

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO**

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1816) COM  
USO DE MARCADORES ISSR**

**Claudivane de Sá Teles Oliveira**

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2018**

## FICHA CATALOGRÁFICA

O48v	<p>Oliveira, Claudivane de Sá Teles. Variabilidade genética em populações de tambaqui (<i>Colossoma macropomum</i>, Cuvier, 1816) com uso de marcadores issr / Claudivane de Sá Teles Oliveira. – Cruz das Almas, BA, 2018. 71f.; il.</p> <p>Orientadora: Norma Suely Evangelista-Barreto. Coorientadora: Soraia Barreto Aguiar Fonteles.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas.</p> <p>1.Tambaqui (peixe) – Criação – Manejo. 2.Tambaqui (peixe) – Variabilidade genética. 3.Genética de populações – Melhoramento genético. I.Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. II.Título.</p> <p>CDD: 639.3</p>
------	---

Ficha elaborada pela Biblioteca Universitária de Cruz das Almas - UFRB.  
Responsável pela Elaboração – Antonio Marcos Sarmiento das Chagas  
(Bibliotecário - CRB5 / 1615).

**(*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1816) COM O USO DE  
MARCADORES ISSR**

**Claudivane de Sá Teles Oliveira**

Engenheira de Pesca

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2016

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal (Produção de não ruminantes).

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Norma Suely Evangelista-Barreto

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Soraia Barreto Aguiar Fonteles

**CRUZ DAS ALMAS – BA  
2018**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS, AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL  
CURSO DE MESTRADO

**VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES DE TAMBAQUI  
(*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1816) COM USO DE  
MARCADORES ISSR**

Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação/Tese de Claudivane de Sá  
Teles Oliveira

Claudivane de Sá Teles Oliveira

Aprovada em: 27 de abril de 2018

Profa. Dra. Norma Suely Evangelista-Barreto  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Orientadora

Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira  
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Examinador Externo

Prof. Dr. Marcos Ferreira Brabo  
Universidade Federal do Pará  
Examinador Externo

## DEDICATÓRIA

A Deus, porque dEle e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; glória, pois,  
a Ele eternamente. Amém!

Ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos - LAGOA, "MEU  
CARDUME", por cada momento de proteção, companheirismo, união e fidelidade.

Aos meus familiares, amigos e ao meu noivo, Dony Soares, dedico esta  
dissertação com à esperança de que entendam, um dia, as minhas ausências.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e pela oportunidade de realizar mais esta conquista, colocando em meu caminho todos os meios necessários para concretizar mais esta etapa.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pelo auxílio concedido. A Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, campus Cruz das Almas-BA e ao Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, pelas condições oferecidas para a execução deste trabalho e pela contribuição para minha formação profissional. Ao Curso de Pós-graduação em Ciências Animal ela oportunidade concedida.

A minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Norma Suely Evangelista-Barreto, pela atenção e sobretudo pela confiança ao longo desses dois anos.

À minha querida e amável Co-orientadora Dra. Soraia Barreto Aguiar Fonteles, pela dedicação, ensinamentos, pela confiança depositada em mim durante este trabalho e acima de tudo por me instigar no desenvolvimento das pesquisas.

Ao Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira, pelo auxílio nas análises estatísticas e por cada conhecimento fornecido.

Aos meus colegas do Laboratório Análise Genética de Organismos Aquáticos - LAGOA, pelo conhecimento compartilhado, apoio nas atividades laboratoriais e momentos de descontração.

Ao Dr. Aldeney Andrade Soares Filho pelas amostras concedidas, contribuindo graciosamente com este estudo.

A todos os funcionários do DNOCS em Pentecoste-CE por possibilitar a coleta dos meus exemplares.

A Bahia Pesca S/A em especial aos gerentes das estações de Piscicultura Paulo Reis e Felipe Vieira pela ajuda nas coletas.

A todos as pessoas e instituições que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1816) COM O USO DE MARCADORES ISSR

**RESUMO:** A espécie *Colossoma macropomum*, popularmente conhecida como tambaqui, é um peixe nativo da região Neotropical brasileira que se destaca na aquicultura nacional como a espécie nativa mais cultivada. Entretanto, em seu ambiente natural essa espécie foi sobreexplorada e teve seus estoques reduzidos, sendo necessária a elaboração de medidas de manejo e conservação (dentre elas o defeso e o repovoamento) para minimizar os impactos deixados pela ação antrópica. Para gerenciar os recursos genéticos pesqueiros para o tambaqui, seja na natureza ou em cativeiro, se faz necessário medidas de monitoramentos das populações, considerando a dinâmica de seus aspectos ecológicos e a importância de sua variabilidade genética. Apesar de toda importância aquícola pouco se tem estudado com relação a redução de variabilidade dos estoques cultivados para essa espécie, e sobre a sua variabilidade em ambiente natural. Atualmente diferentes marcadores moleculares são utilizados para estudos de variabilidade genética do tambaqui, bem como para conhecer a estrutura das populações e suas relações intra e interpopulacionais. Desta forma objetivou-se avaliar a diversidade genética em diferentes populações cativas e uma população nativa de tambaqui, por meio de marcadores ISSR. Análises intrapopulacionais e interpopulacionais foram realizadas para verificar a diversidade genética das populações estudadas no Norte e Nordeste do Brasil. Para extração de DNA foi utilizado o protocolo fenol-clorofórmio. Vinte e nove marcadores moleculares ISSR foram testados, sendo treze selecionados por apresentarem melhor grau de polimorfismo e melhor nitidez dos padrões de bandas. A partir da análise dos *loci* foi elaborada a matriz de presença e ausência e com a utilização de programas estatísticos foram obtidos os parâmetros de diversidade genética dentro e entre as populações, percentagem de bandas polimórficas índice de Shannon, diversidade genética de Nei, diferenciação populacional e fluxo gênico. Ponderando os valores do índice de fixação, os resultados demonstraram que as populações apresentam uma diferenciação. A variabilidade genética nas populações de piscicultura foi relativamente baixa quando comparadas a população selvagem. Com os achados deste trabalho diferentes estratégias de manejo poderão ser sugeridas com a finalidade da melhoria dos planteis cultivados e conservação do patrimônio genético dessas populações.

**Palavras Chave:** Aquicultura; Genética de populações; Marcadores moleculares; Melhoramento genético

**GENETIC VARIABILITY of POPULATIONS of TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1816) using ISSR MARKERS**

**ABSTRACT:** The species *Colossoma macropomum*, popularly known as tambaqui, is a native fish of Brazilian Neotropics that excels in national aquaculture as the native species most widely cultivated. However, in your natural environment, they were stocks will reduced, requiring the elaboration of management and conservation measures (including the closed season and restocking) to minimize the impacts left by human action. To manage the fishery tambaqui genetic resources in nature or captivity, must wear monitoring in populations, considering the dynamics of ecological aspects and the importance of your genetic variability. In spite of all aquaculture importance few has been studied with respect to variability reduction farmed stocks for this species, and about the variability in your natural environment. Currently different molecular markers are used for studies of genetic variability of the tambaqui, as well as to know the structure of the populations and their intra-and interpopulacionais relations. Thus the objective of assessing the genetic diversity in different captive populations and an thus the objective of assessing the genetic diversity in different captive populations and an wild population of tambaqui, through ISSR markers. Intrapopulacionais and interpopulacionais analyses were carried out to check the genetic populations diversity in the North and northeast of Brazil population of tambaqui, through ISSR markers. Intrapopulacionais and interpopulacionais analyses were carried out to check the genetic diversity of populations studied in the North and northeast of Brazil. DNA extraction was made by phenol-chloroform protocol. Twenty-nine ISSR molecular markers have been tested, being thirteen selected by presenting better degree of polymorphism and sharp picture of the patterns of bands. From the analysis of the loci read was the array of presence and absence, and with the use of statistical programmes were obtained the parameters of genetic diversity within and between populations, percentage of polymorphic bands Shannon index, Nei's genetic diversity, population differentiation and gene flow. Pondering the fixation index values, the results demonstrated a differentiation. The genetic variability in populations of fish farming was relatively low when compared to the wild population. With the findings of this work different management strategies may be suggested for the purpose of improvement of players cultivated and conservation of genetic heritage of these populations.

*Keywords:* Aquaculture; Population genetics; Molecular markers; Genetic improvement



## LISTAS DE ABREVIATURA

AMOVA – Analyses of Molecular Variance – Análise de Variância Molecular

BA – Bahia

CA – Cachoeira

CE – Ceará

DD – Dias d'Ávila

DNA – Deoxyribonucleic Acid – Ácido Desoxirribonucleico

DNOCS – Departamento Nacional de Obras Contra Seca

DNTP – Desoxinucleotídeo Tri-fosfato

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

FAO – Food And Agriculture Organization of the United Nations – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

ISSR – Inter Simple Sequence Repeat – Sequências Simples Entre Repetições

PCR – Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia de Polimerase

PE – Pentecoste

RAPD – Random Amplified Polymorphic DNA – Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism – Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição

SNP – Single Nucleotide Polymorphism – Polimorfismo de Nucleotídeo Único

SSR – Simple Sequence Repeat – Sequências Simples Repetidas

$\sigma$  – Desvio padrão

$\mu\text{g}$  – Micrograma

$\mu\text{L}$  – Microlitros

## LISTAS DE FIGURAS

### Revisão de Literatura

Figura 1 Caracteres morfológicos presentes na família Charadriidae: a) orbitosfenoides pequenos; b) presença de rinosfenoide; e c) raios da nadadeira caudal fundido em ossos mediais laminares. ....	4
Figura 2 Exemplar adulto da espécie <i>Colossoma macropomum</i> .....	6
Figura 3 Crescimento médio anual da produção de carnes de origem animal no Brasil entre os anos de 2004 a 2014. ....	8

### Capítulo 1

Figura 1 Localização geográfica das populações de tambaqui e número de indivíduos amostrados.....	25
Figura 2a) Dendrograma gerado pelo método UPGMA (Unweighted pair group method arithmetic mean) das populações de tambaqui baseado na distância genética de Nei (1972). b) Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e análise estrutural de 4 populações de tambaqui oriundos de ambiente natural e pisciculturas.....	32

### Capítulo 2

Figura 1 Localização geográfica dos estoques de tambaqui e número de indivíduos amostrados.....	40
Figura 2 Dendrograma derivado através de UPGMA ( <i>Unweighted pair group method, arithmetic mean</i> ) das populações de <i>C. macropomum</i> baseado na distância genética de Nei (1972). Análise de coordenadas principais (PCoA) e análise estrutural de 110 tambaquis amostrados de três pisciculturas no Nordeste .....	46

## LISTAS DE TABELAS

### Capítulo 1

Tabela 1 Localização dos estoques de tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) de acordo com o ambiente e o número de indivíduos amostrado.....	25
Tabela 2 <i>Primers</i> selecionados para amplificação de DNA em estudo de diversidade genética de tambaqui.....	27
Tabela 3 Análise de parâmetros de diversidade em quatro estoques de tambaqui provenientes de pisciculturas e ambiente natural usando marcador ISSR.....	28
Tabela 4 Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para as populações de tambaqui ( <i>C. macropomum</i> ) provenientes de pisciculturas e ambiente natural.....	30
Tabela 5 Mensuração da Identidade genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as quatro populações de tambaqui.....	31
Tabela 6 Análise de Variância Molecular-AMOVA em estoque nativo e estoques cultivados de tambaqui.....	31

### Capítulo 2

Tabela 1 <i>Primers</i> selecionados para amplificação de DNA no estudo de diversidade genética de tambaqui em três estações de piscicultura no Nordeste do Brasil.....	42
Tabela 2 Parâmetros de diversidade: número de alelos observados, número efetivo de alelos, diversidade genética de Nei (1973), índice de informação de Shannon, número de loci polimórfico e percentual de loci polimórficos em três estoques de tambaqui via marcadores ISSR. ....	43
Tabela 3 Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para as populações de tambaqui em três estações de piscicultura no Nordeste do Brasil.....	44
Tabela 4 Identidade genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as três populações cultivadas de tambaqui.....	45
Tabela 5 Análises de variância molecular (AMOVA), fonte de variação (FV), soma de quadrados (MS), coeficiente de variação (CV), porcentagem de variação (V %), índice de fixação ( $F_{ST}$ ) em grupos de reprodutores de tambaqui.....	47

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	3
2.1 Biologia da espécie .....	3
2.1 .1 Ordem Characiformes .....	3
2.1 .2 Família Characidae .....	4
2.1 .3 A espécie <i>Colossoma macropomum</i> .....	5
3. Aquicultura e pesca no Brasil e no Nordeste.....	8
4. Cultivo do tambaqui.....	10
4.1Tambaqui e seus híbridos .....	11
5. Marcadores Moleculares - ISSR .....	13
6. Análise da variabilidade genética em peixes.....	15
7. Estudos moleculares com <i>Colossoma macropomum</i> .....	19
CAPITULO 1 – Artigo 1 .....	22
CAPITULO 2 – Artigo 2 .....	37
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

## 1. INTRODUÇÃO

Uma rica biodiversidade de peixes com grande potencial para produção em larga escala, acompanhado de excelentes recursos naturais tornam o Brasil uma potência promissora na produção de organismos aquáticos. Esta produção tem se destacado no cenário da aquicultura nacional diante a demanda crescente por alimentos. A atividade aquícola tem se desenvolvido vigorosamente e conquistado destaque quando comparado às outras atividades da agropecuária, principalmente no que diz respeito ao seu rápido crescimento (FAO, 2016).

No Brasil, a principal espécie nativa cultivada é o tambaqui (*Colossoma macropomum*) com produção de 136,99 mil toneladas, ou 27% de toda produção de peixes no país em 2016, perdendo apenas para a tilápia (*Oreochromis* sp.) que representa 47,1% da piscicultura continental (IBGE, 2016).

Devido a sua valorização econômica nacional, o tambaqui, foi inserido no programa brasileiro de melhoramento genético. Muito se tem avançado no que diz respeito a biologia da espécie e seu cultivo (reprodução, larvicultura, engorda e abate), como por exemplo, melhor crescimento e ganho de peso em *C. macropomum* melhorados geneticamente. Este fato contribui diretamente em subsidio para o aumento da produção da espécie no país (OLIVEIRA *et al.*, 2012; MELLO *et al.*, 2015; MARCOS *et al.*, 2016).

De acordo com alguns estudos genéticos, tem sido possível observar que a formação de estoques reprodutores com baixa variabilidade genética podem causar problemas relacionadas aos ciclos endogâmicos como a capacidade de adaptação e sobrevivência dos alevinos (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 2010; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2014) além de poder afetar o potencial genético da espécie (MOREIRA *et al.*, 2007). Uma diversidade genética baixa está negativamente correlacionada com o baixo potencial de adaptação às mudanças nas condições ambientais (RASHID *et al.*, 2012).

Assim, com o aumento de estoques de peixes cultiváveis e dada a importância da variabilidade genética em programas de melhoramento genético em populações de peixe, o monitoramento dos estoques de reprodutores a fim de se evitar problemas endogâmicos, como prole com baixa capacidade produtiva ou defeituosa, é crucial (EMBRAPA, 2012). Sabe-se que planejar estratégias de manejo

e conservação tem sido a chave para obtenção de sucesso na atividade piscícola, podendo se tornar ainda melhor quando existe informação correta sobre a composição genética da espécie cultivadas (MUNEER *et al.*, 2011).

A utilização de marcadores moleculares como ferramenta de caracterização e reconhecimento de estoques piscícolas tem se mostrado eficiente (WASKO *et al.*, 2004; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2015). Em estudos genéticos esta metodologia tem contribuído para questões que envolvem a conservação e manejo de estoques pesqueiros e aquícolas e tem sido descrita em diferentes estudos de variabilidade genética (AGUIAR *et al.*, 2013; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2014; ALMEIDA-VAL, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2016)

O investimento em pesquisas que tenham como foco a variabilidade genética em espécies cultiváveis tende a fornecer estratégias de monitoramento, manejo e conservação genética de estoques que são de grande importância para o desenvolvimento da aquicultura. Nesse sentido, este trabalho tem por objetivo caracterizar geneticamente populações da espécie *Colossoma macropomum* cultivados em pisciculturas do Estado do Ceará e Bahia e compará-los com uma população natural do Estado do Amazonas por meio do uso de marcadores moleculares ISSR.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Biologia da espécie

#### 2.1 .1 Ordem Characiformes

A incerteza evolutiva da ordem Characiforme persistiu até meados da última década (MOTA *et al.*, 2014). Essas discordâncias e incertezas demonstram a necessidade de reexaminar todas as famílias de Characiformes através de um conjunto de dados moleculares e filogenias, a fim de compreender a evolução dentro desta principal linhagem de teleósteos (MELO *et al.*, 2016; BETANCUR-R *et al.*, 2017).

Os peixes que agrupam essa ordem estão entre os mais diversos e abundantes componentes de água doce do mundo, com cerca de 2.000 espécies distribuídas em 23 famílias e estas discriminadas de modo que 4 delas são africanas e 19 neotropicais (MOTA *et al.*, 2014; ESCHMEYER e FONG, 2016). Representantes desta ordem são encontrados em águas continentais do sul dos Estados Unidos da América, México, América Central e do Sul e na África (MIRANDE, 2010).

A diversidade de tamanhos é variável nesta ordem encontram-se espécies que não ultrapassam 26 mm, como é o caso da *Xenoribrucon polyancistrus*, até espécies que alcançam 1 metro de comprimento como descrito para *Hydrocynus vittatus* (MELO *et al.*, 2016).

Segundo Mota *et al.* (2014), a variedade no hábito alimentar das espécies também é marcante, nela encontram-se algumas espécies iliófagas como *Prochilodus lineatus*; predadoras *Pygocentrus piraya*; herbívora *Colossoma macropomum* e até mesmo espécies que se alimentam de escamas e nadadeiras de outros peixes, como *Catoprion mento* e *Phago loricatus*, respectivamente.

Os Characiformes possuem notável importância ecológica, em função da sua diversidade e abundância, além de muitos dos seus representantes serem comercialmente importantes na aquicultura e na pesca para produção de alimento

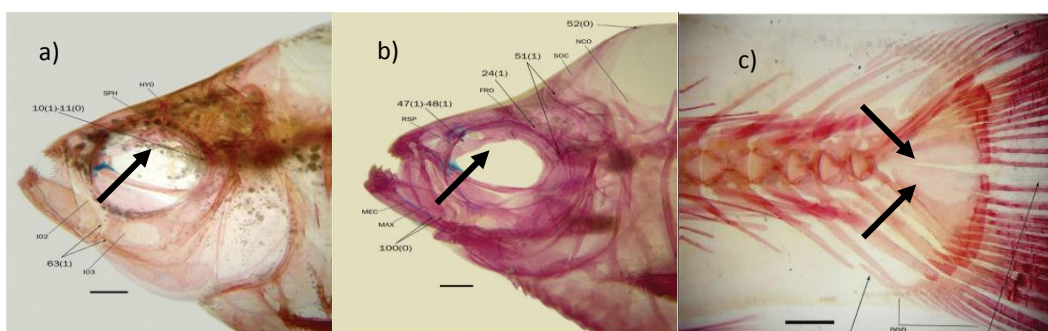
como também na aquariorfilia e produção de peixes ornamentais (MALABARBA e WEITZMAN 2003; ALMEIDA *et al.*, 2013).

### 2.1.2 Família Characidae

A família Characidae é a mais diversificada entre os peixes neotropicais (NELSON *et al.*, 2016). Trata-se de uma família formada por mais de 600 espécies e estão distribuídas em 88 gêneros que na maioria dos casos apresenta colocação ainda incerta, em função dos problemas taxonômicos, o que reflete a baixa compreensão das relações filogenéticas entre as espécies conhecidas (OLIVEIRA *et al.*, 2011; MOTA *et al.*, 2014).

Mirande (2010) propõe um estudo de filogenia para esta família baseado em 360 caracteres morfológicos, estudados para 160 espécies. De forma geral estes são caracterizados por possuir orbitosfenoides pequenos, delgados e separados de parasfenoides (Figura 1 a); rinosfenoide presente (Figura 1 b); canal da linha lateral presente na membrana da nadadeira caudal, raios da nadadeira caudal fundido em ossos mediais laminares (Figura 1 c) e seção de adutores mandibulares próximos ao préoperculo.

Figura 1 Caracteres morfológicos presentes na família Characidae: a) orbitosfenoides pequenos; b) presença de rinosfenoide; e c) raios da nadadeira caudal fundido em ossos mediais laminares.



Fonte: Mirande (2010)

A composição desta família vem passando por mudanças e isto tem se dado pelo grande número de incertezas nas subfamílias (MOTA *et al.*, 2014; NELSON *et al.*, 2016). Dentre as mudanças ocorridas pode-se citar, a remoção de Subfamílias



anteriormente reconhecidas (Crenuchinae e Characidiinae), agora reconhecidas na família Crenuchidae, e a remoção de táxons africanos (o antigo Alestiinae, agora uma família) (NELSON *et al.*, 2016).

