.23, n.2, p. 445-451, 2001.
- DIAS, L.A.S. 1998. Análises multidimensionais. In: Eletroforese de isoenzimas e proteínas afins: Fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. *Edited by A.C. Alfenas*. Editora UFV, Viçosa MG.
- FAO. *O estado da aqüicultura mundial em 2006*. Nova Déli. Índia: FAO Information Division; 2006.
- FILHO, T.; RIBEIRO, A. *Piscicultura ao alcance de todos*. São Paulo: Nobel, 1991.
- FORESTI, F. *et al.* Análise genética de estoques de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da Estação de Piscicultura de Promissão, utilizando marcadores de RAPD. In: 1o. CONGRESSO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM ENERGIA ELÉTRICA - 1o. CITENEO, 2001, Brasília, DF. 1o. Congresso de Inovação Tecnológica em Energia Elétrica - 1o. CITENEO, 2001.

GALDINO, J.C. et al. Distancia genética entre populações de *Leporinus elongatus* (Characiformes), *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes), *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes) isoladas por Sete Quedas. Disponível em: http://www.peld.uem.br/relat2002/pdf/comp_biotico_distncia.pdf. Acesso em 10 jan. 2006.

KOTOULAS, G. et al. Population genetics and fisheries management: the case of the swordfish, *Xiphias gladius*. In: 5TH HELLENIC SYMPOSIUM ON OCEANOGRAPHY AND FISHERIES. Kavala, Greece, 1997. p. 75-78.

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

LOPES, R. et al. Marcadores moleculares dominantes (RAPD e AFLP). *Revista Biotecnologia: Ciência e desenvolvimento*, ano 5, n. 29, Nov/Dez, 2002. Disponível em: <<http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio29/marcadores.pdf>>Aceso em: 5 jan. 2006.

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

MARTINS, C. et al. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. *Biotecnologia. Ciência & Desenvolvimento*, n.28 – setembro/outubro 2002.

MARTINS, C. et al. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, n.26, 2003.

McCONNELL, S.K.J. et al. Molecular loci reveal highly significant genetic differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks from the east coast of Canada. *Molecular Ecology*, v.6, p. 1075-1089, 1997.

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

MOREIRA, H.L.M. et al. *Fundamentos da moderna aqüicultura*. Canoas: ULBRA, 2001. p. 135-147.

MOREIRA, H.L.M. et al. The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. IN: WORLD AQUACULTURE, 2003b, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, v.2, 2003. p. 460.

NELSON, J.S. *Fishes of the world*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1994, p.600.

OLIVEIRA, A.V. *Diversidade e distância genética em populações do gênero steindachnerina fowler da planície de inundação do alto rio Paraná*. 2001. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

OLIVEIRA, A.V. *Relações genéticas entre populações do gênero Cichla Schneider, 1801 (Perciformes: Cichlidae) introduzidas na bacia do rio Paraná, evidenciadas por marcadores nucleares e do genoma mitocondrial*. 2004. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.

PANARARI, R.S. *Variabilidade e estrutura genética de populações de Plagioscion squamosissimus (Perciformes, Sciaenidae) da bacia do rio Paraná*. 2003. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais) -Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.

PINEDA, H. estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec*, Medellín, v. 17, p. 62-63, suplemento 2004.

POLICASKY, D. e MAGUSON, J.J. Genetics, metapopulations, and ecosystem management of fisheries. *Ecol. Appl.* v. 8, n.1, p. 119-123, 1998.

POVH, J. A.; MOREIRA, H.L.M.; RIBEIRO, R.P. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.

PRIOLI, S.M.A.P. *Relações genéticas e filogenéticas entre espécies do gênero Astyanax do rio Iguazu, analisada por marcadores de DNA mitocondrial e RAPD.* 2001. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

PRIOLI, S.M.A. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-432, 2002.

REIS, R.E. *et al.* Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Edipucrs, 2003. p. 742.

SEKINE, E.S. *et al.* Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guáira Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum*, v. 24, n. 2, p. 507-512, 2002.

WASKO, A.P. *et al.* Non-destructive genetic sampling in fish. An improved method for DNA extraction from fish fins and scales. *Heredity*, Lund, v. 138, p. 161-165, 2003.

WEIR, B.S., 1990. Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, Oxford, v.18, n.22, p. 6531-6535, 1990.