Com relação a sua importância, dentro desta família há uma grande diversidade e a mesma se destaca tanto ecológica quanto economicamente (GUISANDE *et al.*, 2012). Muitas espécies são utilizadas para alimentação humana como *C. macropomum* e *Brycon opalinus*; aquarioria a exemplo *Paracheirodon* sp. e atividades de lazer como, por exemplo, a pesca esportiva com *Hydrocynus brasiliensis* (LIMA *et al.*, 2003). O número de espécies válidas da família Characidae subiu para quase 1.100, sendo que 203 foram descritas nos últimos 15 anos (ESCHMEYER e FONG, 2016).

No Brasil, existem cerca de 300 espécies pertencentes a esta família, compreendidos em peixes de água doce, com variação de tamanho e coloração, geralmente providos de nadadeira adiposa, nadadeira caudal bifurcada e nadadeira anal desenvolvida (NELSON *et al.*, 2016).

### 2.1.3 A espécie *Colossoma macropomum*

O tambaqui é um peixe de escamas, com corpo romboidal, alto, achatado e serrilhado no peito (ARAÚJO-LIMA e GOUDING 1998). Quando adulto é facilmente caracterizado por seu formato arredondado e variação de coloração parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo (Figura 2) que pode variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água. Possui nadadeira adiposa curta, com raios nas extremidades (ARAÚJO-LIMA e GOMES, 2005).

Comparado com grande parte dos peixes oriundos da bacia amazônica, esta espécie possui lábios bastante carnosos e boca terminal (FURUYA, 2001). Apresenta rastros branquiais desenvolvidos (espinhos longos e finos) que estão associados à filtragem do zooplâncton. Tais características permitem que sua alimentação seja onívora com tendência a herbívora, embora haja relatos do mesmo como filtrador e frugívoro (ABELHA *et al.*, 2001; RODRIGUES, 2014). Adapta-se com facilidade a alimentação artificial, pois possui grande capacidade de digerir

proteína animal e vegetal, em função de sua eficiência na conversão alimentar (DE ALMEIDA *et al.*, 2011; RODRIGUES, 2014).

Figura 2 Exemplar adulto da espécie *Colossoma macropomum*.



Fonte: <http://wrec.igfa.org/WRecordsList.aspx?lc=AllTackleecn=Tambaqui>

Possui a seguinte classificação sistemática (GRAÇA e PAVANELLI, 2007):

Classe Osteichthyes = Actinopterygii

Superordem Ostariophysii

Ordem Characiformes

Família Characidae

Subfamília Serrasalminae

Gênero *Colossoma*

Espécie *Colossoma macropomum*

Taxonomicamente pertence à subfamília Serrasalminae, que possui 15 gêneros e 80 espécies com distribuição restrita à região Neotropical, embora algumas espécies possam ser encontradas em outras regiões como resultado de introduções, sendo muitas delas com fim aquícola (REIS *et al.*, 2003; NELSON, 2006).

Esta espécie possui uma boa resistência a baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água, essa característica tem sido indicada por adaptações morfológicas como a expansão do lábio inferior, o que permite a captura de oxigênio localizado à lâmina superficial da coluna d'água (VAL E ALMEIDA-VAL, 1995; FLORINDO *et al.*, 2006). Sua área de superfície branquial facilita a troca gasosa em águas com baixas concentrações de oxigênio dissolvido (VAL *et al.*, 1998).

Estudos sobre *C. macropomum* indicam que possui hábito gregário, sendo propícia para uso em cativeiro por ser rústica, de fácil criação, adaptar-se bem às

condições extremas de hipóxia e pH (VAL E ALMEIDA-VAL, 1995; CHAGAS E VAL, 2003).

Trata-se de uma espécie reofílica, ou seja, em ambiente natural faz migração para se reproduzir (VAZZOLER e MENEZES, 1992). Sua ovulação e desova ocorrem no período das chuvas e tais eventos dependem de fatores ambientais (temperatura, fotoperíodo, pluviosidade, entre outros) que devem ser regulados por *inputs* fisiológicos e genéticos, assim como acontece na maioria dos peixes teleósteos (VENTUERI e BERNARDINO, 1999; ANDRADE *et al.*, 2015).

Quando se encontram confinados, supressões fisiológicas no processo reprodutivo tendem a ocorrer, devido às restrições de fatores ambientais (áreas para deslocamento, fotoperíodo e temperatura) suprimindo a ação dos hormônios indutores da desova, pois, embora haja o processo de desenvolvimento gonadal, a maturação final (migração do núcleo e quebra da vesícula nuclear) não acontece (ZOHAR e MYLONAS, 2001). Para contornar tal entrave na reprodução dessa espécie em cativeiro, hormônios exógenos são comumente aplicados (MUNIZ, 2008).

A maioria das técnicas hormonais para indução da reprodução dos peixes baseia-se na aplicação intramuscular ou intra-abdominal, principalmente na base das nadadeiras peitorais (ORFÃO, 2013). Vários hormônios são administrados atuando em diferentes níveis do eixo hipófise-hipotálamo, sendo o mais antigo e ainda o mais utilizado o extrato bruto da hipófise de peixes maduros. Emprega-se também gonadotrofinas purificadas parcial ou totalmente, que são industrializadas especificamente para essa finalidade (CRISCUOLO-URBINATI *et al.*, 2012).

A manipulação artificial do seu ciclo reprodutivo constitui uma técnica eficiente para a indução da desova e espermição, permitindo que ocorra a reprodução destes indivíduos no momento desejado e em condições controladas de cativeiro (MURGAS *et al.*, 2011).

Em peixes cultivados exclusivamente para engorda, Almeida *et al.* (2016), descreveram a técnica de espermatogênese muito precoce (peixe com aproximadamente 750 g) declarando como um processo aparentemente rápido e constante em testículos de tambaqui, com maior concentração de peixe maduro no mês de agosto. Por outro lado, a ovogênese é um processo muito mais longo que começa apenas em peixes ao redor de 1200 g e não se completa antes da despesca.

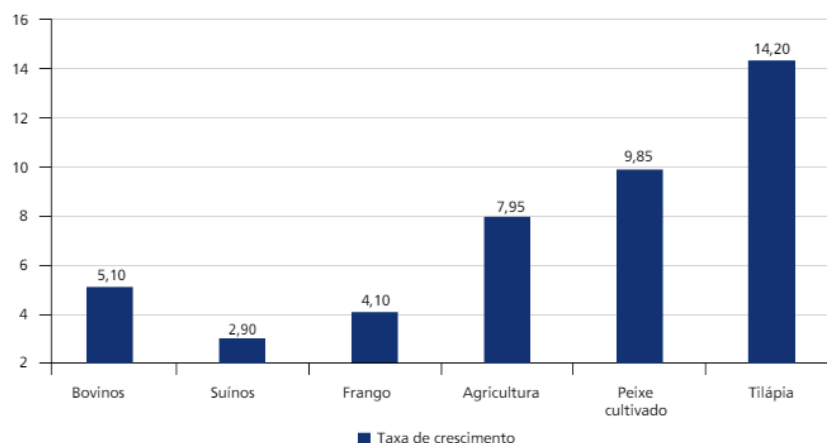
Na natureza, a primeira maturação gonadal ocorre quando os animais atingem tamanho entre 45 - 60 cm e idade de 3,5 a 4 anos, nessa situação realiza desova total, fecundação externa e não há cuidado parental com a prole, característica típica de peixes de piracema (ARAUJO-LIMA e GOULDING, 1998).

### 3. Aquicultura e pesca no Brasil e no Nordeste

Tradicionalmente definida como o cultivo de organismos aquáticos em áreas costeiras e interiores, com manejo durante o processo de criação para aumentar a produção e rentabilidade, a aquicultura é provavelmente o setor ligado à produção de alimentos com mais rápido crescimento (Figura 3) (KUBITZA, 2015; FAO 2016).

Ao se diferenciar da pesca extrativa (atividade de exploração dos recursos naturais de propriedades públicas), o cultivo de organismos aquáticos possibilita produtos mais homogêneos com regularidade e possibilidade de rastreio durante toda a cadeia de produção (OLIVEIRA, 2009; ROCHA *et al.*, 2013).

Figura 3 Crescimento médio anual da produção de carnes de origem animal no Brasil entre os anos de 2004 a 2014.



Fonte: Kubitza, 2015.

No Brasil, a exploração dos recursos pesqueiros ocorre tanto em água doce como em água salgada, sob diversas categorias ou modalidades, sendo que do ponto de vista socioeconômico, a pesca de subsistência e pesca comercial são as mais relevantes, principalmente pela quantidade de mão de obra que ocupa (FAO,

2016).

A produção nacional brasileira relativa a pesca extrativa, alcançou no ano de 2014 um total de 235,527 mil toneladas representando um decréscimo de 1,3 % para o ano anterior (FAO, 2016). Já a produção aquícola nacional no mesmo ano gerou um volume de 560 mil toneladas. A aquicultura continental (peixes de água doce) contribuiu com 474,3 mil toneladas de toda essa produção o que correspondeu a 84,3% do total da aquicultura brasileira (FAO, 2016).

O Brasil possui recursos hídricos em abundância, um clima tropical propício e, sobretudo espécies nativas com viabilidade de cultivo. Deste modo, o país tem um grande potencial para a produção de peixes, sem concorrer em espaço físico com a agropecuária (ROCHA *et al.*, 2013).

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2017) em 2016 a produção de peixes no Brasil foi de 507,12 mil toneladas o que representou um crescimento de 4,4% comparado ao ano anterior. A região mais produtora foi a região Norte (produção de 149,75 mil toneladas simbolizando 29,5% da produção nacional) e o Estado de maior produção foi Rondônia (90,64 mil toneladas e representa 17,9% da produção nacional).

Nesse período a principal espécie produzida em território nacional brasileiro foi a tilápia (*Oreochromis* sp.) com um total de 239,09 mil toneladas. A representatividade desta espécie é tamanha que chega a quase metade de todo cultivo de peixe (47,1%). A segunda espécie mais produzida é o tambaqui (*C. macropomum*) acumulando um total de 136,99 mil toneladas (27,0% da piscicultura nacional). A espécie tem também se destacado pela produção dos seus híbridos (tambatinga e tambacu) que se apresentam em terceiro lugar neste senso (IBGE, 2017).

Na região Nordeste, assim como em todo o território nacional, alguns Estados se mostram mais avançados e estruturados em sua cadeia produtiva e podem ser considerados autossustentáveis, enquanto outros possuem menor competitividade e necessitam de investimentos para desenvolvimento da atividade piscícola (BRABO, *et al.*, 2016). O Estado da Bahia apesar das condições naturais privilegiadas para o desenvolvimento das mais diversas modalidades aquícolas ainda se enquadra no segundo grupo (BAHIA PESCA, 2016).

No Nordeste, a piscicultura continental é representada especialmente pela criação da tilápia em tanques-rede nos açudes do Ceará e nos reservatórios do rio

São Francisco em áreas da Bahia, Pernambuco e Alagoas, e pelos peixes redondos (tambaqui, tambacu, tabatinga, pacu e pirapitinga) em viveiros escavados no Maranhão, Piauí, Sergipe e Bahia (BRABO *et al.*, 2016).

Os principais polos de produção do Nordeste estão no Ceará (açudes Castanhão e Orós), ao longo do Submédio e Baixo São Francisco (trecho dos rios Xingó Itaparica e Moxotó) contemplados pelo Estado da Bahia, Sergipe, Pernambuco e Alagoas, e Sítios Novos no Ceará. A principal espécie produzida do Nordeste é a tilápia 63% seguida pelo tambaqui 24,5% (IBGE, 2016). Os canais de comercialização mais expressivos são os atacadistas ou intermediários, a venda direta ao consumidor final e os supermercados (BRASIL, 2013; SEBRAE, 2015).

No ano de 2016 a criação de peixes de água doce foi a principal atividade aquícola da Bahia, produzindo um total de 10,7 mil toneladas o que representa 2,1% de toda produção nacional, arrecadando R\$ 70,890 milhões (IBGE, 2017).

#### **4. Cultivo do tambaqui**

Pode-se dizer que o DNOCS foi um dos grandes responsáveis por estimular o cultivo de peixes (entre eles o tambaqui) para criação em cativeiro em praticamente todo território nacional. Ainda hoje tal órgão ainda exerce esse papel por meio da distribuição de alevinos para o Nordeste e outras regiões do Brasil (VIDAL, 2016).

As primeiras matrizes responsáveis pela formação dos plantéis de reprodutores de tambaqui nas pisciculturas do Nordeste, são descendentes de 74 alevinos oriundos de Iquitos, no Peru, trazidos pelo DNOCS (SANTOS *et al.*, 2007). Este órgão teve importante papel, a partir da década de 70, na pesquisa de reprodução em cativeiro desta espécie, além de fornecer um grande acervo de informações sobre seu crescimento e manutenção de alevinos (CAVALCANTE e STEINMULLER, 2017).

Diversos fatores favorecem o cultivo de tambaqui, como a fácil obtenção de juvenis, o elevado potencial de crescimento, a alta produtividade, sua rusticidade e, sobretudo a adaptação a criação em cativeiro além da fácil aceitação as rações comerciais (ARAÚJO-LIMA e GOULDING, 1998; JACOMETO *et al.*, 2010; CAMPOS *et al.*, 2015).

Em contraste com as populações selvagens, os estoques cultiváveis de tambaqui estão aumentando em decorrência da atividade piscícola, caracterizando-a como a espécie nativa mais comumente produzida no Brasil (IBGE, 2017). A maior produção de tambaqui se encontra no Norte do país (78,6%), principalmente no Estado de Rondônia, que responde por 60,7% da produção regional. A região Nordeste produziu 12,3 toneladas de tambaqui em 2016, representando 15,7% do total produzido no país (IBGE, 2016; 2017).

A quase uma década, Resende (2009) constatava que a cadeia produtiva da aquicultura, em especial as ligadas a piscicultura, necessitava da ampliação e desenvolvimento de projetos que levassem em consideração aspectos como nutrição melhoramento genético, sanidade, manejo e gestão ambiental e aproveitamento agroindustrial e a eleição de espécies prioritárias.

Hoje, muito do que se tem estudado sobre o cultivo da espécie tem se voltado ao tripé: nutrição, genética e fatores ambientais (controláveis e incontroláveis) (MARCOS *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2016; OLIVEIRA e SOUZA, 2017; SOARES *et al.*, 2017). Assim os gargalos na cadeia produtiva da aquicultura podem ser vistos como oportunidades para a organização de políticas de pesquisa e desenvolvimento para espécies promissoras e a modernização e profissionalização do setor (SIDÔNIO *et al.*, 2012).

#### 4.1 Tambaqui e seus híbridos

Hibridação é o cruzamento de indivíduos ou grupos geneticamente diferentes e pode envolver cruzamentos entre linhagens ou cruzamento entre espécies (COSTA *et al.*, 2014). É comumente utilizada pelos aquicultores para obtenção de prole com maior desempenho em relação aos progenitores (HASHIMOTO *et al.*, 2014).

A hibridação tem se destacado no cenário aquícola nacional nos últimos anos sendo usada em várias espécies de peixes para aumentar a taxa de crescimento, na manipulação da diferenciação sexual, produzir animais estéreis, melhorar a qualidade da carne, aumentar resistência a doenças e tolerâncias climáticas, entre outras características (PORTO-FORESTI *et al.*, 2013; MORO *et al.*, 2013).

O tambaqui tem sido de grande importância em programas de hibridação artificiais ao longo das últimas décadas, o processo se dá com diferentes espécies, com o objetivo de produzir indivíduos estéreis ou raças mais produtivas do que qualquer uma das espécies parentais (BARTLEY *et al.*, 2001; HASHIMOTO *et al.*, 2014).

Dada a sua fecundidade, a fêmea do tambaqui (*C. macropomum*) é normalmente escolhida para este procedimento e acasaladas com machos de outras duas espécies Characiforme, pacu (*Piaractus mesopotamicus*) pirapitinga e (*Piaractus brachypomus*), este cruzamento produz híbridos conhecidos como "tambacu" e "tambatinga", respectivamente (GOMES *et al.*, 2012). Esta hibridação trouxe a combinação de características de espécies diferentes para produzir um organismo economicamente mais viável, que é em particular, de crescimento rápido, e mais resistentes a doenças e baixas temperaturas (AGUIAR *et al.*, 2013).

A produção destes híbridos tem se sobressaído no cenário aquícola nacional (HASHIMOTO *et al.*, 2011), destacando-se na terceira colocação da produção piscícola em 2016, correspondendo a 44,94 mil toneladas, representando 8,9% da produção nacional (IBGE, 2016).

Características zootécnicas de interesse juntamente com o manejo adequado representam um bom exemplo de sucesso na obtenção do vigor híbrido (ALVES *et al.*, 2014). O "tambacu" oferece uma junção positiva da resistência a baixas temperaturas e rusticidade do pacu com o rápido crescimento do tambaqui, além de apresentar rastros branquiais alongados, que permitem a filtração de plâncton e também apresentam maior sobrevivência, crescimento e uniformidade (MORO *et al.*, 2013). Tais fatores fizeram com que o "tambacu" se tornasse o principal híbrido produzido no Brasil (IBGE, 2017), sendo facilmente encontrado em supermercados e peixarias em especial nas regiões sudeste, centro-oeste e sul.

A semelhança gerada morfológicamente entre os híbridos e seus respectivos parentais dificulta a identificação destes animais com base na morfologia, ou mesmo o seu comportamento (PORTO-FORESTE *et al.*, 2013). Muitos piscicultores têm levado híbridos presumindo ser tambaquis puro, isso é compreensível, considerando as semelhanças morfológicas entre as diferentes formas em sua fase juvenil, entretanto isto poderá ter consequências econômicas graves ao gerar desconfiança entre proprietário de larvicultura de peixes e seus consumidores (GOMES *et al.*, 2012).



O monitoramento genético é uma prática indicada para avaliar os efeitos genéticos da hibridação em populações de peixes e permite verificar a ocorrência de híbridos F1 através da identificação dos indivíduos utilizando marcadores genético-moleculares (HASHIMOTO *et al.*, 2011; 2014). Estas análises representam um dos meios mais efetivos para verificar quando as populações atingem limiares críticos que necessitem medidas de gestão (ALLENDORF *et al.*, 2010).

Torna-se notável a crescente preocupação sobre os impactos biológicos da hibridação (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1994; PORTO-FORESTI *et al.*, 2010) e diversos marcadores genéticos tem sido desenvolvido para a identificação de híbridos, especialmente para espécies de interesse comercial “peixes redondos” Serrassalmídeos (HASHIMOTO *et al.*, 2011; FONTELES *et al.*, 2011; HASHIMOTO *et al.*, 2014).

## **5. Marcadores Moleculares - ISSR**

Marcadores de DNA são fundamentados em técnicas da biotecnologia moderna, são sequências de DNA capazes de revelar polimorfismos entre indivíduos geneticamente relacionados (SOUZA, 2015). Atualmente são usados corriqueiramente em diferentes áreas da pesquisa científica seja com humanos, animais, vegetais ou microrganismos. Seu potencial para desvendar os segredos contidos na molécula de DNA desperta o interesse em pesquisadores, não só da área de genética, mas também de inúmeros outros campos do conhecimento (CONCADO *et al.*, 2012).

Um marco importante quanto aos marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase-PCR (*Polymerase Chain Reaction*) que desencadeou o sequenciamento da molécula de DNA (PAVAN e MONTEIRO, 2014). Desta forma, um grande número de tecnologias da genética molecular é utilizado para fornecimento de informações favoráveis ao desenvolvimento de programas de conservação e uso de recursos genéticos (FALEIRO, 2007). A escolha da técnica dependerá do objetivo do estudo, da infraestrutura local, dos recursos financeiros e humano disponíveis além do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (DIAS *et al.*, 2015; COSTA *et al.* 2016).

O monitoramento de populações e estoques de peixes tem sido de grande importância na obtenção de resultados positivos em programas de melhoramento genético, fornecendo caracteres de interesse do produtor (FALCONER, 1987; LOPES *et al.*, 2009) ou a conservação dos recursos genéticos (POVH *et al.*, 2008). Estoque com baixa variabilidade genética ao longo das gerações pode induzir endogamia, reduzir a adaptabilidade, sobrevivência de progênies (POVH *et al.*, 2008; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2010) e perdas do potencial genético (MOREIRA, *et al.*, 2007).

Os marcadores moleculares dominantes como *Inter Simple Sequence Repeats* (ISSR), *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP) e *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) são bastante utilizados na análise da variabilidade genética de populações de peixes cativos e selvagens (WASKO *et al.*, 2004; GASQUES *et al.*, 2013; LABASTIDA *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2016).

Descrito quase que simultaneamente por Meyer *et al.* (1993), Gupta *et al.* (1994), Wu *et al.* (1994) e Zietkiewicz *et al.* (1994) os marcadores ISSR se baseiam em iniciadores de repetição di, tri ou tetranucleotídica para amplificação do DNA num determinado trecho do genoma localizado entre dois microsatélites idênticos de orientação reversa à cadeia de DNA, que estão amplamente distribuídos no genoma (ROUX *et al.*, 2007; LABASTIDA *et al.*, 2015). O resultado final é uma série de amplificação de fragmentos de DNA para cada amostra (espécime) que poderá ser analisado e comparado com outras amostras para avaliar a quantidade de variação presente nas amostras estudadas (NG e TAN, 2015).

Este marcador geralmente produz múltiplos fragmentos de DNA (cada um dos quais é considerado um *locus*) em um único PCR, permitindo a geração de um grande número de *loci* através do genoma de qualquer espécie sem a necessidade de primeiro conhecer as sequências de DNA das regiões alvo (NG e TAN, 2015).

Atualmente, a aplicação deste marcador molecular tem se destacado no campo de investigação para a aquicultura (QUEIROZ *et al.*, 2016). Em espécies nativas o ISSR foi usado para estudar a diversidade genética intra e interespecífica (FONTELES *et al.*, 2011; GASQUES *et al.*, 2013; VITORINO *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016). Seu uso também tem sido aplicado para diferenciação entre as espécies *C. macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* (pacu), *Piaractus brachypomus* (Pirapitinga) e seus híbridos (FONTELES *et al.*, 2011).

Trata-se de um marcador de baixo custo quando comparados aos demais marcadores (HILSDORF, 2013). Em contrapartida este possui desvantagens que merecem certa atenção como o fato de ser um marcador dominante o que impossibilita a identificação direta de heterozigose (NG e TAN, 2015).

Diante dessas características se torna possível e viável o uso de marcadores ISSR em populações de *C. macropomum* a fim de caracterizar a diferenciação genética existente intra e inter-específica dos estoques estudados.

## **6. Análise da variabilidade genética em peixes**

Com o advento dos marcadores moleculares alinhados a estudo da genética de populações, tornou-se possível quantificar e identificar a diversidade genética além de inferir como esta se distribui entre e dentro de populações, definindo sua estrutura permitindo o estudo do fluxo gênico, deriva genética, mutação e seleção natural (SUGANUMA, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2016).

Para Turchetto-Zolet *et al.* (2013), os métodos mais popularmente utilizados para quantificar a diferenciação genética entre populações estão baseados na estatística-F, introduzida primeiramente por Sewal Wright (1889-1988), que utiliza os coeficientes de endocruzamento para dividir a variação genética dentro e entre populações, sendo a quantidade de endocruzamento em uma população devida à diferenciação das populações ( $F_{ST}$ ) o mais conhecido (WRIGTH, 1978).

Para Clarck e Hartl (2010), a diferenciação genética entre populações baseados na estatística-F permite avaliar os níveis médios de endogamia ao nível populacional ( $F_{IS}$ ) e total ( $F_{IT}$ ) e a distribuição da variabilidade genética entre as populações ( $F_{ST}$ ). O  $F_{ST}$  se refere a quantidade de endocruzamento em uma população devida à diferenciação das populações e é o parâmetro da estatística-F o mais conhecido (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). Wright (1978) propôs um guia geral para interpretar os valores de  $F_{ST}$  em dados De 0 a 0,05 pode ser considerado como pequena diferenciação populacional; 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação populacional; 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação populacional e acima de 0,25 indica uma extensa diferenciação populacional.

Os índices de fixação são utilizados como indicadores da diferenciação genética entre populações, seja elas cativas ou nativas, e isso se dá por meio do

conceito de estrutura populacional que é gerado pela perda de variação genética em consequência aos efeitos de deriva genética, apresentando como resultado a redução da heterozigosidade nas subpopulações quando comparada a heterozigosidade esperada a partir da população original (McMANAUS *et al.*, 2011).

Outro coeficiente de grande relevância na genética de populações, usado em complemento a estatística-F, é o coeficiente de diferenciação gênica ( $G_{ST}$ ) (NEI 1973), que avalia o índice para o caso de múltiplos alelos, ou seja, a razão da diversidade gênica interpopulacional esperada pela diversidade gênica total esperada. Desta forma o valor de  $G_{ST}$  pode ser estimado pelo uso das médias de diversidade gênica para vários *locus* (SÁNCHEZ, 2008; HILSDORF, 2013).

Outra medida que se faz presente em trabalhos baseados em marcadores moleculares é a estatística  $H$  de Nei (1972). Esta medida de diversidade baseia-se na heterozigosidade gênica/alélica para quantificar a diversidade genética intra e inter-unidades experimentais, podendo ser aplicado a qualquer tipo de organismo, desde que a frequência gênica possa ser determinada (SÁNCHEZ, 2008).

Outra análise também muito aplicada é o índice de Shannon (VITORINO *et al.*, 2015). A função proposta por Shannon-Wiener mede a diversidade ou riqueza de espécies em estudos ecológicos no qual as análises se adequam as amostras coletadas ao acaso, considerando a riqueza das espécies a partir do cálculo de diversidade genotípica ou fenotípica de uma determinada população (GUTIÉRREZ-ESTRADA *et al.*, 2008).

A utilização desse índice como medida de diversidade populacional é muito interessante, especialmente quando se trabalha com dados ISSR, pois seu uso possibilita contornar o problema da não detecção dos genótipos heterozigotos, uma vez que o índice de Shannon não se baseia na heterozigosidade da população e, sim, na frequência fenotípica da banda na população (VITORINO *et al.*, 2015; LOPERA-BARRETO *et al.*, 2015).

Já a análise de variância molecular (AMOVA) é um dos métodos que determina a variabilidade genética inter e intrapopulacional (MEIRMANS, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2016). Segundo Excoffier (1992), a AMOVA descreve a correlação da diversidade haplotípica em diferentes níveis de subdivisão hierárquica e testando hipóteses de estruturação populacional. Os três níveis hierárquicos de diferenciação populacional calculados na AMOVA são: entre grupos ( $F_{CT}$ ), entre populações dentro de grupos ( $F_{ST}$ ) e dentro das populações ( $F_{SC}$ ), além de fornecer o coeficiente de

endocruzamento específico ( $F_{IS}$ ) (HILSDORF *et al.*, 2006; TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

Em relação ao fluxo gênico, populações isoladas a falta deste faz com que as mudanças nas frequências gênicas da população (mutações) não sejam compartilhadas. Ao se medir o grau de diferenciação genética entre populações, de forma indireta revela-se a possível variabilidade genética em *locus* que estejam envolvidos em fenótipos relacionados a processos adaptativos (HILSDORF, 2013).

Na deriva genética a população passa por efeito gargalo (redução do número de indivíduos da população) causada por algum fenômeno natural ou não (McMANUS *et al.*, 2011). Uma população isolada resultante de uma subdivisão ocorrida pelo isolamento populacional, novas frequências alélicas serão estabelecidas e submetidas à seleção. Nesta nova população a endogamia pode ser gerada em diferentes momentos da história evolutiva (efeito gargalo) (GALETTI *et al.*, 2008).

Um modelo simples de diferenciação contínua de populações foi proposto por Waples e Gaggiotti, (2006). Neste modelo cada círculo pode ou não representar populações diferentes, sendo que dentro de cada população o cruzamento é aleatório e as populações podem estar ligadas variando o grau de conectividade (sobreposição geográfica e/ou migração). A manutenção da conectividade genética que mantém uma metapopulação é o fluxo gênico. Assim, a metapopulação é um conjunto de populações locais ou não que interagem por fluxo gênico com eventos de extinções e recolonizações (HILSDORF, 2013).

Diversidade genética é um dos parâmetros importantes recomendados pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) para o manejo e conservação de espécies (McNEELY *et al.*, 1990). Em uma população a diversidade genética é considerada matéria-prima para a evolução por seleção natural (FISHER, 1930; HUGHES *et al.*, 2008).

Para a conservação dos recursos pesqueiro, torna-se necessário compreender o modo como as espécies de peixes se organizam geneticamente ao longo de uma bacia hidrográfica (GALETTI Jr *et al.*, 2008). Desse modo, a variabilidade genética torna-se importante para a sobrevivência a longo prazo das populações selvagens, sendo também fundamental para a manutenção dos recursos genéticos mantidos em cativeiro com a finalidade de repovoamento (RIBEIRO *et al.*, 2015).

Populações pequenas tendem a reduzir a diversidade genética devido às altas taxas de endogamia, induzindo uma elevada taxa de homozigose (FRANKHAM *et al.*, 2008). Os processos de domesticação e a maioria dos sistemas de cultivo de animais levam à perda natural de variabilidade genética dos estoques, ainda que este fator seja crucial em programas de melhoramento genético (LOPES *et al.*, 2009; EMBRAPA, 2012).

No Brasil, a piscicultura possui uma forte tendência de formação dos plantéis de matrizes por peixes que possuem baixa variabilidade genética ou alto grau de parentesco, bem como um número reduzido de espécimes (VARELA *et al.*, 2015). Uma das metas de um programa de reprodução em cativeiro é evitar ao máximo a ocorrência de acasalamentos consanguíneos entre os indivíduos da população (VARELA *et al.*, 2015).

Quando se objetiva trabalhar com ganhos genéticos de animais adaptados ao setor produtivo e na conservação dos recursos genéticos, Rolf *et al.* (2010) destacaram o cuidado com o controle das relações de parentesco entre reprodutores, pois a mesma, se feita desordenada, tende a perda da variabilidade genética do plantel.

Diante da crescente demanda de estudos voltados para a conservação das espécies de peixes, a genética se tornou uma ferramenta importante para direcionar esses esforços ao analisar os diferentes parâmetros que podem alterar a constituição genética dos indivíduos que formam uma população (CHIU *et al.*, 2014). Dentre esses parâmetros pode-se citar fatores como deriva genética, fluxo gênico, mutação, migração, efeito fundador, seleção e conseqüentemente evolução (MOREIRA *et al.*, 2007).

A variabilidade genética entre e dentro de populações de uma determinada espécie, comumente denominada estruturação genética populacional, é o resultado direto da interação entre as forças evolutivas (seleção, deriva, mutação e migração), sendo também influenciada pelas taxas de recombinação nos *locus* durante a meiose (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013).

Quando há estruturação populacional, é quase inevitável que ocorra alguma diferenciação genética entre as subpopulações, ou seja, as frequências alélicas entre as populações se tornam diferentes. Essa diferenciação genética pode resultar da ocorrência do processo de seleção natural em favor dos diferentes genótipos em populações distintas, mas também pode resultar de processos aleatórios na

transmissão dos alelos de uma geração para a próxima, ou ainda de diferenças casuais na frequência alélica entre os fundadores iniciais das subpopulações (HARTL, 2010).

Excoffier *et al.* (1992) e Excoffier (2001), propuseram uma abordagem diferente para mensurar a diferenciação genética entre populações na qual os índices de fixação podem ser calculados nos diferentes níveis de hierarquização que uma população pode estar estruturada, por exemplo, diferenciação dentro de uma população entre grupos de subpopulações, dentro de grupos entre subpopulações e dentro de uma população entre subpopulações (HARTL, 2010).

## **7. Estudos moleculares com *Colossoma macropomum***

Após ser inserido no Programa Brasileiro de Melhoramento Genético, o tambaqui recebeu uma atenção especial no que diz respeito a informações sobre sua nutrição, reprodução, conservação e melhoramento genético (DE ALMEIDA *et al.*, 2011; EMBRAPA, 2012; ORFÃO, 2013; RODRIGUES, 2014; VARELA *et al.*, 2015; OLIVEIRA e SOUZA, 2017). Estudos baseados na utilização de marcadores moleculares têm sido empregados por diversos autores e com diferentes fins, fornecendo informações sobre a diversidade genética desta espécie como observa-se abaixo:

Teixeira e Jamieson (1985) analisaram a diversidade alélica no loco da transferrina em população de tambaqui do lago Manaquiri na região Amazônica (103 espécimes). Nesse trabalho foi constatado um total de seis alelos, indicando a ocorrência de um único estoque geneticamente equilibrado. Calcagnotto e Toledo-Filho (2000) utilizaram o mesmo marcador para caracterizar geneticamente cinco estoques cultivados de tambaqui e detectaram três alelos no estoque mais antigo cultivado, oriundo de DNOCS em Pentecostes-CE, entretanto nos outros quatro estoques derivados deste, foi detectada a presença de apenas um alelo fixado para a transferrina, indicando a necessidade de adoção de estratégias de manejo para aumentar o potencial genético dos estoques e esclarecendo o efeito do “gargalo” genético em populações cultivadas.

Em ambiente silvestres e cultivados Leitão (1998) fez o uso de nove sistemas isoenzimáticos para *C. macropomum*. Segundo o autor ao realizar a comparação para os índices de heterozigosidade e polimorfismo para os peixes nativos foram da ordem de 0,125 e 33,33% respectivamente, enquanto para os peixes cativos apresentaram 16,7% de polimorfismo, expondo uma acentuada queda dos *locus* polimórficos dentro dos seus estoques cultivados.

Na última década estudos realizados em estoques naturais de tambaqui revelam alta variabilidade genética como descrito por Santos *et al.* (2007) ao usarem DNA mitocondrial ou por Santos *et al.* (2009) e Santana *et al.* (2012) ao usarem marcadores microssatélites. O mesmo pode ser observado em populações cultivadas, como foi descrito por Lopes *et al.* (2009), Jacometo *et al.* (2010) e Lopera-Barreto *et al.* (2015) usando marcadores RAPD ou Queiroz *et al.* (2016) com uso de marcadores ISSR.

Entretanto quando são realizadas comparações entre espécimes coletadas em ambiente natural (selvagens) e cultivados em piscicultura, os resultados entram em contraposição relatando maior variabilidade genética nas populações nativas como descrito por Santos *et al.* (2012), ao utilizarem marcadores isoenzimáticos, Aguiar *et al.* (2013) com DNA mitocondrial e Santos *et al.* (2016) com marcadores microssatélites.

Varela *et al.* (2015) investigaram as relações de parentesco sem informação de pedigree de um plantel de reprodutores de tambaqui, baseado em coeficientes de correlação de parentesco, a partir de *locus* de marcadores microssatélites, concluíram que os animais investigados não exibiram vínculo genético entre si, possibilitando o acasalamento de reprodutores, condição como esta melhora a perspectiva de manejo na seleção de reprodutores e o descarte de acasalamento machos e fêmeas altamente consanguíneos.

Uma outra modalidade de estudos moleculares tem sido realizada com esta espécie fundamentada no repovoamento de rios. Moraes Neto *et al.* (2017) analisaram a diversidade genética em dois estoques de reprodutores utilizados em programas de repovoamento no Estado de Rondônia, por meio de marcadores microssatélites, verificando que essa prática tem sido adotada para retificar a diminuição das populações naturais da espécie ocasionada por ações antrópicas. Ainda segundo os autores os estoques de reprodutores estavam geneticamente



muito relacionados e que ambos os estoques não apresentavam alta variabilidade genética.

No Estado do Amazonas, em razão da fácil renovação dos plantéis de reprodutores, Queiroz *et al.* (2016) utilizaram marcadores ISSR para avaliar a diversidade genética de tambaquis em três pisciculturas no Estado. Segundo os autores, o monitoramento genético deve ser realizado continuamente, assim como a substituição regular dos reprodutores, preferencialmente com espécimes selvagens e uso de informações moleculares para amplificar a variabilidade genética dentro dos estoques.

No Norte, Fazzi-Gomes *et al.* (2017) avaliaram populações cultivadas em 10 municípios do Estado de Pará com auxílio de marcadores microssatélites. Os resultados mostraram que as fazendas de tambaqui pesquisadas sofreram uma perda significativa de variabilidade genética e que estratégias de manejo reprodutivo deverão ajudar a garantir a produtividade e a qualidade das pisciculturas de tambaqui do norte do Brasil.

No Nordeste, Lopera-Barrero *et al.* (2015) avaliaram a variabilidade genética de tambaqui nos municípios de Porto Real do Colégio - AL, Araujo 1 e 2. Os autores relataram valores de polimorfismo entre 54,38 a 64,38% e índice de Shannon 0,33 a 0,37. Para a AMOVA a maior variação está dentro de cada estoque, a diferenciação genética ( $F_{st}$ ) variou entre 0,03 a 0,178 eo número de migrantes por geração de 5,07 a 12,8 considerando que os estoques apresentavam alta variabilidade intrapopulacional e alta diferenciação e distância genética entre si.

O monitoramento genético de populações selvagens ou cativas de peixes são extremamente necessárias para que programas de conservação e produção de peixes revelem resultados positivos a médio e longo prazos (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2009). A variabilidade genética é fundamental para qualquer programa de melhoramento genético (FALCONER, 1987) e a identificação do grau de variabilidade nos estoques de reprodutores é de grande importância para iniciar um programa de melhoramento (LOPES *et al.*, 2009).

## **CAPITULO 1 – Artigo 1**

Artigo submetido ou a ser submetido ao Periódico Aquaculture International, Qualis B1 na Área Zootecnia/Recursos Pesqueiros

Avaliação da diversidade genética em populações naturais e cultivadas de tambaqui

## Avaliação da diversidade genética em populações cultivadas e natural de tambaqui

CLAUDIVANE OLIVEIRA<sup>1</sup>; SORAIA FONTELES<sup>2</sup>; NORMA EVANGELISTA-BARRETO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Estudo em Pesca e Aquicultura- NEPA, Centro de Ciências Agrária Ambientais e Biológicas-CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB. Cruz das Almas-BA, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Ciências Agrária Ambientais e Biológicas-CCAAB, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia/UFRB. Avenida Rui Barbosa, 710, 44380-000, Cruz das Almas-BA, Brasil

### RESUMO

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é a espécie nativa de maior importância na aquicultura nacional. Este estudo avaliou a variabilidade genética de quatro populações de tambaqui usando marcadores ISSR. As amostras foram coletadas de forma aleatória com um total de 140 espécimes oriundos de 2 cultivos provenientes da estatal Bahia Pesca, na Bahia (33 da estação Rodolpho von Ihering, 31 da estação Joanes II); 46 do Centro de Pesquisa em Aquicultura Rodolpho von Ihering pertencente ao DNOCS em Pentecoste-CE e 30 de uma população natural no Estado do Amazonas. Foram utilizados treze *primers* para a análise da diversidade e da estrutura genética. Dos 184 fragmentos produzidos, 157 eram padrões polimórficos. A proporção de loci polimórficos apresentou variação entre os três estoques com menor percentual em Cachoeira-Ba (54,35 %) e maior percentual em Amazonas (79,35 %). Os índices de Heterozigosidade (H) e Shannon (I) foram semelhantes entre os estoques cultivados, havendo um relativo aumento para população natural, os valores mais baixos foram encontrados na estação de Cachoeira-Ba (H = 0,1726 e I = 0,2606), e o maior no Estado do Amazonas (H = 0,2404 e I = 0,3643). Segundo a AMOVA verifica-se que a maior variação está dentro dos estoques 61% do que entre eles 39%. Concluiu-se que as populações cultivadas apresentam variabilidade genética inferior ao da população natural e que para melhor desempenho dos planteis de reprodução informações moleculares devem ser utilizadas para a melhoria no manejo genético destas populações.

**Palavras-Chave:** Aquicultura; *Colossoma macropomum*; Conservação genética; ISSR.

### ABSTRACT

The tambaqui (*Colossoma macropomum*) is the most prominent native species in aquaculture, becoming the natural species commercially cultivated. The genetic variability of four populations of tambaqui was evaluated using ISSR markers. The samples were collected at random with a total of 140 fish; being two fish farm from Bahia Pesca, in Bahia (33 from Rodolpho von Ihering station and 31 from Joanes II station); 46 fish came from the fish farm Rodolpho von Ihering, belonging to DNOCS in Pentecoste-CE and 30 individuals came from a natural population in Amazonas state. Thirteen *primers* were used for analysing the diversity and genetic structure. From the 184 fragments produced, 157 showed polymorphic patterns. The proportion of polymorphic *loci* indicated variation among the three stocks. The lower rates and higher were found in Cachoeira-Ba station (54.35%) and Amazonas (79.35%). The Heterozygosity rates (H) and Shannon index (I) were similar between the cultured stocks, with a relative increase to natural population, the lower values were found in Cachoeira-Ba station (H = 0.1726 and I = 0.2606), and the largest in Amazonas state (H = 0, 2404 e I = 0.3643). The AMOVA demonstrated that the variation was within the 61% stocks than among them 39%. The results suggest that cultured populations present genetic variability below the natural population and to increase the genetic variability of the same molecular information should be used to improve the genetic management of these populations.