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

YEH, F.C. *et al.* Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

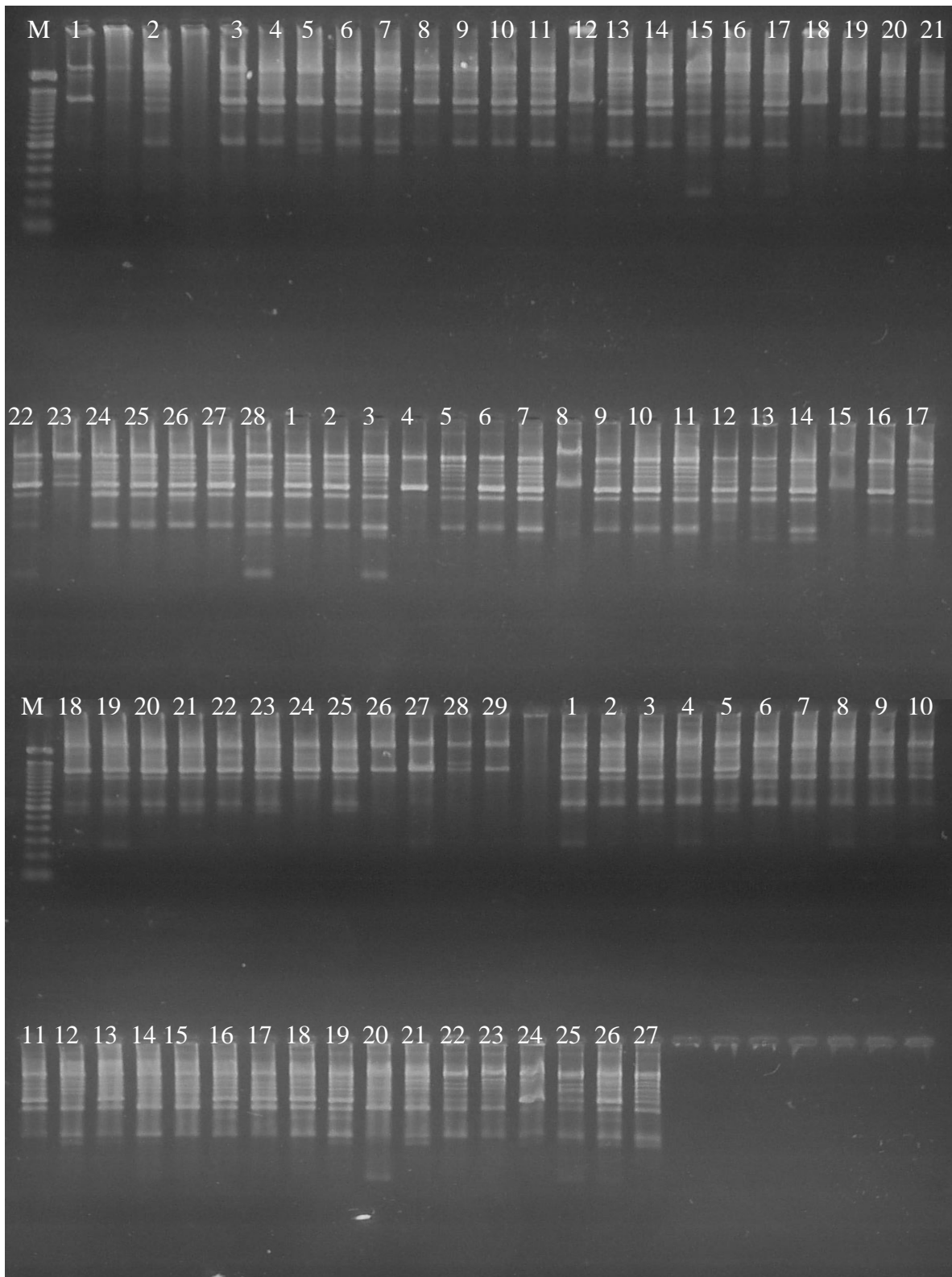
IV- CONCLUSÕES

A técnica de RAPD pode ser empregada para o monitoramento genético, obtendo-se informações sobre a estimativa da variabilidade e da divergência genética dentro e entre estoques de peixe, com intuito de melhorar a produtividade em programas de seleção e repovoamento.

Até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados com *Leporinus elongatus* com objetivo de avaliar a diversidade genética, portanto, o conhecimento da variabilidade e divergência genética dos estoques naturais ou cultivados desta espécie poderá contribuir para o desenvolvimento de um manejo adequado, garantindo o monitoramento para que não ocorra redução de variabilidade genética nos programas de cultivo.

A variabilidade genética estimada pela técnica de RAPD nos estoques de piapara (*L. elongatus*), coletados na Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International, do estoque fornecido pela piscicultura de Rolândia e fornecido pelo Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná foi alta nos três estoques e ocorreu uma grande divergência genética entre os estoques, indicando que a ausência de seleção e o controle da seleção não intencional foram eficientes para preservar a diversidade genética dos reprodutores.

V- APÊNDICE



Apêndice A. Gel de agarose mostrando o padrão de amplificação do DNA nos estoques de piapara (*Leporinus elongatus*) com o *primer* W 19. O primeiro estoque é composto por 28 reprodutores pertencentes à Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International, o segundo, apresenta 29 reprodutores de Rolândia e o terceiro estoque é composta por 27 larvas, fornecidas pelo Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná. (M) Marcador Ladder de 100 pb (Invitrogen).