**Key words:** aquiculture, *Colossoma macropomum*; Conservational genetic; ISSR.

## Introdução

O tambaqui (*Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) é uma espécie nativa dos rios Amazonas e Orinoco (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998) que tem se destacado na aquicultura nacional. No Brasil, o tambaqui ocupa o segundo lugar na produção, com 136,99 mil toneladas em 2016, representando 27% da produção aquícola (IBGE, 2017). Em contraste com as populações selvagens, os estoques cultiváveis estão aumentando em decorrência da atividade piscícola, isso tem ocorrido devido ao fácil acesso aos alevinos, seu rápido crescimento e o elevado valor comercial (ARAUJO-LIMA e GOMES, 2005; MORAIS e O'SULLIVAN, 2017). A região Norte se destaca na produção de tambaqui (29,5%), enquanto a região Nordeste produziu 14,4% do total produzido nacionalmente (IBGE, 2017).

O monitoramento da variabilidade genética é fundamental em programas de conservação e produção de peixes, pois tende a apresentar resultados satisfatórios (imediatos e de longo prazo) (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2016). Estudos comprovam que a diminuição da variabilidade genética em estoques de pisciculturas ocorre principalmente por manejo reprodutivo inadequado, baixo número efetivo de reprodutores e seleção não intencional (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2008; MORAES NETO *et al.*, 2017). Assim, estudos que comparam a variabilidade genética das populações de peixes estando estes em ambiente natural e cultivado são necessários para entender como as variações nas escolhas de reproduções assistidas, o percentual de sobrevivência e a taxa de crescimento contribuem para alterações na frequência genética e genotípica e se estas alterações melhoram a adaptação dos peixes as variações ambientais (SANTOS *et al.*, 2012).

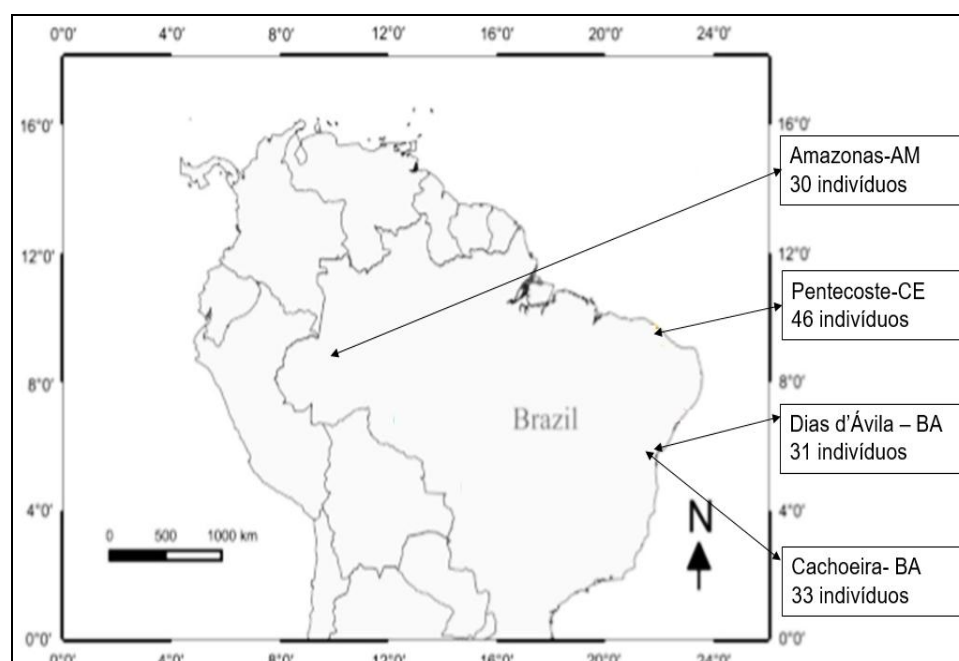
Para Varela *et al.* (2015) a identificação do grau de variabilidade nos plantéis de reprodutores tem sido de relativa importância para se iniciar um programa de melhoramento. Por isso, a correta identificação dos estoques pode servir como ferramenta para o estabelecimento de bases de seleção em programas de melhoramento, sendo utilizada para aumentar a variabilidade genética e explorar positivamente o efeito da heterose (LOPERA- BARREIRO *et al.*, 2015).

A avaliação da diversidade genética é possível e viável com uso de marcadores moleculares, e sua aplicação tem sido de bastante importância na aquicultura e na conservação de estoques naturais com a finalidade de conservação das espécies. Os marcadores de repetição internas de sequência simples (ISSR) são bastante utilizados para esse propósito, pois é de fácil uso, possui alta capacidade de detecção de polimorfismo e sua implementação é de baixo custo (NG e TAN, 2015). Em peixes nativos, o ISSR tem sido utilizado para estudar a diversidade genética intra e interespecífica (FONTELES *et al.*, 2011; VITORINO *et al.*, 2015; QUEIROZ *et al.*, 2016). Também foi aplicado para diferenciação de espécies como tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) e dos seus híbridos (tambacu e tambatinga) (FONTELES *et al.*, 2011).

Dadas as condições atuais da produção de tambaqui em todo território nacional, a pesquisa relacionada ao seu melhoramento genético e manejo reprodutivo em cativeiro tem como fundamental atividade identificar o grau de variabilidade nas pisciculturas e orientar seu manejo. O presente estudo utilizou marcadores moleculares ISSR para avaliar a diversidade genética de populações da espécie *Colossoma macropomum* cultivados em pisciculturas dose Estados do Ceará e Bahia e compará-los com uma população natural do Estado do Amazonas com uso de marcadores moleculares ISSR.

### Material e métodos

As amostras de tecidos (nadadeira caudal) de tambaqui foram obtidas de diferentes pontos amostrais no território nacional e procedentes de populações nativas e cultivadas (Figura 1).



**Figura 1** Localização das populações de tambaqui (*C. macropomum*) estudados do na região norte e Nordeste do Brasil.

Foram avaliados indivíduos de duas pisciculturas baianas, da primeira estação de piscicultura a realizar o confinamento da espécie (Pentecoste-CE) e populações naturais localizadas em regiões isoladas no Estado do Amazonas (Tabela 1).

**Tabela 1** Localização das populações de tambaqui (*C. macropomum*) de acordo com o ambiente e o número de indivíduos amostrados.

População	Ambiente	Número de indivíduos	Coordenadas em graus
Amazonas-AM	Natural	30	6° 35' 5" S, 69° 15' 27" W
Pentecoste-CE	Cultivado	46	3° 49' 58." S, 38° 59' 39" W

Cachoeira-BA	Cultivado	33	12° 34' 46" S, 38° 59' 39" W
Dias d'Ávila-BA	Cultivado	31	12° 39' 59" S, 38° 22' 21" W
Total		140	

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos- LAGOA da Universidade Federal do recôncavo da Bahia – UFRB. A extração de DNA foi realizada com base no protocolo de Fenol:Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989), a quantificação e análise de integridade das amostras foram determinadas via eletroforese em gel de agarose 1%, sendo registrados por meio do sistema de fotodocumentação L-PIX® (Loccus Biotecnologia).

Uma alíquota de 25 µL da amostra diluída foi usada para desencadear as reações de PCR, usando 20-30 ng de DNA, 1X Tris-KCl, 2 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0,46 µmol L<sup>-1</sup> de iniciadores, 0,2 mmol L<sup>-1</sup> de cada dNTP, 1U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, EUA). As condições iniciais de amplificação foram: desnaturação a 94 ° C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 40s a 94 °C, para a seleção de iniciadores ISSR, foram testados 29 *primers* com temperatura de anelamento variando entre 45° C a 65° C durante 50s, alongamento a 72 ° C durante 2 min e alongamento final a 72 ° C durante 10 min. Destes 29 *primers* ISSR, 13 foram escolhidos para estudo por apresentar melhor grau de polimorfismo e maior nitidez dos padrões de bandas (Tabela 2).

O produto gerado pela amplificação dos marcadores ISSR foram separados por meio de gel de agarose 2% sendo este corado com brometo de etídio. Vinte microlitros do produto amplificado foram usados juntamente com 3µL de corante (azul de bromofenol). Cada gel teve em seu primeiro poço o marcador DNA Ladder 100bp como padrão molecular para auxiliar no estabelecimento do tamanho dos fragmentos. A corrida se deu em cuba de eletroforese horizontal e foi realizada em tampão TBE 1X (45 mmol L<sup>-1</sup> Tris e 1 mmol L<sup>-1</sup> EDTA) a 70 volts durante 2 horas. Os padrões de fragmentos separados foram fotodocumentados em transiluminador UV L-PIX® Loccus Biotecnologia analisados via presença (1) e ausência (0) formando a matriz binária.

### Análise dos dados

A partir dos padrões de bandas reprodutíveis do marcador ISSR avaliados para cada um dos genótipos, calculou-se o número total de bandas amplificadas e o número de bandas polimórficas, com os treze *primers* selecionados.

O poder discriminativo dos *primers* foi avaliado por meio de três parâmetros básicos: O conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi calculado pela seguinte fórmula  $PIC = 1 - \sum_j^n p_{ij}^2$ , para expor a eficiência de *primers* utilizados. O MI, uma medida de eficiência global de uma técnica de marcadores moleculares, foi obtido pela multiplicação do PIC médio com a relação multiplexa efetiva (POWELL *et*

*al.*, 1996). A razão multiplex efetiva (EMR) é o produto do número de *locus* polimórficos por iniciador ( $n$ ) e a fração de fragmentos polimórficos ( $\beta$ ).

A matriz de dados de presença (1) /ausência (0) resultante foi analisada no programa POPGENE versão 1.32 (YEH *et al.*, 1997) para estimar o nível de diversidade genética utilizando estatística descritiva para a genética populacional. O programa GENALEX 6.41 (PEAKALL e SMOUSE, 2006) estimou a análise de variância molecular (AMOVA) com base na distância genética entre os pares.

O dendrograma foi construído a partir da distância genética de Nei (1978) com o método par a par de médias ponderadas (UPGMA), com 10000 bootstrapping utilizando MEGA 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013). A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada no programa DARwin 6 (PERRIER e JACQUEMOUD-COLLET, 2006). O critério utilizado para a definição do número de grupos foi calculado com auxílio do pacote "NbClust" (pseudo-t2 ) do programa R (CHARRAD *et al.*, 2014).

## Resultados e discussão

### Marcadores ISSR

Os 13 marcadores ISSR se mostraram polimórficos, tornando-os capazes de gerar informações em relação à variabilidade genética nos estoques estudados. Os *primers* produziram um total de 184 padrões de bandas e destes 157 foram padrões polimórficos ( $p < 0,05$ ). O *primer* ISSR 21 foi o que apresentou maior número de *loci* e o *primer* ISSR 18 apresentou o menor grau de polimorfismo e menor número de *loci* (Tabela 2).

**Tabela 2** *Primers* selecionados para amplificação de DNA em estudo de diversidade genética de tambaqui.

<i>Primer</i>	Sequencia	Ta (°C)	N	Pb	P (%)	PIC	EMR	MI
ISSR 1	(AG)8T	51,8	13	400 - 2100	77	0,53	0,15	0,08
ISSR 3	(GA)8T	54	9	270 - 2050	67	0,52	0,11	0,05
ISSR 8	(GA)8YT	48	10	350 - 1200	30	0,34	0,09	0,34
ISSR 9	(GA)8YC	63	14	200 - 2070	85,7	0,73	0,23	0,16
ISSR 14	(GGAC)3C	49	15	500- 1500	93,3	0,78	0,31	0,25
ISSR15	(GGAC)3T	49	15	350 - 1450	93,3	0,48	0,16	0,07
ISSR 16	(AACC)4	51	15	330 - 2100	100	0,79	0,32	0,27
ISSR 17	(GGAC)4	51	20	290 - 2100	90,1	0,76	0,35	0,26
ISSR 18	(TAGG)4	48	9	800 - 2000	56	0,62	0,12	0,08
ISSR 20	(GACA)4	51	11	600 - 2200	91	0,62	0,15	0,09
ISSR 21	(AAGC)4	51	21	100 - 2200	90,5	0,85	0,56	0,50
	CAT (GGT)3							
ISSR 28	CAT TGT TCC A	48	16	150 - 2100	100	0,42	0,16	0,06
	ACTT (CC)2							
ISSR 29	CAG GTT AAC ACA	48	16	200 -1500	100	0,69	0,23	0,16

Ta: temperatura de anelamento; N: número de bandas; PIC: Conteúdo de Polimorfismo; P(%) percentual de bandas polimórficas; EMR: Razão Multiplex Efetiva; MI: Índice do marcador; RP: poder de resolução.

A eficiência da utilização do marcador ISSR em peixes da bacia amazônica tem sido observada em outros estudos com por exemplo Vitorino *et al.* (2015) que ao estudar 146 espécimes de pirarucu (*Arapaima gigas*) oriundas de ambiente natural descreveram 168 *loci* avaliados 165 foram polimórficos (98,21%) tendo o número total de *loci* amplificados variando entre 28 a 46. O mesmo sendo observado por Queiroz *et al.* (2016) que avaliaram estoque cultivados de tambaqui no Estado do Amazonas e relataram que dos 10 *primers* ISSR selecionados, estes produziram 152 bandas, das quais 146 foram polimórficas.

Segundo Botstein *et al.* (1980), os marcadores são classificados como satisfatórios quando o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) estiver acima de 0,500, valores entre 0,250 a 0,500 fornecem informação em nível mediano e abaixo de 0,250 são pouco informativos. Entre os 13 *primers* utilizados apenas três apresentaram valores inferiores a 0,500 (Tabela 2). Dessa maneira, o ISSR vem a ser um marcador satisfatório para avaliar a variação genética entre populações, especialmente para espécies em que não há informação genética disponível como é o caso das espécies amazônicas como o tambaqui e o pirarucu.

### Diversidade genética nas populações de tambaqui

Na análise de diversidade genética, as duas populações de maior contraste no percentual de *loci* polimórficos (P) e número de alelos ( $n_a$ ) foram Cachoeira-BA (PLP= 54,35 % e  $N_a=1,543$ ) e Manaus-AM (PLP= 79,35 % e  $N_a=1,793$ ) (Tabela 3). A população de Cachoeira-BA se trata de um estoque cativo sem controle reprodutivo e com pequeno número de peixes no estoque fundador enquanto o estoque de Manaus está em seu ambiente natural.

**Tabela 3** Análise de parâmetros de diversidade em quatro estoques de tambaqui provenientes de pisciculturas e ambiente natural usando marcador ISSR.

Estação	$N_a$	$N_e$	H	I	NLP	PLP (%)
DNOCS	1,6141 ( $\sigma \pm 0,4881$ )	1,2900 ( $\sigma \pm 0,3386$ )	0,1772 ( $\sigma \pm 0,1851$ )	0,2732 ( $\sigma \pm 0,2664$ )	113	61,41
Cachoeira-BA	1,5435 ( $\sigma \pm 0,4995$ )	1,2929 ( $\sigma \pm 0,3622$ )	0,1726 ( $\sigma \pm 0,1959$ )	0,2606 ( $\sigma \pm 0,2807$ )	100	54,35
Manaus	1,7935 ( $\sigma \pm 0,4059$ )	1,4140 ( $\sigma \pm 0,3863$ )	0,2404 ( $\sigma \pm 0,1953$ )	0,3643 ( $\sigma \pm 0,2670$ )	146	79,35
Dias d'Ávila-BA	1,6196 ( $\sigma \pm 0,4868$ )	1,2628 ( $\sigma \pm 0,3091$ )	0,1662 ( $\sigma \pm 0,1747$ )	0,2608 ( $\sigma \pm 0,2542$ )	114	61,96



\*Na = número de alelos observados; Ne = número efetivo de alelos; H = diversidade genética de Nei (1973); I = índice de informação de Shannon; NLP=Número de *loci* polimórficos; PLP = Percentual de *loci* polimórficos

Resultados semelhantes também foi descrito por Santos *et al.* (2012; 2016) que observaram valores de proporção polimórfica e número de alelos superior em populações naturais quando comparados a populações cultivadas, expondo que este fator se deve principalmente ao afinamento genético ocasionado pelo confinamento. Possivelmente o mesmo pode ter ocorrido nos estoques cultivados nos Estados da Bahia e Ceará. Acredita-se que este fato se deve a origem dos estoques reprodutores, em razão do baixo número de indivíduos utilizados para estabelecer as primeiras proles cultivadas de tabaqui no início da década de 80 (CALCAGNOTTO e TOLEDO-FILHO 2000) em virtude da falta de reprodutores, acarretando nos dias atuais uma baixa diversidade genética dos estoques.

Com base na frequência alélica, a maior diferença na heterozigosidade genética (H) (Nei, 1973) foi entre as populações do Dias d'Ávila-BA (H= 0,1662) e Manaus-AM (H= 0,2404) (Tabela 3). Jacometo *et al.* (2010) e Queiroz *et al.* (2016) avaliando estoques cultivados de tabaqui com marcador dominante (RAPD e ISSR) descreveram valores que variaram de 0,27 a 0,30 e 0,283 a 0,301, respectivamente. Estas variações podem ser atribuídas aos anos de confinamento do plantel e ao nível de gerenciamento genético dos estoques (QUEIROZ *et al.*, 2016), que inclusive poderia justificar o baixo valor (comparado aos demais) na população do DNOCS (H= 0,1772) que teve sua fundação por volta de 1970 e foi a base para as demais populações cultivadas neste estudo.

O índice de Shannon (I) variou entre os estoques de Cachoeira-BA (0,2606) e Amazonas (0,3643) (Tabela 3). O índice de Shannon pode variar de 0 a 1, e a menor diversidade genética é representada por valores mais próximos de zero. Os baixos valores do índice de Shannon encontrados no sugerem que as populações estudadas foram possivelmente influenciadas pelo efeito do fundador acarretando a baixa variabilidade genética.

Ribeiro *et al.* (2016) analisaram valores entre 0,313 a 0,382 em estoques cultivado de tabaqui no Estado de Rondônia considerando estes com baixa variabilidade genética. Em contraposição, Lopera-Barrero *et al.* (2014) ao analisarem com marcadores microssatélites a diversidade genética de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) obtiveram valores do índice de Shannon entre 0,927 e 0,937, considerando os reprodutores com adequada variabilidade genética. Neste caso, o plantel de reprodutores foi formado com uso de um número grande de reprodutores, o que propiciou a conservação de um adequado perfil genético, não sendo influenciado pelo efeito fundador e conseqüentemente o "gargalo genético".

As taxas de variabilidade genética, calculadas pelo índice de Shannon (I) juntamente com a porcentagem de *locus* polimórficos (PLP%) mostraram que houve moderada variabilidade intra-populacional no que diz respeito a população natural de Manaus e baixa variabilidade genética nas demais populações.

A razão da diversidade gênica interpopulacional esperada pela diversidade gênica total é definida por Nei (1973) como o índice de diferenciação genética ( $G_{ST}$ ). Neste estudo a média da diferenciação gênica ( $G_{ST}$ ) resultou em 0,2814, sugerindo que a variabilidade entre as populações foi de 28,14% e dentro das populações 71,86% (Tabela 4), indicando uma maior variação dentro dos estoques.

**Tabela 4** Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para as populações de tabaqui (*C. macropomum*) provenientes de pisciculturas e ambiente natural.

	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$	$N_m$
Total	0,2814 ( $\sigma \pm 0,0255$ )	0,1891 ( $\sigma \pm 0,0132$ )	0,3280	1,0244

\* $H_T$  = diversidade total;  $H_S$  = diversidade esperada;  $G_{ST}$  = diferenciação populacional;  $N_m$  = estimativa do fluxo gênico.

O número de migrantes nas populações ou fluxo gênico ( $N_m$ ) resultou em 1,0244 (Tabela 4). Este valor é inferior ao encontrado na literatura para populações de tabaqui, sejam estas provenientes de ambiente natural ou cultivado. Valores de  $N_m$  inferiores a 2,0 foram descritos por Vitorino *et al.* (2015) ao analisarem populações de *Arapaima gigas* no rio Tocantins Araguaia (região amazônica) (0,188 a 1,246) e Lopera-Barero *et al.* (2016) ao analisarem populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê em São Paulo (1,2 a 4,2). Neste último, os autores justificam que a barreira geográfica (diferentes rios) e a barreira física artificial (barragens) influenciaram na presença de mecanismos de fragmentação e estruturação das populações levando-as a baixa diversidade genética. Um mecanismo similar acontece nas estações de cultivo onde não há renovação parcial de plantel ou troca genética entre as pisciculturas impedindo o fluxo de genes entre as populações.

A ausência de fluxo gênico entre as populações e a possibilidade de possuir endogamia, principalmente em populações cultivadas, tem promovido o interesse em estudos de monitoramento genético. Este deve ser realizado tanto em pisciculturas, por meio de práticas de manejo e conservação da diversidade genética, quanto em populações nativas, que podem estar sofrendo com os impactos ocasionados pela sobre-exploração e outras ações antrópicas.

### Estruturação genética

As medidas para a comparação de identidade genética de Nei (1972) variaram de 0,7851 a 0,9256 e de distância genética foi de 0,0773 a 0,2419 (Tabela 5). O valor máximo estimado da identidade genética ocorreu entre as populações de Cachoeira-BA e DNOCS-CE (0,9256), e o valor mínimo estimado ocorreu entre as populações de Dias d'Ávila-BA e DNOCS (0,7851). Em contrapartida, o valor máximo observado da distância genética está entre as populações da DNOCS-CE e Dias d'Ávila-BA (0,2419) e o valor mínimo entre as populações DNOCS-CE e Cachoeira-BA (0,0773) (Tabela 5).

**Tabela 5** Mensuração da Identidade genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as quatro populações de tabaqui.

Estoques	DNOCS	Cachoeira	Manaus	Dias d'Ávila
DNOCS	****	0,9256	0,8580	0,7851
Cachoeira	0,0773	****	0,8727	0,8218
Manaus	0,1532	0,1362	****	0,8297
Dias d'Ávila	0,2419	0,1963	0,1867	****

Santos *et al.* (2012) ao compararem populações de tabaqui cativas e nativas, encontraram valores similares para identidade e distância genética, obtendo maior identidade na população cultivada em Itacoatiara-AM e em ambiente natural (1,000), e maior distância genética entre Jaboticabal-SP e Itacoatiara-AM (0,038). O alto grau de identidade entre Jaboticabal-SP e Pentecoste-CE (DNOCS) (0,991) é justificado pelos autores pelo fato que a primeira obteve em seu plantel fundador espécimes oriundos de Pentecoste. O mesmo fato pode ser observado no presente estudo no que diz respeito a relação entre as estações de Cachoeira-BA e DNOCS-CE, uma vez que este foi o principal disseminador desta espécie no território brasileiro.

A AMOVA foi realizada considerando a distribuição da variabilidade genética nos estoques originais e demonstrou que esta se encontra maior dentro dos estoques do que entre eles (Tabela 6). Ao fazer a discriminação entre estoques cultivados e nativo (formação de 2 grupos inferiores), a AMOVA apresentou variação genética intra e intergrupar de 80 e 20%, respectivamente (Tabela 6).

Os resultados concordam com os relatados por Queiroz *et al.* (2016), que encontraram alta variabilidade genética em linhagens cultivadas de tabaqui no Norte do Brasil, mas com baixa diferenciação intergrupos (29%). A endogamia é uma das principais causas de redução da variabilidade e diferenciação genética entre indivíduos e populações de cultivo como também pode ser observado neste estudo.

**Tabela 6** Análise de Variância Molecular-AMOVA em estoque nativo e estoques cultivados de tabaqui.

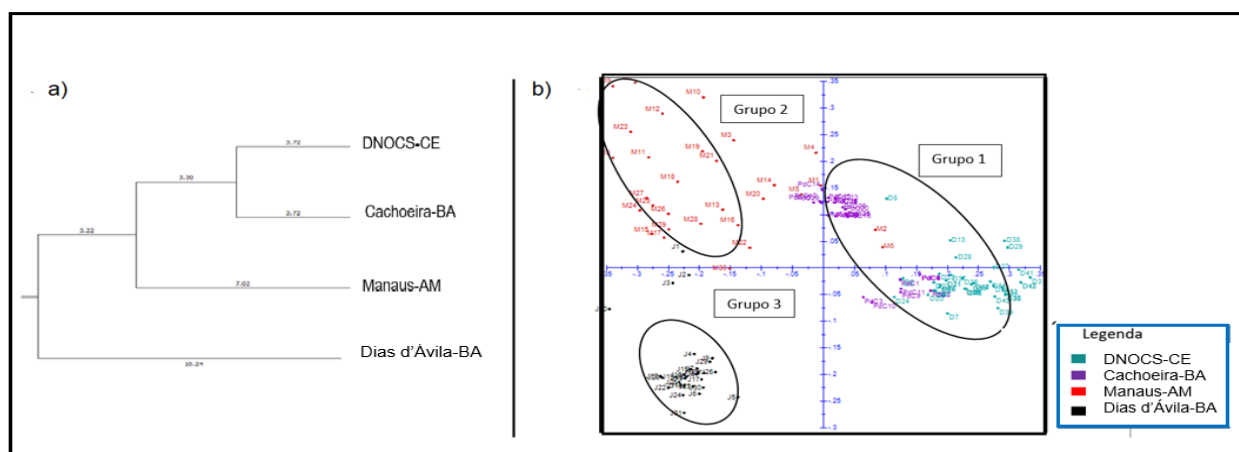
Fonte de variação	GL	SMQ	MS	EV	V%	F <sub>ST</sub>
Entre populações	3	1297,03	432,3	11,94	39	
Dentro das populações	136	1297,03	18,937	18,93	61	0,444
PhiPT = 0,387, P < 0.01						
Entre grupo	1	327,34	327,34	6,39	20	
Dentro dos grupos	138	3545,18	25,69	25,69	80	0,4218
PhiPT = 0,199, P < 0.001						

Graus de Liberdade (GL), soma de quadrados (SMQ), média de quadrados observados (MS) Estimativa de variação (EV), porcentagem de variação (V%) e Índice de Fixação (F<sub>ST</sub>), PhiPT: proporção de variância genética total entre indivíduos dentro das populações.

Os valores do índice de fixação encontrados nas populações foram de 0,4444 entre todas as populações e 0,4218 ao relacionar a população nativa e todas as populações cultivadas. Ambos os valores são similares aos estudos de estoques de tabaqui cultivado em todo país (LOPES *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2016; RIBEIRO *et al.*, 2016). Os índices de fixação são utilizados como indicadores da diferenciação genética entre populações. Wright (1978) descreveu que valores de  $F_{ST}$  acima de 0,25 representam uma diferenciação muito alta entre as populações, ficando evidente, portanto, que as populações estudadas apresentam uma alta diferenciação entre elas.

Os valores do índice de fixação  $F_{ST}$  variam entre 0 e 1 (Wright 1978). O valor 0 indica a ausência de estruturação ou subdivisão da população, ou em outras palavras, panmixis completos. O valor 1 implica que toda variação genética é explicada pela estrutura da população, condicionada principalmente pela existência de barreiras ao fluxo gênico (geográfico, troca entre material genético, renovação dos plantéis, etc.) e, portanto, que as populações examinadas não compartilham qualquer diversidade genética.

Pela formação do dendrograma (Figura 2a) torna-se perceptível a distinção da população de Dias d'Ávila-BA para as demais. Observa-se a similaridade entre as populações de Cachoeira-BA e DNOCS-CE. A população nativa de Amazonas se apresenta mais próxima de Cachoeira-BA e DNOCS-CE e que de Dias d'Ávila-BA, possivelmente pelo fato de que o estoque fundador dessas duas primeiras populações foi procedente do mesmo local e não se tem informações da origem dos espécimes utilizados para a renovação da população de Dias d'Ávila o que pode ter acarretado a ausência das populações no mesmo clado.



**Figura 2a)** Dendrograma gerado pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method, arithmetic mean*) tabaqui baseado na distância genética de Nei (1972). **b)** Análise de Coordenadas Principais (PCoA) e análise estrutural de 4 populações de tabaqui oriundos de ambiente natural e pisciculturas.

A Análise das Coordenadas Principais (PCoA) permitiu a identificação de grupos com relações genéticas estreitas. Houve a formação de três grupos, sendo o

primeiro grupo composto pela população do DNOCS-CE e Cachoeira-BA, o segundo grupo é formado pelos indivíduos de ambiente natural do rio Juruá no Estado do Amazonas e o terceiro grupo pela estação Dias d'Ávila-BA (Figura 2b).

É importante enfatizar que a população de Cachoeira-BA teve seu plantel fundador oriundo da população DNOCS, Pentecostes-CE. O tempo de isolamento, redução do tamanho da população e fragmentação da mesma, poderá alterar o fluxo gênico entre as populações, tornando-as mais susceptíveis aos processos de deriva genética e endogamia e conseqüentemente perda de variabilidade genética entre e dentro de plantéis cativos (GALETTI *et al.*, 2008). Em Dias d'Ávila-BA o estoque fundador também foi procedente do DNOCS-CE, entretanto esse plantel foi renovado, sendo introduzidos indivíduos de ambiente natural para o estoque reprodutor. Segundo Santos *et al.* (2016) o uso espécimes oriundos de populações selvagens para renovação de estoques cultivados, representaria um aumento no número de alelos da população, contribuindo para a melhoria da diversidade genética das populações.

A perda da variabilidade genética apresentada em populações de cativeiro está diretamente relacionada ao tamanho efetivo dos estoques reprodutivos, ao grau de parentesco entre os indivíduos destes estoques e ao endocruzamento. Esses fatores tendem a acarretar endogamia ao longo das gerações (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2014). Assim, o tempo de isolamento dessas populações (número de gerações desde o início do estoque) contribui para a perda de heterozigidade.

A introdução de novos reprodutores de diferentes populações naturais ou cultivadas é geralmente empregada por criadores para aumentar a variabilidade genética em estoques reprodutores (LOPERA-BARRERO *et al.*, 2008). Mais recentemente a utilização de sêmem criopreservado também tem sido adotada para auxílio na renovação dos plantéis (MARTÍNEZ-PÁRAMO *et al.*, 2017).

Assim, procedimentos de manejo como escolha efetiva dos reprodutores, a marcação dos espécimes com chip de identificação e o acompanhamento do histórico reprodutivo devem ser realizados para evitar o acasalamento consanguíneo que acarretaria processos de endogamia. Estas técnicas que devem ser adotadas em todas as pisciculturas onde se planeja conservar e melhorar a variabilidade genética

## **Conclusões**

Os marcadores ISSR se mostraram eficientes na avaliação da diversidade genética em populações cativas e nativa de tambaqui .

A população de DNOCS-CE e Cachoeira-BA apresentaram perda de variabilidade genética, o que requer a reposição ou renovação em seu estoque reprodutor. A população de Dias d'Ávila-BA por ter tido seu estoque renovado, apresentou maior grau de polimorfismo que as demais populações cultivadas, demonstrando que uma renovação eficiente do plantel reprodutor proporciona melhoria genética do mesmo. Entre as populações estudadas, a população natural apresentou maior variabilidade genética.

A renovação do plantel de reprodutores e a adoção do manejo de criação torna-se altamente recomendado quando se planeja a melhoria genética das pisciculturas estudadas. Utilização de reproduções assistidas com uso de sêmen criopreservado, objetivando a melhoria genética das populações estudadas, resultaria na inclusão de indivíduos que são divergentes geneticamente, e tornaria viável o repovoamento e a renovação destas populações.

### Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. Paulo Reis, Sr. Felipe Vieira, Sr Aldeney Andrade e a Sra. Socorro Chacon de Mesquita, por sua assistência ao possibilitar a coleta das amostras biológicas de tambaqui. O apoio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). Ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal PPGCA e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por permitir o desenvolvimento desta pesquisa.

### Referências

- AGUIAR, J. P.; FAZZI-GOMES, P. F.; HAMOY, I. G.; SANTOS, S. E. B.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. 2018. Loss of genetic variability in the captive stocks of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), at breeding centres in Brazil, and their divergence from wild populations. *Aquaculture Research*, 1-12.
- ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. e GOMES, L. C. 2005. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
- ARAUJO-LIMA, C.; GOULDING, M. 1998. Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé, AM: Sociedade Civil Mamirauá Brasília, distrito Federal, Brasil.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *The American Journal of Human Genetics*, v.32, n.2, p.314-331.
- CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S.A. 2000. Loss of genetic variability at the transferrin *locus* in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genet. Mol. Biol.*, 23:1:127-130.
- CHARRAD, N; GHAZZALI N; BOITEAU, V; NIKNAFS, A. NbClust: NbClust package for determining the best number of clusters. R package version 2.0.1. Disponível em: <http://CRAN.Rproject.org/package=NbClust>. 2014. Acesso em 14. jan. 2018.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- EXCOFFIER L. 2001. Analysis of population subdivision. In: Balding DJ, Bishop M, Cannings C, ed. *Handbook of Statistical Genetics*. Chichester: Wiley, p 271–307
- FONTELES S.B.A.; FERNANDES, F.M.C. e TOLEDO, L.F.A. 2011. ISSR patterns in *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* and in their inter-specific hybrids. *Magistra* 23:82-86.
- GALETTI JR, P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A.; MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L.

- I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F., SICILIANO, S., DEL LAMA, S. N., FREITAS, T. R.O., HRBEK, T., MOLINA, W. F. 2008. Genética da conservação brasileira. p.244-274. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. 290p.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- NACIONAL[IBGE]. 2017. Produção da pecuária municipal. Volume 44. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- JACOMETO, C.B.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P; GOMES, P.G.; POVH, J.A.; STREIT-JUNIOR, D.P.; VARGAS; RESENDE, L. 2010. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 481-487.
- LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; MANGOLIN, C.A.; BOSO, K.M.O.; GUALDA, T. 2008. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. Bioscience Journal, 24:86-93.
- LOPERA-BARRERO, N. M.; REYES ALVAREZ, C. A.; RODRIGUEZ RODRIGUEZ, M. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JUNIOR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. 2014. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. Semina Ciências Agrárias 35:541-554.
- LOPERA-BARRERO, N. M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ M. P.; FORNARI D. C; RESENDE, K.; POVEDA-PARRA, A. G; BRACCINI, G; SOUZA, F. P; FURLAN, P. J.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R.P. 2015. Genetic variability of broodstocks of Tambaqui (Teleostei – Characidae) from the northeast region of Brazil.Semina: Ciências Agrárias. 36: 4013-402.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; SANTOS, S. C. A.; GOES, E.S.R.; CASTRO, P.L.; SOUZA, F. P.; POVEDA-PARRA, A. R ; CASSETA,J.; PONTILLO, B.G.; RIBEIRO, R.P. 2016. Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, 68:6:1621-162.
- LOPES, T. S.; STREIT JUNIOR, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J. R. 2009. Diversidade genética de reprodutores de *Colossoma macropomum*. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 61:728-735.
- MARTÍNEZ-PÁRAMOA, S.; HORVÁTHB, A.; LABBÉC, C.; ZHANGD, T.; ROBLESE, V.; HERRÁEZF, P.; SUQUETG, M.; ADAMSH, S.; VIVEIROSJ, A.; TIERSCHK, T. R.; CABRITA, E. 2017 Cryobanking of aquatic species. Aquaculture. 1: 472: 156–177
- MORAES NETO, A.; AYRES, D.R.; STREIT-JUNIOR, D.P.; LOPERA-BARRERO, N.R.; FERRAZ, P.B.; CORRÊA- FILHO, R.A.C.; BIGNARDI, A, B.; MARCIANO, C.M.M; MURARI, C.J. F.; POVH, J.A. 2017. Genetic diversity of tambaqui broodstocks in stock enhancement program. Semina: Ciências Agrárias,. 38:3:1665-1670.
- MORAIS, I. S.; O’SULLIVAN, F.L.A. 2017. Biologia, habitat e cultivo do tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1816). Scientia Amazonia, 6:1: 81-93.
- NEI, M. (1972). Genetic distance between popilations. American Naturalist 106: 283-92.
- NEI, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Scienses 70: 3321-3323.
- NEI, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, Bethesd 89:583-590.
- NG, W.L.; TAN, S.G.2015. Inter- Simple Sequence Repeat (ISSR) Marker: are re doing it right? ASM Science Journal 9: 30-39.

- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. 2006. GenAEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology. Notes* 6: 288-295.
- PERRIER X., JACQUEMOUD-COLLET J.P. 2006. DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>.
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRÉ C., HANAFEY M., J. VOGEL, TINGEY S., RAFALSKI A. 1996. A comparação de marcadores RFLP, RAPD, AFLP e SSR (microssatélites) para análise de germoplasma. *Molecular Procriar*. 2 : 225–238
- QUEIROZ C. A.; SOUSA, N. R.; SILVA G.F.; INOUE, L. A. K. A. 2016. Impacts of stocking on the genetic diversity of *Colossoma macropomum* in central Amazon, Brazil. *Genet Molecular Research* 15: 1-9.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2011. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 13 novembro 2017.
- RIBEIRO, R.P.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. L.; RESENDE, E. K.; SOUZA, F. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M. 2016. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservatio. *Semina: Ciências Agrárias*, 37: 2375-2386.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A laboratory manual* cold spring harbor: cold spring harbor laboratory press, Nova York, Estados Unidos.
- SANTOS C. H. A.; SANTANA, G. S; LEITÃO, M.A.B.; PAULA-SILVA. M. N.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2016. Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. *Stichting International Foundation for Animal Genetics*, 47:373–376
- SANTOS, C.H.A.; LEITÃO, M.A.B.L.; SOUSA, C.F.S.; SANTANA, GX.; ALMEIDA-VAL, V.M.F . 2012. Genetic variability of wild and captivity populations of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) .*Acta Scientiarum. Biological Sciences*,34: 2: 191-197.
- TAMURA, K., STECHER, G.; PETERSON, D.; KUMAR, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 32.
- VARELA, E. S.; ALVES, A.L.; TARDIVO, T.F. 2015. Parentesco genético em reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) baseado em marcadores de DNA: perspectivas de manejo genético na ausência de pedigree. *Embrapa Pesca e Aquicultura*. Palmas, Tocantins, Brasil.
- VITORINO, C. A.; OLIVEIRA, R. C. C.; MARGARIDO, V. P. E.; VENERE, P, C. 2015. Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. *Neotropical Ichthyology* 13: 557-568.
- WRIGTH, S 1978. *Variability within and among natural populations*. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, Estados Unidos.
- YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belg. J. Bot. Brussels* 129: 157.



## **CAPITULO 2 – Artigo 2**

Artigo submetido ou a ser submetido ao Periódico Journal Of Agricultural Science, Qualis A2 na Área Zootecnia/Recursos Pesqueiros

Efeitos do confinamento na variabilidade genética de populações de  
tambaqui cultivados no Nordeste do Brasil

## Efeitos do confinamento na variabilidade genética de populações de tambaqui cultivados no Nordeste do Brasil

Effects of confinement on genetic variability of populations of tambaqui grown in northeastern Brazil

Claudivane de S. T. Oliveira<sup>1</sup>, Soraia B. A. Fonteles<sup>1</sup>; Norma S. Evangelista-Barreto <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, Brasil, <sup>2</sup>Laboratório de Microbiologia de Alimentos e Ambiental, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, Brasil.

### Resumo

O tambaqui (*Colossoma macropomum*) é uma espécie nativa da região amazônica brasileira que mais tem se destacado no setor aquícola nacional. O monitoramento genético de estoques reprodutores cultivados de tambaqui têm aumentado nos últimos anos, pois esta diretamente ligado ao gerenciamento e melhora de produção e conservação do material genético desta espécie. A variabilidade genética em três populações de tambaqui cultivados em dois Estados do Nordeste do Brasil foi avaliada usando marcadores moleculares ISSR. As amostras foram coletadas de forma aleatória com um total de 110 peixes; sendo estes de 2 cultivos da estatal Bahia Pesca, na Bahia (33 espécimes da estação Rodolpho von Ihering em Cachoeira-BA e 31 da estação Joanes II em Dias d'Ávila-BA) e 46 espécimes estação de piscicultura do DNOCS em Pentecoste-CE. Foram utilizados 13 *primers* ISSR para a análise da diversidade e estrutura genética. Dos 193 *loci* obtidos, 170 eram polimórficos ( $p < 0,05$ ). As taxas de polimorfismo variaram entre as pisciculturas em Cachoeira (54,55%) e Dias d'Ávila (61,96%). Os índices de Heterozigosidade (H) variaram entre 0,1662 e 0,1772 e o Índice de Shannon (I) 0,2606 a 0,2732 não apresentando elevada diferença entre as populações. A análise da estrutura genética por meio da Análise de Coordenadas Principais (PCoA) mostrou que há baixa miscigenação entre as populações, havendo maior variação entre as populações que dentro destas. Os resultados sugerem que a informação acerca das características genética dos estoques aliado com manejo apropriado dos exemplares devem ser utilizadas como subsídios para aumentar a variabilidade genética do estoque promovendo cruzamentos previamente delineados.

**Palavras Chave:** Aquicultura, *Colossoma macropomum*; Diversidade genética.

### Abstract

Tambaqui (*Colossoma macropomum*) is native species of the Brazilian Amazon region that has been most prominent in the national aquaculture sector. Genetic monitoring of cultivated stocks of tambaqui has increased in recent years, since this directly linked to the management and improvement of production and preservation of genetic material of this species. The genetic variability of three tambaqui populations was evaluated using ISSR molecular markers. The 110 fish samples were collected at randomly, being two from Bahia Pesca State in Bahia (33 from Rodolpho von Ihering station; 31 from Joanes II station) and 46 from DNOCS station in Pentecoste-CE. Thirteen primers were used for the analysis of diversity and genetic structure. Of the 193 and 170 were polymorphic loci ( $p < 0.05$ ). The polymorphism rates ranged from waterfall (54.55%) and Dias d ' Ávila (61.96%). The Heterozygosity rates (H) varied between 0.1662 and 0.1772 and Shannon index (I) 0.2606 showing no difference between 0.2732 stocks. After the analysis of the genetic structure by Main Coordinates analysis (PCoA) showed a low miscegenation between stocks, with greater variation among the stocks within these. The results suggest that the information about the genetic characteristics of the stocks allied with the appropriate management of the

samples should be used as subsidies to increase the genetic variability of the stock producing previously delineated crosses.

**Keyword:** Aquaculture, *Colossoma macropomum*; Genetic diversity

## 1. Introdução

No Brasil, o cenário aquícola tem apresentado um crescimento promissor com a produção total da piscicultura alcançando 507,12 mil toneladas em 2016, representando um aumento de 4,4% em relação ao ano anterior (FAO, 2016; IBGE, 2017). No ano de 2016 registrou-se uma queda de produção no Nordeste (-7,8%) com participação pouco relevante na produção nacional (15,7%) (IBGE, 2017). Este fato se deve possivelmente pela ocorrência de problemas enfrentados na região, como as secas prolongadas. Entretanto esta região possui recursos hídricos bastantes favoráveis às práticas aquícolas e deve receber incentivos a fim de aumentar ainda mais a produção de peixes nacionalmente (VIDAL, 2016).

O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1816), é uma espécie nativa dos rios Amazonas e Orinoco (ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1998). No Nordeste, o primeiro cultivo de tambaqui foi realizado por volta de 1970, com peixes oriundos de algumas matrizes selvagens (AGUIAR *et al.*, 2018). Há grande possibilidade que este estoque tenha sido fundado com um número de indivíduos insuficientes para refletir a verdadeira composição genética das populações de origem (CALCAGNOTTO e TOLEDO-FILHO, 2000; AGUIAR *et al.*, 2018).

Estudar a variabilidade genética em locais que trabalham com a distribuição de alevinos é primordial, pois pesquisas indicaram que o estoque com baixa variabilidade genética ao longo das gerações pode induzir endogamia, reduzir a adaptabilidade, sobrevivência de progênes e perdas de potencial genético (MOREIRA *et al.*, 2007; POVH *et al.*, 2008; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2016). Esses fatores acarretam perda de produtividade nas pisciculturas.

Em decorrência do importante papel que o tambaqui vem ocupando no cenário aquícola nacional e dado o aumento em seu consumo e produção nas últimas décadas, avaliar a variabilidade genética de populações de tambaqui torna-se importante para o gerenciamento, estabelecimento e manutenção dos planteis para melhorias em programas de conservação e manutenção dos estoques (JACOMETO *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012; LOPERA-BARRERO *et al.*, 2016) especialmente em unidades de distribuição de alevinos que disseminam essa espécie por grande parte da região Nordeste.

A avaliação da variabilidade genética em espécies aquáticas é possível e viável com uso de marcadores moleculares, e sua aplicação tem aumentado cada dia, seja para conservação das mesmas ou no enfoque de melhoramento genético (JACOMETO *et al.*, 2010; VITORINO *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2016)

Assim, o presente estudo utilizando marcadores moleculares ISSR, buscou avaliar a diversidade genética em populações da espécie tambaqui cultivados em três pisciculturas dos Estados do Ceará e Bahia.

## 2. Material e Métodos

Foram coletados 46 indivíduos na estação de piscicultura Rodolpho von Ihering do Departamento Nacional de Obras Contra Secas-DNOCS, localizada em Pentecoste-CE (primeira piscicultura a realizar o confinamento do tambaqui com fins aquícolas), 64 foram coletados da estatal Bahia Pesca S/A, sendo 33 da piscicultura Rodolpho von Ihering em Cachoeira-BA e 31 da estação Joanes II em Dias d'Ávila-BA (Figura 1). A escolha destes cultivos ocorreu em virtude da responsabilidade que possuem na distribuição de alevinos (via doação ou venda), tendo assim um papel de suma importância para a aquicultura na região Nordeste do Brasil.

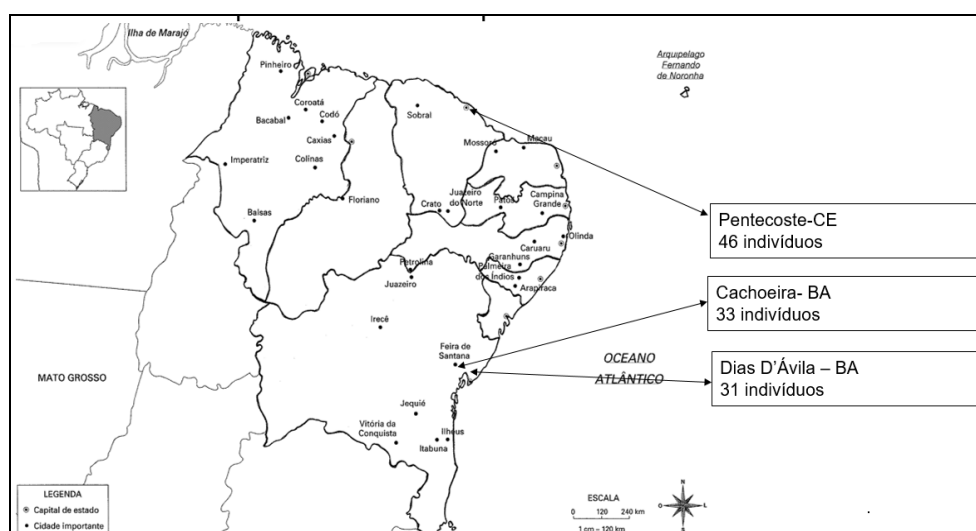


Figura 1. Localização geográfica dos estoques de tambaqui e número de indivíduos amostrados.

O material biológico amostrado foi obtido da região da nadadeira caudal, tecido considerado de baixo risco (não causam danos ao animal) e conservado em tubo tipo eppendorf contendo etanol absoluto (99,5%). As amostras foram levadas ao Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos – LAGOA, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB e armazenadas sob refrigeração para extração de DNA genômico.

## 2.1 Extração de DNA

As extrações de DNA foram realizadas segundo protocolo de Fenol-Clorofórmio (SAMBROOK *et al.*, 1989). Após extração, a integridade do DNA foi verificada em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% corado por brometo de etídio ( $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) a 70 volts por 60 min, em solução tampão TBE 1X ( $500 \text{ mmol L}^{-1}$  Tris-HCl,  $60 \text{ mmol L}^{-1}$  de ácido bórico,  $83 \text{ mmol L}^{-1}$  EDTA) sendo registrados por meio do sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus Biotecnologia) ® para medir a concentração e qualidade dos fragmentos e para verificar a integridade do material genético extraído.

## 2.2 Amplificação dos marcadores ISSR

As reações de PCR foram realizadas em alíquotas de 25  $\mu\text{L}$  da amostra diluída, usando 20-30 ng de DNA, 1X Tris-KCl, 2  $\text{mmol L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 0,46  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de iniciadores, 0,2  $\text{mmol L}^{-1}$  de cada dNTP, 1U de Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen®, Carlsbad, EUA). As condições iniciais de amplificação foram: desnaturação a 94 ° C durante 4 min, seguido por 35 ciclos de 40s a 94 ° C. Para a seleção de iniciadores de ISSR, utilizaram-se 29 *primers* com temperatura de anelamento variando entre 45°C a 65°C durante 1 min, alongamento a 72°C durante 2 min e alongamento final a 72°C durante 10 min. Dentre os 29 *primers* ISSR testados, foram escolhidos aqueles que apresentaram melhor grau de polimorfismo e maior nitidez dos padrões de bandas.

O produto gerado pela amplificação dos marcadores ISSR foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose 2% sendo este corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Foram utilizados 20  $\mu\text{L}$  do produto amplificado juntamente com 3 $\mu\text{L}$  de corante azul de bromofenol (0,03% xileno cianol, 60% glicerol, 60mM EDTA). Cada gel teve em seu primeiro poço o marcador DNA Ladder 100bp como padrão molecular para auxiliar a estabelecer o tamanho das bandas. A corrida se deu em cuba de eletroforese horizontal, preenchida com tampão TBE 1X (45  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris e 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA) a 70 volts durante 2 horas. Os padrões de bandas separados via eletroforese foram fotodocumentados em transiluminador UV L-PIX (Loccus Biotecnologia) ®, esse material foi analisado sendo registrado a presença (1) e ausência (0) das mesmas no produto amplificado.

### 2.3 Análise dos dados

A partir dos padrões de bandas reprodutíveis gerados pelos *primers*, calculou-se o número total de bandas amplificadas e o número de bandas polimórficas. O poder discriminativo dos *primers* foi avaliado por meio de parâmetros básicos: O conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi calculado pela fórmula  $\text{PIC} = 1 - \sum_j^n P_{ij}^2 = {}_1P_{ij}^2$ , para expor a eficiência de *primers* utilizados. O MI, uma medida de eficiência global de uma técnica de marcadores moleculares, foi obtido pela multiplicação do PIC médio com a relação Multiplexa Efetiva (POWELL *et al.*, 1996). A razão multiplex efetiva (EMR) é o produto do número de *locus* polimórficos por iniciador (n) e a fração de fragmentos polimórficos ( $\beta$ ).

A matriz de dados de presença (1) /ausência (0) resultante da leitura dos padrões de bandas de cada iniciador foi encaminhada para análise no programa POPGENE versão 1.32 (YEH *et al.*, 1997) para estimar o nível de diversidade genética através de parâmetros da genética de populações.

O dendrograma foi construído a partir da distância genética de Nei (1978) com o método par a par de médias ponderadas (UPGMA), com 10000 permutações de bootstrap utilizando o programa MEGA 6.06 (TAMURA *et al.*, 2013).

A análise de variância molecular (AMOVA; EXCOFFIER *et al.*, 1992) foi realizada pelo programa ARLEQUIN 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2005), para avaliar a variação significativa entre e dentro das populações dos reprodutores. A análise de coordenadas principais (PCoA) foi realizada no programa DARwin 6 (PERRIER e JACQUEMOUD-COLLET, 2006). O critério utilizado para a definição do número de

grupos foi calculado com auxílio do pacote “NbClust” (pseudo- $t^2$ ) do programa R (CHARRAD *et al.*, 2014)

### 3. Resultados e Discussão

#### 3.1 Marcadores ISSR

Dos 13 *primers* selecionados foram obtidos 193 *loci* e destes 170 foram polimórficos ( $p < 0,05$ ). O *primer* ISSR 17 apresentou maior número de *loci* apresentando 80% de polimorfismo, em contraposição o *primer* ISSR 18 apresentou o menor número de *loci* sendo este 100% polimórfico (Tabela 1).

**Tabela 1** *Primers* selecionados para amplificação de DNA no estudo de diversidade genética de tambaqui em três estações de piscicultura no Nordeste do Brasil.

Primer	Sequência	Ta (°C)	Pb	N	EMR	IM	PIC	P (%)
ISSR 1	(AG)8T	51,8	400 - 2100	13	0,23	0,10	0,45	62
ISSR 3	(GA)8T	54	270 - 2050	9	0,11	0,04	0,37	67
ISSR 8	(GA)8YT	48	350 - 1200	10	0,11	0,03	0,28	90
ISSR 9	(GA)8YC	63	200 - 2070	14	0,27	0,18	0,67	100
ISSR 14	(GGAC)3C	49	500- 1500	14	0,32	0,42	0,73	78,6
ISSR15	(GGAC)3T	49	350 - 1450	14	0,17	0,63	0,37	100
ISSR 16	(AACC)4	51	330 - 2100	15	0,33	0,25	0,75	93,3
ISSR 17	(GGAC)4	51	290 - 2100	20	0,45	0,34	0,75	80
ISSR 18	(TAGG)4	48	800 - 2000	8	0,09	0,04	0,43	100
ISSR 20	(GACA)4	51	600 - 2200	11	0,17	0,09	0,54	100
ISSR 21	(AAGC)4	51	100 – 2200	17	0,48	0,39	0,81	76,4
ISSR 28	CAT (GGT)3 CAT TGT TCC A	48	150 - 2100	16	0,20	0,07	0,38	93,7
ISSR 29	ACTT (CC)2 CAG GTT AAC ACA	48	200 -1500	15	0,32	0,25	0,788	93,3

Ta: temperatura de anelamento; PB: gama dos fragmentos amplificados; N: número de bandas; EMR: Razão Multiplex Efetiva; MI: Índice do marcador; PIC: Conteúdo de Polimorfismo; P(%) percentual de bandas polimórficas.

O uso de marcador ISSR tem sido registrado em estudos de peixes neotropicais, Vitorino *et al.* (2015) estudando populações naturais de *Arapaima gigas* descreveram a ocorrência de 168 *loci*, dos quais 165 foram polimórficos. Queiroz *et al.* (2016) examinando populações cultivadas de *C. macropomum* obtiveram 152 *loci* dos quais 146 foram polimórficos. Demonstrando que esse marcador por apresentar um alto grau de polimorfismo tem se mostrado eficiente em análises genéticas para populações de peixes.

### 3.2 Diversidade e estruturação genética das populações

A variação entre as três populações de *C. macropomum* foi analisada por observação direta das estimativas de polimorfismos. Conforme a Tabela 2, os dois estoques mais contrastantes em termos de percentual de *loci* polimórficos (%) e número de alelos ( $N_a$ ) foram os estoques de Cachoeira ( $P= 54,55\%$  e  $N_a=1,5455$ ) e Dias D'Ávila ( $P= 67,68\%$  e  $N_a=11,6768$ ).

**Tabela 2** Parâmetros de diversidade: número de alelos observados, número efetivo de alelos, diversidade genética de Nei (1973), índice de informação de Shannon, número de *loci* polimórfico e percentual de *loci* polimórficos em três estoques de tambaqui via marcadores ISSR.

Estação	$N_a$	$N_e$	H	I	NLP	PLP
Pentecoste-CE	1,6141 ( $\sigma\pm 0,4881$ )	1,2900 ( $\sigma\pm 0,3386$ )	0,1772 ( $\sigma\pm 0,1851$ )	0,2732 ( $\sigma\pm 0,2664$ )	113	61,41%
Cachoeira-BA	1,5435 ( $\sigma\pm 0,4995$ )	1,2929 ( $\sigma\pm 0,3622$ )	0,1726 ( $\sigma\pm 0,1952$ )	0,2606 ( $\sigma\pm 0,2807$ )	100	54,35%
Dias d'Ávila-BA	1,6196 ( $\sigma\pm 0,4968$ )	1,2628 ( $\sigma\pm 0,3091$ )	0,1662 ( $\sigma\pm 0,1747$ )	0,2608 ( $\sigma\pm 0,2541$ )	114	61,96%

\* $N_a$  = número de alelos observados;  $N_e$  = número efetivo de alelos; H = diversidade genética de Nei (1973); \*I = índice de informação de Shannon; NLP: Número de *loci* polimórfico; PLP: Percentual de *loci* polimórfico.

Lopera-Barrero *et al.* (2015) ao avaliarem populações cultivadas de reprodutores de tambaqui no Nordeste do Brasil com marcador RAPD encontraram valores similares de fragmentos polimórficos, entre 62,50 a 64,38%. Estes valores podem ser considerados como razoavelmente baixo quando comparado aos achados de Jacometo *et al.* (2010) que avaliaram com o mesmo marcador populações cultivadas na região Norte, Nordeste e Centro-Oeste relataram valores entre 72,92 a 83,33%, e juntamente com outros parâmetros estatísticos (diversidade de Nei, índice de Shannon, índice de fixação e número de migrantes) consideraram as populações com alta variabilidade genética e baixa diferenciação e distância genética entre si. A facilidade de renovação dos planteis nestas regiões possivelmente tenha influenciado num maior grau de polimorfismos entre os estoques.

O percentual de polimorfismo encontrado nesta análise foi inferior aos resultados de Lopera-Barrero *et al.* (2015) e Jacometo *et al.* (2010), refletido possivelmente pela baixa diferenciação apresentada entre os indivíduos. Acredita-se que o afinamento genético que ocorre desde a formação dos estoques fundadores deve ser a principal causa da baixa diferenciação encontrada entre os indivíduos que compõem os estoques reprodutores destas populações. Este fato tem sido observado em pisciculturas, visto que a alta prolificidade dos peixes e a limitada estrutura física nas pisciculturas, tem levado a utilização de um pequeno número efetivo de reprodutores, promovendo, com o passar das gerações, um afinamento genético (efeito *bottleneck*) e conseqüentemente levando a redução da variabilidade genética (POVH *et al.*, 2006).

Com base na frequência alélica, a maior diferença na heterozigosidade genética (H) foi observada entre as populações de Dias d'Ávila (H= 0,1662) e Pentecoste (H= 0,2696). Deve-se levar em consideração que o plantel de Pentecoste foi um dos primeiros em todo o território nacional fundado a mais de 50 anos (SANTOS *et al.*, 2016). Assim é possível que esse estoque venha sofrendo com a baixa renovação em seu plantel reprodutor no decorrer desses anos.

Os valores encontrados neste estudo são inferiores aos citados por Queiroz *et al.* (2016) que apresentaram média de  $H = 0,336$  para três populações de tambaqui cultivados, sendo 0,283 a estimativa mais baixa encontrada. Sendo H uma medida da variação gênica de uma população pode-se supor que dentro dos estoques estudados o processo de confinamento e falta de planejamento nas reproduções influenciaram na diminuição da variação genética das mesmas.

O índice de Shannon prevê a proximidade genética entre indivíduos e quanto menor seu valor menor a diversidade populacional (McMANUS *et al.*, 2011). O valor encontrado para este parâmetro variou entre as populações de Cachoeira (0,2606) e Pentecoste (0,2732) (Tabela 3), ou seja, as três populações estudadas apresentam baixa diversidade intrapopulacional. Valores contrários foram relatados por Ribeiro *et al.* (2016), (0,313 a 0,382) e Queiroz *et al.* (2016) (0,419 a 0,439), ao estudarem com populações cultivadas de tambaqui na região Norte do Brasil. Deste modo, compreende-se que as três populações estudadas apresentaram uma diversidade populacional baixa, sendo inferior às populações estudadas na região Norte.

Em relação ao índice de diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) este resultou em 0,3336 (Tabela 3), valor superior ao descrito por Lopera-Barreto *et al.* (2008) e Lopes *et al.* (2008) ao estudarem alevinos de *Prochilodus lineatus* para repovoamento (0,043 e 0,084 respectivamente), para os autores o baixo valor de  $G_{ST}$  indica uma pequena diferenciação genética nos estoques. Pode-se assim sugerir que existe uma diferenciação genética entre as populações em estudo, apesar de partilharem o mesmo estoque fundador.

**Tabela 3** Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para as populações de tambaqui em três estações de piscicultura no Nordeste do Brasil.

	$H_T$	$H_S$	$G_{ST}$	$N_M$
Total	0,2581 ( $\sigma \pm 0,0290$ )	0,1720 ( $\sigma \pm 0,0148$ )	0,3336	0,9989

\* $H_T$  = diversidade total;  $H_S$  = diversidade esperada;  $G_{ST}$  = diferenciação populacional;  $N_m$  = estimativa do fluxo gênico

O número de migrantes ou fluxo gênico ( $N_m$ ) nas populações estudadas resultou em uma média de 0,9989 (Tabela 3). Isto se deve ao efeito da distância geográfica e do confinamento nos estoques estudados, fatores que impossibilitam a troca de material genético entre as pisciculturas. Este valor infere um fluxo de genes quase inexistente entre as populações, uma vez que o número estimado de migrantes é uma maneira indireta de estimar o fluxo de genes entre os estoques (NEIGEL, 1997).



Valores inferiores a 1 também foram encontrados por Vitorino *et al.* (2015) ao estudarem populações naturais de *Arapaima gigas* (0,18 a 1,24). Segundo os autores, as populações pelo seu isolamento perderam a diversidade genética, tendendo a atingir altos níveis de homozigose mais rápido do que as grandes populações, o que pode explicar os baixos valores esperados de heterozigosidade encontrados para algumas populações. O mesmo se aplica ao presente estudo onde o isolamento afetou diretamente a diversidade genética interpoblacional.

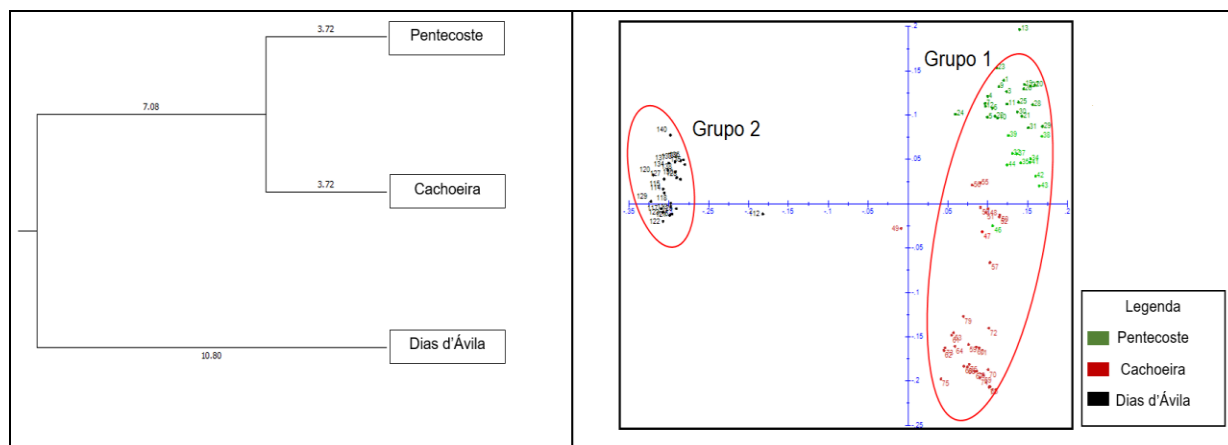
O grau de variabilidade genética nos estoques de reprodutores depende da origem, do número de reprodutores utilizados (estoque fundador e reprodutor), do manejo reprodutivo adotado e da diversidade genética dos peixes que formaram os estoques (LOPES *et al.*, 2009). A perda de variabilidade genética apresentada em populações de cativeiro está diretamente relacionada ao tamanho dos estoques reprodutores e ao aumento da endogamia nas pisciculturas ao longo das gerações. Assim, o tempo de isolamento dessas populações (número de gerações desde o início do estoque) contribuiu para a perda de heterozigosidade.

Os resultados encontrados para as populações estudadas mostraram que as medidas para a comparação de identidade genética (Nei 1972) variaram de 0,7851 a 0,9256 e as medidas para comparação de distância genética variaram de 0,0773 a 0,2419 (distância genética = 0 e similaridade genética = 1) (Tabela 4). O valor máximo estimado (0,9256) da identidade genética ocorreu entre as populações de Pentecoste e Cachoeira, e o valor mínimo estimado (0,7851) entre Pentecoste e Dias D'Ávila. O grau de identidade entre estas estações se justifica principalmente por dois fatores: Pentecoste foi a fundadora das outras duas pisciculturas, o que a torna próxima a de Cachoeira; e Dias D'Ávila renovou minimamente o seu plantel de reprodutores, o que contribuiu para uma maior diferença quando comparada a Cachoeira. Por outro lado, o valor máximo observado da distância genética (0,2419) está entre as populações de Dias d'Ávila e Pentecoste e o valor mínimo observado (0,0773) entre as populações de Cachoeira e Pentecoste (Tabela 4). Valores próximos a 0 são um forte indício para sustentar a teoria que as três populações tiveram um mesmo estoque fundador.

**Tabela 4** Identidade genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as três populações cultivadas de tambaqui.

Estoques	Pentecoste	Cachoeira	Dias D'Ávila
Pentecoste	****	0,9256	0,7851
Cachoeira	0,0773	****	0,8218
Dias D'Ávila	0,2419	0,1963	****

O dendrograma (Figura 2 a) demonstra uma separação das populações de Dias d'Ávila das demais. Esta diferenciação tem grande possibilidade de ter ocorrido, pois esta piscicultura teve em seu plantel uma pequena renovação (com peixes selvagens), o que lhe deu a possibilidade de formação de um estoque reprodutor com diferença em seu estoque fundador. Assim, observa-se a proximidade genética entre os estoques de Pentecoste e Cachoeira.



**Figura 2a:** Dendrograma gerado pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method, arithmetic mean*), e; **b** análise de coordenadas principais (PCoA) de 110 tambaquis amostrados de três pisciculturas no Nordeste.

A análise de coordenadas principais (PCoA) e os resultados da estrutura genética dos estoques cultivados de tambaqui permitiram a identificação de grupos com baixas relações genéticas dos 110 indivíduos analisados com a utilização dos marcadores ISSR (Figura 2 b).

Verifica-se que houve uma pequena miscigenação entre as Pisciculturas de Pentecoste e Cachoeira e uma distinção da piscicultura de Dias d'Ávila (Figura 2 b). O tempo de isolamento e a diminuição do tamanho da população é citada como a principal causa do aumento da taxa de endogamia e na consequente perda de variabilidade genética da população de Pentecoste (SANTOS *et al.*, 2012). Populações cativas de espécies ameaçadas perdem a diversidade genética devido ao gargalo genético encontrado (FRANKHAM *et al.*, 2008). Essa é uma das possíveis causas de se encontrar uma baixa diversidade genética em populações com baixo fluxo gênico ainda que oriundos de um mesmo plantel.

A estrutura genética populacional é determinada pela frequência de genes e as forças (migração, mutação, seleção e deriva genética) que afetam suas frequências, sendo, portanto, resultado direto da ação e interação de uma série de mecanismos ecológicos e evolutivos (TURCHETTO-ZOLET *et al.*, 2013). Quando esses indivíduos são domesticados, confinados e reproduzidos artificialmente há uma limitação quanto a forças evolutivas que agirão nestes, acarretando em danos em futuras gerações.

A análise comparativa nas diferentes populações indicou que o maior percentual de variação foi encontrado entre os grupos que dentro deles. A única combinação que apresentou variação dentro das populações foi Pentecoste x Cachoeira (Tabela 5).

Wright (1978) propôs um guia geral para interpretar os valores de  $F_{ST}$  sendo, valores entre 0 a 0,05 podem ser considerados como pequena diferenciação populacional; 0,05 a 0,15 indica moderada diferenciação populacional; 0,15 a 0,25 indica grande diferenciação populacional e acima de 0,25 indica uma extensa diferenciação populacional. Santos *et al.* (2012; 2016) relataram forte estruturação genética no estoque de Pentecoste e nas pisciculturas que obtivera seu plantel fundador originário da mesma. Este fator deve ser levado em consideração ao avaliarmos as populações da Bahia Pesca S/A que partilham esse mesmo princípio.

As análises comparativa realizadas com a população de Dias d'Ávila (PE<sub>x</sub>DD e CA<sub>x</sub>DD) revelaram maior variação entre as populações que dentro delas. Na literatura, isto tem sido pouco registrado em estudo genéticos com populações de peixes. O alto grau de diferenciação confirmado com altos valores de  $F_{ST}$  associado ao alto grau de distancia de Nei (1972) (Tabela 5) possibilita condicionar os problemas causado pelo efeito “gargalo” e pelo confinamento e a falta de monitoramento genético dos reprodutores nessas populações à sua baixa variabilidade genética.

**Tabela 5** Análises de variância molecular (AMOVA), fonte de variação (FV), soma de quadrados (SM), coeficiente de variação (CV), porcentagem de variação (V %), índice de fixação ( $F_{ST}$ ) em grupos de reprodutores de tambaqui.

Grupos	F.V.	SM	CV	V (%)	$F_{ST}$
PE x CA	E.P.	255,169	5,5271	27,76	0,277
	D.P.	1086,353	14,377	72,23	
	Total	1311, 522	19,9054	100	
PE x DD	E.P.	700, 273	18,861	59,22	0,592
	D.P.	950,966	12,983	40,77	
	Total	1651,129	31, 844	100	
CA x DD	E.P.	559,593	17,268	57,25	0,572
	D.P.	790,681	12,891	42,74	
	Total	1350,27	30,159	100	

PE: Pentecoste-CE; CA: Cachoeira-BA; DD: Dias d'Ávila-BA; EP: Entre populações, DP: dentro das populações.

O isolamento leva a mudanças nas frequências gênicas das populações e a pressão por seleção condiciona que o acúmulo de novas mutações não são compartilhadas pelo processo de fluxo gênico. Em cativeiro, estas populações são submetidas à intensa seleção, geração após geração e através dos tempos para que tolerem e se adaptem as condições ambientais locais (HILSDORF, 2013). A baixa variabilidade genética está correlacionada negativamente com o potencial de adaptação às mudanças nas condições ambientais (RASHID *et al.*, 2012).

O sucesso da atividade piscícola está associado à gestão e manutenção da variabilidade genética em progênes e reprodutores, apoiada por reproduções planejados que promovem a melhoria contínua da produtividade. Torna-se notável a estruturação dentro das populações (principalmente dentro dos grupos) comprovando o efeito do isolamento na deriva genética dos plantéis. A falta de manejo reprodutivo associado a influência do afunilamento genético nas populações poderá afetar diretamente na capacidade adaptativas dos espécimes causando baixa produtividade na mesma.

As três pisciculturas estudadas apresentaram diversidade genética baixa, deste modo propõe-se a inserção de espécimes com *pedigree* e composição genética

diferente da existente no local, com a finalidade de melhoramento dos planteis. A introdução de um material genético diferenciado deverá conduzir a formação de novos genótipos nas populações melhorando a sua diversidade.

#### 4. Conclusão

Os marcadores moleculares ISSR se mostraram eficientes na detecção da variabilidade genética em populações cativas de tambaqui, com os espécimes apresentando perda de variabilidade genética. Os resultados do presente estudo mostram a importância da renovação dos planteis de reprodução, ao mostrar a população Dias d'Ávila por ter seu estoque renovado, apresentou maior variabilidade que as demais estações de piscicultura, demonstrando que a renovação eficiente do plantel de reprodutores proporciona melhorias na genética dos indivíduos.

#### 5. Agradecimentos

Agradecemos ao Sr. Paulo Reis, Sr. Felipe Vieira Sra. Socorro Chacon de Mesquita, por sua assistência ao possibilitar a coleta das amostras biológicas de Tambaqui nas estações de piscicultura. O apoio financeiro foi concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia e a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia por permitir o desenvolvimento desta pesquisa.

#### 6. Referencias

- AGUIAR, J. P.; FAZZI-GOMES, P. F.; HAMOY, I. G.; SANTOS, S. E. B.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. (2018). Loss of genetic variability in the captive stocks of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), at breeding centres in Brazil, and their divergence from wild populations. *Aquaculture Research*, 1-12.
- ARAUJO-LIMA, C.; GOULDING, M. (1998). Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia. Tefé, AM: Sociedade Civil Mamirauá Brasília, distrito Federal, Brasil
- CALCAGNOTTO, D.e TOLEDO-FILHO, S.A. (2000). Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology*, 23: 1:127-130.
- CHARRAD, N; GHAZZALI N; BOITEAU, V; NIKNAFS, A. (2014). NbClust: NbClust package for determining the best number of clusters. R package version 2.0.1. Disponível em: <http://CRAN.Rproject.org/package=NbClust..> Acesso em 14. jan. 2018.
- CHIUA, T.; SUB, Y.; PAIA, J.; CHANGA, H. (2012). Molecular markers for detection and diagnosis of the giant grouper (*Epinephelus lanceolatus*) *Food Control* 24:29-37
- EXCOFFIER L. (2001). Analysis of population subdivision. In: Balding DJ, Bishop M, Cannings C, ed. *Handbook of Statistical Genetics*. Chichester: Wiley, p 271–307.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.

- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – Internacional [FAO]. (2016). El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos. Roma
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE D. A. (2008). Fundamentos de genética da conservação. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.
- HILSDORF, A.W. S. (2013). Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Tese (Livre Docência) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- NACIONAL [IBGE]. (2017). Produção da pecuária municipal. Volume 44. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- JACOMETO, C.B.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.D.P.; GOMES, P.G.; POVH, J.A.; STREIT-JUNIOR, D.P.; VARGAS; RESENDE, L. (2010). Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 481-487.
- LOPERA BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; LOPES, T.S.; OLIVEIRA, S.N.; GOMES, P.C. (2010). Diversidad genética de *Piaractus mesopotamicus* utilizado em programas de repoblación. Archivos de Zootecnia, v.59, p.51-62,.
- LOPERA-BARRERO, N. M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ M. P.; FORNARI D. C; RESENDE, K.; POVEDA-PARRA, A. G; BRACCINI, G; SOUZA, F. P; FURLAN, P. J.; POVH, J. A.; RIBEIRO, R.P. (2015). Genetic variability of broodstocks of Tambaqui (Teleostei – Characidae) from the northeast region of Brazil. Semina: Ciências Agrárias. 36: 4013-402
- LOPERA-BARRERO, N. M; RIBEIRO, R. P; VARGAS, L; POVH, J. A.; GOMES, P.G.; MANGOLIN, C. A.; BOSO, K O.; GUALDA, T. (2008). Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (characiformes: prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. Bioscience Journal, 24:4:86-93.
- LOPERA-BARRERO, N.M.; SANTOS, S.C.A.; GOES, E.S.R.; CASTRO, P.L.; SOUZA, F.P.; POVEDA-PARRA, A.R; CASSETA, J.; PONTILLO, B.G.; RIBEIRO, R.P. (2016). Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v.68, n.6, p.1621-1628
- LOPES, T. S.; RIBEIRO, R. P. ; LOPERA- BARRERO, N. M.; SIROL, R. N.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; VARGAS, L. ( 2008). Caracterização genética de estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizados em programas de repovoamento. Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, 9: 652-661.
- McMANUS, C; PAIVA, S.; CORRÊA, P. S.; SEIXAS, L.; MELO, C.B. (2011). Estatística para descrever genética de populações. Publicado on-line em : [www.animal.unb.br](http://www.animal.unb.br).
- MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. (2007). Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. Pesquisa Agropecuária Brasileira 42:521-526

- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-92. 33
- NEI, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 70: 3321-3323.
- OLIVEIRA, C. A.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JÚNIOR, D. P.; POVH, J. A.; RESENDE, E. K. (2012). Breedingfish, a reality for Brazilian fish farming = melhoramento genético de peixes, uma realidade para piscicultura Brasileira. *Revista Panorama da Aquicultura* 130:38-47.
- PERRIER X., JACQUEMOUD-COLLET J.P. (2006). DARwin software <http://darwin.cirad.fr/>
- POVH, J. A.; RIBEIRO, R.R.; SIRO, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C. E LOPES, T. S. (2008). Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. *Pesquisa agropecuária brasileira* 43:201-20.
- POWELL W., MORGANTE M., ANDRÉ C., HANAFEY M., J. VOGEL, TINGEY S., RAFALSKI A. (1996). A comparação de marcadores RFLP, RAPD, AFLP e SSR (microssatélites) para análise de germoplasma. *Molecular Procriar.* ; 2 : 225–238
- QUEIROZ C. A.; SOUSA, N. R.; SILVA G.F.; INOUE, L. A. K. A. (2016). Impacts of stocking on the genetic diversity of *Colossoma macropomum* in central Amazon, Brazil. *Genet Molecular Research* 15: 1-9.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, (2011). Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 13 novembro 2017.
- RASHID, J.; FAOZIA, M. T.; MOSTAFA A. H., Md.; SAMSUL, A. (2012). Genetic variation in endangered butter catfish, *Ompok bimaculatus* (bloch) populations revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. *International Journal of Biosciences* 2: 85-93.
- RIBEIRO, R.P.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. L.; RESENDE, E. K.; SOUZA, F. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M. (2016). Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservatio. *Semina: Ciências Agrárias*, 37: 2375-2386
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nova York, Estados Unidos.
- SANTOS C. H. A.; SANTANA, G. S; LEITÃO, M.A.B.; PAULA-SILVA. M. N.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. (2016). Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. *Stichting International Foundation for Animal Genetics*, 47:373–376
- SANTOS, C.H.A.; LEITÃO, M.A.B.L.; SOUSA, C.F.S.; SANTANA, GX.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. (2012). Genetic variability of wild and captivity populations of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) .*Acta Scientiarum. Biological Sciences*,34: 2: 191-197.
- TAMURA, K., STECHER, G.; PETERSON, D.; KUMAR, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 32

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. (2013).  
Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America.  
*Molecular Ecology* 22: 1193-1213.

VIDAL, M de F. (201)6. Panorama da piscicultura no Nordeste. *Caderno Setorial Etene*. 1:3.

VITORINO, C. A.; OLIVEIRA, R. C. C.; MARGARIDO, V. P. E.; VENERE, P, C. (2015).  
Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the  
Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. *Neotropical Ichthyology* 13: 557-568.

WRIGHT, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 91–159.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. Chicago: University of  
Chicago, 580p

YEH, F. C.; BOYLE, T. J. B. (1997). Population genetic analysis of co-dominant and  
dominant markers and quantitative traits. *Belg. J. Bot. Brussels* 129: 157.

## 8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pesca e a aquicultura são potenciais fontes de desenvolvimento e produção de alimentos em todo o Brasil. Embora grande parte da produção de peixes em cativeiro seja de uma espécie exótica (tilápia), observa-se um aumento da contribuição de peixes nativos, como o tambaqui, advindo da piscicultura na comercialização de pescado. Isso demonstra que a aquicultura por abrandar a pressão sobre os estoques pesqueiros torna-se importante para a preservação dos recursos genéticos nativos, possibilitando a recuperação das populações selvagens que são a permanente fonte de variabilidade genética para os programas de melhoramento.

A importância dos recursos genéticos de peixes de água doce na região neotropical é uma premissa indiscutível nos diversos níveis de interesse da sociedade. Os especialistas devem por isso concentrar esforços no sentido de gerar dados que fundamentem políticas de conservação e uso sustentado de tais recursos.

O manejo dos recursos genéticos aquícolas deve avaliar uma abordagem ambiental para o desenvolvimento de uma aquicultura produtiva e ambientalmente responsável. No presente estudo observou-se a ocorrência de estruturação genética nas pisciculturas, que pode estar diretamente relacionada ao efeito fundador das mesmas ocasionando um “gargalo” genético. Tais fatores podem afetar o poder adaptativo da espécie. Dessa forma, verifica-se a necessidade da conservação das populações naturais de *C. macropomum* para que a sua variabilidade genética não desapareça ao longo das gerações assim como tomar medidas necessárias melhoria da diversidade genética nas populações cultivadas especialmente em unidades de fomento piscícolas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABELHA, M.C.F.; AGOSTINHO A. A.; GOULART, A. 2001. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum** 23: 425-434.
- AGUIAR, J. P.; FAZZI-GOMES, P. F.; HAMOY, I. G.; SANTOS, S. E. B.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. 2018. Loss of genetic variability in the captive stocks of tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), at breeding centres in Brazil, and their divergence from wild populations. **Aquaculture Research**, 1-12.
- AGUIAR, J.; SCHNEIDER, H.; GOMES, F.; CARNEIRO, F.; SANTOS, S.; RODRIGUES, L.; SAMPAIO, I. 2013. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 85: 1439-1447.
- ALLENDORF, F.W.; HOHENLOHE, P.A.; LUIKART, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature**, 11:10:697–709.
- ALMEIDA, F.L. 2013. Endocrinologia aplicada na reprodução de peixes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal** 37:174-180.
- ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2016. Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. **Stichting International Foundation for Animal Genetics**, 47:373–376.
- ALVES, A. L.; VARELA, E.S.; MORO, G.V.; KIRSCHNIK, L.N.G. 2014. **Riscos Genéticos da Produção de Híbridos de Peixes Nativos**. Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, Tocantins, Brasil.
- ANDRADE, E.S.; ANDRADE, E.A.; FELIZARDO, V.O.; PAULA, D.A.J.; VERAS G.C; MURGAS, L.D.S. 2015. Biologia reprodutiva de peixes de água doce. **Revista brasileira de reprodução animal** 39:195-201.
- ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. e GOMES, L. C. 2005. **Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil.
- ARAUJO-LIMA, C.; GOULDING, M. 1998. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Tefé, AM: Sociedade Civil Mamirauá Brasília, distrito Federal, Brasil.
- BAHIA PESCA [internet]. **Pesca e Aquicultura na Bahia**. Disponível em: <http://www.bahiapesca.ba.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=14>. Acessado em setembro de 2016.
- BARTLEY D.M.; RANA K.; IMMINK, A.J. 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries** 10: 325–337.
- BETANCUR-R, R.; EDWARD O. WILEY, E.O. ARRATIA G.; ACERO, A. BAILLY6, MASAKI, N M.; LECOINTRE, G.; ORTÍ, G. 2017. Phylogenetic classification of bony fishes, **BMC Evolutionary Biology**. 17:162:1-40.
- BRABO, M.F.; L. F. S; SANTANA, J. V. M.; CAMPELO, D. A. V.; VERAS, G. C. 2016. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources** 4: 50-58.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2013. **Boletim estatístico de pesca e aquicultura do Brasil 2011**. Brasília: República Federativa do Brasil.
- CAMPOS, J. L.; ONO, E. A.; ISTCHÚK, P. I. 2015. Tambaqui considerações sobre a cadeia de produção e o preço. **Revista Panorama da Aquicultura** 25: 42-47.
- CAVALCANTE, E.D.; STEINMULLER, M.I. 2017. Rodolpho von Ihering e a comissão técnica de piscicultura do nordeste: a descoberta da técnica da hipofisacção no açude Bodocongó em Campina Grande-PB (1934-1935). **RIHGRGS** 152: 129-155.

- CHAGAS, E.C.; VAL, A.L. 2003. Efeito da vitamina C no ganho de peso e em parâmetros hematológicos de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, 38: 3: 397- 402.
- CHIU, T.S.; KUO, C.W.; LIN, H.C.; HUANG, D.S.; WU, P.L. 2014. Genetic diversity of ivory shell (*Babylonia areolata*) in Taiwan and identification of species using DNA based assays. **Food Control**, 30: 1-9.
- CLARK, A. G.; HARTL, D. L. 2010. **Princípios de Genética de Populações**. Editora Artmed, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- CONCADO, G.M.A.; VAL, A.D.B.; SANT'ANA, G.C.; FERREIRA, J.L. Marcadores moleculares de DNA e suas aplicações na caracterização, identificação e melhoramento genético da oliveira. *Oliveira no Brasil: Tecnologias de Produção*, 1ed. 225-249.
- COSTA R.; PEREIRA, G.,; GARRIDO, I.; TAVARES-DESOUSA, M.M.; ESPINOSA, F. 2016. Comparison of RAPD, ISSR, and AFLP Molecular Markers to Reveal and Classify Orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) Germplasm Variations. **PLoS ONE**, 11:4.
- CRISCUOLO-URBINATI, E. R. Y.; KURADOMI, E. C.; URBINATI, S. R.; BATLOUNI, A. 2012. The administration of exogenous prostaglandin may improve ovulation in pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Theriogenology** 78: 2087-2094.
- DE ALMEIDA; L.C.; AVILEZ, I. M.; HONORATO, C.A.; HORI, T. S. F.; MORAES, G. 2011. Growth and metabolic response of tambaqui (*Colossoma macropomum*) fed different levels of protein and lipid. **Aquaculture nutrition** 17: 253-262.
- DIAS, F. T. C.; BERTINI, C. H. C. M.; SILVA, A. P. M. da; CAVALCANTI, J. J. V. 2015. Variabilidade genética de feijão-caupi de porte ereto e ciclo precoce analisada por marcadores RAPD e ISSR. **Revista Ciência Agronômica** 46: 563-572.
- EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- Nacional [EMBRAPA]. 2012. **Genética na piscicultura: marcação e coleta de amostras para análise de DNA**. 1 edição. Brasília, Distrito Federal, Brasil.
- ESCHMEYER, W. N. e FONG, J. D. 2016. **Species by Family/Subfamily**. Disponível em: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 19 de Abril de 2016.
- EXCOFFIER L. 2001. **Analysis of population subdivision**. In: Balding DJ, Bishop M, Cannings C, ed. *Handbook of Statistical Genetics*. Chichester: Wiley, p 271–307.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- FALCONER, D. S. 1987. **Introdução à genética quantitativa**. Viçosa, Minas Gerais, Brasil.
- FALEIRO, D. G. 2007. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrado. PLANALTINA, Minas Gerais, Brasil.
- FISHER, R. A. 1930. *The genetical theory of natural selection*. **Oxford, Clarendon Press**. Washington, Distrito de Columbia, Estado Unidos
- FONTELES S.B.A.; FERNANDES, F.M.C. e TOLEDO, L.F.A. 2011. ISSR patterns in *Piaractus mesopotamicus*, *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* and in their inter-specific hybrids. **Magistra** 23:82-86.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – Internacional [FAO]. 2016. **El estado mundial de la pesca y la acuicultura. Contribución a la seguridad alimentaria y la nutrición para todos**. Roma, 224p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE D. A. 2008. **Fundamentos de genética da conservação**. Sociedade Brasileira de Genética. Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

- FURUYA, W.M. 2001. **Espécies nativas**.p. 83-121. In: MOREIRA, H. L.M. *et al.*, eds Fundamentos da moderna Aquicultura. Editora Ulbra, Canoas, Rio Grande do Sul, Brasil.
- GALETTI JR, P. M.; RODRIGUES, F. P.; SOLÉ-CAVA, A.; MIYAKI, C. Y., CARVALHO, D.; EIZIRIK, E.; VEASEY, E. A.; SANTOS, F. R.; FARIAS, I. P.; VIANNA, J. A.; OLIVEIRA, L. R.; WEBER, L. I.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FRANCISCO, M. R.; REDONDO, R. A. F., SICILIANO, S., DEL LAMA, S. N., FREITAS, T. R.O., HRBEK, T., MOLINA, W. F. 2008. **Genética da conservação brasileira**. p.244-274. In: Fundamentos de Genética da Conservação. Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A., Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. 290p.
- GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. de. 2013. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arquivos De Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar** 16: 47-50.
- GOMES, F.; SCHNEIDER, H.; BARROS, C.; SAMPAIO, D.; HASHIMOTO, D.; PORTO-FORESTI, F.; SAMPAIO, I. 2012. Innovative molecular approach to the identification of *Colossoma macropomum* and its hybrids. **Anais da Academia Brasileira de Ciências** 84: 517-525.
- GRAÇA, W. J.; PAVANELLI, C. S. 2007. **Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes**. Eduem, Maringá, Parana, Brasil.
- GUISANDE, C.; PELAYO-VILLAMIL, P.; VERA, M.; MANJARRÉS-HERNÁNDEZ, A. CARVALHO, C.; MARTÍNEZ, P.; PRIETO-PIRAQUIVE, E.; GRANADO-LORENCIO, C.; DUQUE, S.R. 2012. Ecological Factors and Diversification among Neotropical Characiforms. **International Journal of Ecology**, 2012:20.
- GUPTA M.; CHYI Y.S.; ROMERO-SEVERSON J.; OWEN J. L. 1994. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. **Theoretical and Applied Genetics**. 89:998–1006.
- HARTL, D. L. 2010. **Princípios de genética de populações**. Hartl D.L.; Clarck AG (tradução: Lura Roberta Pinto Utz, Maria Regina Borges-Osório, Nelson Jurandi Rosa Fagundes); consultoria, supervisão e revisão: Eizirik E. 4ªed.Porto Alegre. 660p.
- HASHIMOTO, D. T.; MENDONÇA, F. F.; SENHRINI, J. A.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. 2011 Molecular diagnostic methods for identifying Serrasalmid fish (Pacu, Pirapitinga, and Tambaqui) and their hybrids in the Brazilian aquaculture industry. **Aquaculture** 321: 49-53.
- HASHIMOTO, D. T.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. 2014. Genetic Identification of F1 and Post-F1 Serrasalmid Juvenile Hybrids in Brazilian Aquaculture. **PLoS one** 9: 1-8.
- HILSDORF, A.W. S. 2013. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Tese (Livre Docência) Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Pirassununga.
- HUGHES, A. R.; INOUE, B. D.; JOHNSON, M. T. J.; UNDERWOOD, N. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters** 11: 609-623.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA- NACIONAL[IBGE]. 2016. **Produção da pecuária municipal**. Volume 44. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.
- JACOMETO, C.B.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RODRIGUEZ- RODRIGUEZ, M.D.P; GOMES, P.G.; POVH, J.A.; STREIT-JUNIOR, D.P.; VARGAS; RESENDE, L. 2010. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45: 481-487.
- KUBITZA, F. 2015. Aquicultura no Brasil: principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, 25:150.
- LABASTIDA, E.; COBIÁN, D.; HÉNAUT, Y.; GARCÍA-RIVAS, M. C.; CHEVALIER, P.P. e RABET. S.M. 2015. The use of ISSR markers for species determination and a genetic study of the invasive lionfish in Guanahacabibes, Cuba **Latin American Journal of Aquatic Research** 43: 1011-1018.

LEITÃO, M. A.B. 1998. **Estudo comparativo da estrutura genética de populações naturais e artificiais de tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818): sistemas isozímicos.** Dissertação (Mestrado), Manaus: INPA-FUA, 1998 75 p.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O. T. 2003. **Genera Incertae Sedis in Characidae.** p. 106-169 In Reis ; Kullander S.O. e Ferraris Jr. C.J. eds. Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS. Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

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

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

LOPES, T. S.; STREIT JUNIOR, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J. R. 2009. Diversidade genética de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 61:728-735.

MALABARBA, L.R. e WEITZMAN, S.H. 2003. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia** 16:67-151.

MARCOS, R.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; CORRÊA FILHO, R.A.C. ; ABREU, J. S. de; MURARI, P.J.F. 2016. Weight gain and morphometric growth of genetically improved tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Semina: Ciências Agrárias** 37: 2521-252.

McMANUS, C; PAIVA, S.; CORRÊA, P. S.; SEIXAS, L.; MELO, C.B.2011. Estatística para descrever genética de populações. Publicado on-line em : [www.animal.unb.br](http://www.animal.unb.br).

McNEELY, J. A.; MILLER, K. R.; REID, W. V.; MITTERMEIER, R. A.; WERNER, T. B. 1990. **Conserving the world's biological diversity.** World Conservation Union, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund-US, and the World Bank, Washington, Distrito de Columbia, Estado Unidos.

MEIRMANS, P.G. 2012. AMOVA-Based Clustering of Population Genetic Data **Journal of Heredity**,103: 5 744–750.

MELLO, F. de; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P.; RESENDE, E. K.; POVH, J. A.; FORNARI, D. C.; BARRETO, R. V.; MCMANUS, C.; STREIT JÚNIOR, D. 2015. Growth curve by Gompertz nonlinear regression model in female and males in tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Anáís da Academia Brasileira de Ciências** 87: 2309-2315.

MELO, B. F.; SIDLAUSKAS, B. L.; HOEKZEMA, K.; FRABLE, B.W.; VARI, R.P.; OLIVEIRA, C. 2016. Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 102: 189–201.

MEYER W.; MITCHELL T. G.; FREEDMAN E. Z.; VILGAYS R. 1993. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Jornal Clinic Microbiology** 31:2274–2280.

MIRANDE, J. M. 2010. Phylogeny of the family Characidae (Teleostei: Characiformes): from characters to taxonomy. **Neotropical Ichthyology** 8:385-568.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; SOUZA, V. R. 2007. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 42:521-526.

MORO, G.V.; REZENDE, F.P.; ALVES, A.L.; GASHIMOTO, D. T.; VARELA, E.S. TORATI, L.S. 2013. **Espécies de peixe para piscicultura**. p. 28-69. In: RODRIGUES, A.P.O. *et al.* Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento. EMBRAPA, Brasília, Distrito Federal, Brasil.

MOTA, T. F. M.; PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J. 2014. Estudos filogenéticos da ordem characiformes: Tendências e carências. **Biologia e saúde** 20: 21-36.

MUNEER, P. M. A.; REMYA, S.; GOPALAKRISHNAN, A.; BASHEER, V. S.; MUSAMMILU, K. K.; PONNIAH, A. G. 2011. Development and characterization of RAPD and microsatellite markers for genetic variation analysis in the critically endangered yellow catfish *Horabagrus nigricollaris* (Teleostei: Horabagridae). **Biochemical Genetics** 49:83-95.

MUNIZ, J.A.S.M.; CATANHO, M.T.J.A.; SANTOS, A.J.F. 2008. influência do fotoperíodo natural na reprodução induzida do tambaqui, *Colossoma macropomum* (cuvier, 1818). **Boletim do Instituto de Pesca** 34: 205 – 211.

MURGAS L.D. S.; Felizardo, V.O.; Ferreira, M.R.; Andrade, E.S.; Veras G.C. 2011. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. Revista **Brasileira de Reprodução Animal** 35:186-191.

NEI, M. 1972. Genetic distance between popilations. **American Naturalist** 106: 283-92.

NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the **National Academy of Scienses** 70: 3321-3323. 29.

NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, Bethesda 89:583-590.

NELSON, J. S. 2006. **Fishes of the world**. New York: John Wiley & Sons, New York.

NELSON, J. S.; GRANDE, T. C.; WILSON, M.V.H. 2016. **Fishes of the world** 10 Ed., 707p New Jersey Canada.

NG, W.L.; TAN, S.G.2015. Inter- Simple Sequence Repeat (ISSR) Marker: are re doing it right? **ASM Science Journal** 9: 30-39.

OLIVEIRA, C. A.; RIBEIRO, R. P.; STREIT JÚNIOR, D. P.; POVH, J. A.; RESENDE, E. K. 2012. Breedingfish, a reality for Brazilian fish farming = melhoramento genético de peixes, uma realidade para piscicultura Brasileira. **Revista Panorama da Aquicultura**, 130:38-47.

OLIVEIRA, C. M.; SOUSA, R. G. C. 2017. Cultivo de tambaquis da pré-engorda ao abate com diferentes taxas de arraçoamento. **Biota Amazonica**, 7:4:20-25.

OLIVEIRA, C.; AVELINO, S.; MARIGUELA, T.C.; ORTÍ, G.; BENINE, R.C.; VARI, R.; CORRÊA e CASTRO, R.M.2011.Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysii: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. **BMC Evolutionary Biology**,.11:1:275.

OLIVEIRA, R. C. 2009. O panorama da aquicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade** 2: 71-89

ORFÃO, L. H. 2013.Indução da desova e espermiacão de peixes em criações comerciais. **Revista Brasileira de Reprodução. Animal** 37:192-195.

PAVAN, M.G. e MONTEIRO, F.A. 2014. **Técnicas moleculares aplicadas à sistemática e ao controle vetorial**. In: GALVÃO, C., Vetores da doença de chagas no brasil Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia. Disponível em: SciELO Books <http://books.scielo.org>.

PORTO-FORESTI F.; HASHIMOTO D.T.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. 2010. **Hibridação em piscicultura: monitoramento e perspectivas**. In: Baldisserotto B e Gomes LC (eds.), Espécies nativas para a piscicultura no Brasil. Santa Maria:Universidade Federal de Santa Maria, 589-606.

PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; PRADO, F. D.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. 2013. Genetic markers for the identification of hybrids among catfish species of the family imelodidae. **Journal of Applied Ichthyology** 29: 643–647.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R.R; SIRO, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C. E LOPES, T. S. 2008. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa agropecuária brasileira** 43:201-206.

QUEIROZ C. A.; SOUSA, N. R.; SILVA G.F.; INOUE, L. A. K. A. 2016. Impacts of stocking on the genetic diversity of *Colossoma macropomum* in central Amazon, Brazil. **Genet Molecular Research** 15: 1-9.

RASHID, J.; FAOZIA, M. T.; MOSTAFA A. H., Md.; SAMSUL, A. 2012. Genetic variation in endangered butter catfish, *Ompok bimaculatus* (bloch) populations revealed by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting. **International Journal of Biosciences** 2: 85-93.

REIS, R. E.; KULLANDER; S. O.; FERRARIS JUNIOR. C.J., 2003 **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. p729. EDIPUCRS Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

RESENDE, E. K. de; OLIVEIRA, C. A. L. de; LEGAT, A. P.; RIBEIRO, R. P. 2010. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica espécies aquáticas. No SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO ANIMAL. Embrapa Meio-Norte - **Artigo em anais de congresso (ALICE)**, 8 p.

RIBEIRO, R.P.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. L.; RESENDE, E. K.; SOUZA, F. P.; POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M. 2016. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservatio. **Semina: Ciências Agrárias**, 37: 2375-2386.

RIGUES, A. P. O. 2014. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca** 40:135-145.

ROCHA, C. M. C.; RESENDE, E.K.; ROUTLEDGE, E.A B; LÍCIA MARIA LUNDSTEDT, L.M. 2013. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 48:4-6.

RODRIGUES, A. P. O. 2014. Nutrição e alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Boletim do Instituto de Pesca** 40:135-145.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. de P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N.; JACOMETO, C. B. 2010. Diversidad genética de piracanjuba usada en programas de repoblación con marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 45: 56-6

ROLF, M. M.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; McKKAY, S. D.; McCLURE, M.C.; NORTHUTT, S.L.; KERLEY, M.S.; WEABER, R.L. 2010. Impact of reduced marker set estimation of genomic relationship matrices on genomic selection for feed efficiency in Angus cattle. **BMC genetics** 11:1-24.

ROUX, O.; GEVREY, M.; ARVANITAKIS, L.; GERS, C.; BORDAT, D.; LEGAL, L. 2007. ISSR-PCR: Tool for discrimination and genetic structure analysis of *Plutella xylostella* populations native to different geographical areas. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 43: 240-250.

SÁNCHEZ, C. F.B. **Diversidade entre e dentro de populações simuladas sob deriva genética**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil.

SANTANA G.X.; SANTOS C. H. A.; SOUSA C. F. S.; NASCIMENTO P. R. M.; PAULA-SILVA M. N.; SOUSA A. C. B.; CAMPOS T.; ALMEIDA-VAL V. M. F. 2011. Isolation of novel microsatellite markers for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), an important freshwater fish of the Amazon. **Conservation Genetic Resources** 4:197–200.

SANTOS C. H. A.; SANTANA, G. S; LEITÃO, M.A.B.; PAULA-SILVA. M. N.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. 2016. Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellite. **Animal Genetic**, 47, 373–376.

SANTOS, C.H.A.; LEITÃO, M.A.B.L.; SOUSA, C.F.S.; SANTANA, GX.; ALMEIDA-VAL, V.M.F. 2012. Genetic variability of wild and captivity populations of *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) .**Acta Scientiarum. Biological Sciences**,34: 2: 191-197.

- SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, 9:874-876.
- SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIA, P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, 71: 33-44.
- SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS [Sebrae]. **Aquicultura no Brasil: série estudos mercadológicos**. Brasília, Distrito Federal, 71p.
- SIDONIO, L.; CAVALCANTI, I.; CAPANEMA, L.; MORCH, R.; MAGALHÃES, G.; LIMA, J.; BURNS, V.; ALVES JÚNIOR, A.J.; MUNGIOLI, R. 2012. Panorama da aquicultura no Brasil: desafios e oportunidades. **BNDES Setorial**, 35:421-463.
- SMITH, P.J.; JAMIESON, A.; BIRLEY, A.J. Electrophoretic studies and stock concept in Marine Teleosts. **Journal du Conseil Permanent International Pour L Exploration de la Mer**, v. 47, p. 231-245, 1990.
- SOARES, K.J.A.; RIBEIRO, F.B.; BOMFIM, M.A.D. E MARCHÃO, R.S. 2017. Valor nutricional de alimentos alternativos para tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Arch. Zootec.*, 66:256:491-497.
- SOUZA, D.C.L. 2015. Técnicas moleculares para caracterização e conservação de plantas medicinais e aromáticas: uma revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**.17:495-503.
- SUGANUMA, C. H. 2008. **Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microssatélites**. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista Jaboticabal, São Paulo, Brasil, 105 p.
- TOLEDO-FILHO S.A., ALMEIDA-TOLEDO L.F., FORESTI F., CALCAGNOTTO D., SANTOS S.B.A.F. e BERNARDINO G. 1998. **Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura**. Cadernos de Ictiogenética 4, CCS/USP, São Paulo, São Paulo, Brasil.
- TURCHETTO-ZOLET, A. C.; PINHEIRO, F.; SALGUEIRO, F.; PALMA-SILVA, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. **Molecular Ecology** 22: 1193-1213.
- VARELA, E. S.; ALVES, A.L.; TARDIVO, T.F. 2015. **Parentesco genético em reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) baseado em marcadores de DNA: perspectivas de manejo genético na ausência de pedigree**. Embrapa Pesca e Aquicultura. Palmas, Tocantins, Brasil.
- VAZZOLER, A. E. A. DE M.; MENEZES, N. A. 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysii). **Revista Brasileira de Biologia**, 52:4: 627-640.
- VENTURIERI, R.; BERNARDINO, G. 1999. Arapaima: Endangered species can be saved through culture. **Panorama da Aquicultura** 9: 13-21.
- VIDAL, M de F. 2016. Panorama da piscicultura no Nordeste. **Caderno Setorial Etene**. 1:3.
- VITORINO, C. A.; OLIVEIRA, R. C. C.; MARGARIDO, V. P. E.; VENERE, P, C. 2015. Genetic diversity of *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) (Osteoglossiformes: Arapaimidae) in the Araguaia-Tocantins basin estimated by ISSR marker. **Neotropical Ichthyology** 13: 557-568.
- WAPLES, R.S.; GAGGIOTTI, O. 2006. INVITED REVIEW: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. **Molecular Ecology**, 15: 6:1419-1439.
- WASKO, A.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F.2004. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology** 20: 48-52.
- WRIGTH, S 1978. **Variability within and among natural populations**. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, Estados Unidos.

WU K.; JONES R., DANNAEBERGER L., SCOLNIK P. A. 1994. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. **Nucleic Acids Research**. 22: 3257-3258.

ZIETKIEWICZ E.; RAFALSKI A.; LABUDA D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification. **Genome**. 20:176-183.

ZOHAR, Y. e MYLONAS. C C. 2001. Endocrine manipulations of spawning in cultured fish: from hormones to genes. **Aquaculture** 197: 99-136.