



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PÂMELA JULIANA FURLAN MURARI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
MEXILHÃO DOURADO (*LIMNOPERNA FORTUNEI*) EM
PISCICULTURAS DE RESERVATÓRIOS DO PARANÁ**

Londrina
2016

PÂMELA JULIANA FURLAN MURARI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE
MEXILHÃO DOURADO (*LIMNOPERNA FORTUNEI*) EM
PISCICULTURAS DE RESERVATÓRIOS DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero.

Londrina
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Murari, Pâmela Juliana Furlan.

Variabilidade Genética de populações de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) em pisciculturas de reservatórios do Paraná / Pâmela Juliana Furlan Murari. - Londrina, 2016.

61 f. : il.

Orientador: Nelson Lopera Barrero.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) - Teses. 2. Variabilidade Genética do Mexilhão - Teses. 3. Estrutura Genética do Mexilhão - Teses. I. Lopera Barrero, Nelson. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

PÂMELA JULIANA FURLAN MURARI

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MEXILHÃO
DOURADO (*LIMNOPERNA FORTUNEI*) EM PISCICULTURAS DE
RESERVATÓRIOS DO PARANÁ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera
Barrero
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eduardo Augusto Ruas
Faculdade de Apucarana - FAP

Prof.a Dra. Claudete Aparecida Mangolin
Universidade Estadual de Maringá - UEM

Londrina, 26 de Fevereiro de 2016.

*Dedico a todos aqueles que confiaram em mim,
pois sem essas pessoas, não conseguiria
e nem valeria à pena continuar tentando.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por me conduzir por este longo caminho de crescimento, obstáculos vencidos e vitórias almejadas e, enfim, alcançadas.

Agradeço à Universidade Estadual de Londrina, por ter me proporcionado a graduação no curso de Zootecnia e a possibilidade de ingressar na Pós-Graduação em Ciência Animal.

Ao meu orientador, professor Dr. Nelson Maurício Lopera Barrero, não apenas pela orientação e colaboração durante os últimos dois anos para a concretização deste trabalho, mas também por tantos bons conselhos, constantes incentivos e motivações que, com toda certeza, foram de grande valia para mim.

A professa Dra. Claudete de Fátima Ruas e ao professor Dr. Eduardo Augusto Ruas, pelo auxílio e colaboração em grande parte das análises realizadas, e também ao professor Eduardo por ter aceitado participar da banca de qualificação e defesa deste trabalho, colaborando muito com suas correções e sugestões, auxiliando na melhoria deste.

A professora Dra. Claudete Aparecida Mangolin por aceitar participar da banca de defesa deste trabalho, contribuindo com sua grande experiência, e auxiliando nas correções e sugestões para melhoria deste trabalho.

À professora Dra. Angela Rocio Poveda Parra, pelo grande ajuda prestada durante todo período das análises, sempre pronta a colaborar e auxiliar para realização deste trabalho, também agradeço por aceitar participar da banca de qualificação deste trabalho.

Aos piscicultores Carlos Alberto Scaramal, da Piscicultura Angola, Luiz Henrique Fernandes, da Piscicultura Estância Alvorada, e da Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá o professor Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, agradeço por disponibilizarem suas pisciculturas para a coleta do material analisado e por sempre me receberem com tanta atenção e pronta colaboração para realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Estudo e Pesquisa em Aquicultura e Genética da Universidade Estadual de Londrina, por ceder espaço para as análises, também agradeço aos membros do grupo pela companhia durante os dois anos de mestrado e pelo ajuda de muitos com todo preparo dos materiais coletados e andamento das análises realizadas.

Ao Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina, por ceder espaço para as

análises, e ao técnico Lucas Benício pela grande colaboração e auxílio na realização das análises realizadas no laboratório.

À minha base, minha família, que me ajudou, sustentou-me, conduziu-me e fortaleceu-me, tornando possível a concretização e finalização de mais esta etapa em minha vida, mas agradeço não apenas por todo apoio cedido durante esta fase, agradeço por tudo que já fizeram por mim durante toda a minha vida, ensinamentos e direcionamentos que serão levados por toda vida.

Agradeço ao meu esposo Emerson Murari, por todos os dias que estive ao meu lado, encorajando, incentivando e fortalecendo, pessoa que tenho grande admiração, respeito e amor, sobretudo agradeço por toda colaboração e presença em cada etapa de realização deste sonho agora prestes a ser realizado. Tantos foram os momentos vividos com sua presença, que este sonho passou a ser não somente meu, mas nosso.

Enfim, agradeço a todos que estiveram envolvidos neste trabalho e porventura não tenham sido citados.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.

Albert Einstein

MURARI, Pâmela Juliana Furlan. **Variabilidade genética de populações do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) em pisciculturas de reservatórios do Paraná.** 2016. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), é um molusco bivalve originário do sudeste da Ásia e sua chegada no Brasil ocorreu através da água de lastro de embarcações, a partir de então ele tem atingido altas densidades populacionais, alterando drasticamente ecossistemas aquáticos continentais. Este molusco é um invasor de água doce, que apresenta características fisiológicas e ecológicas que favorecem sua rápida e eficaz proliferação na água. Diversos métodos têm sido empregados para controlar a infestação do *Limnoperna fortunei* e grandes impactos ambientais estão sendo gerados em decorrência da utilização de métodos inespecíficos. Pesquisas realizadas através do estudo da genética e biologia molecular forneceriam maiores informações sobre o mexilhão dourado, possibilitando o desenvolvimento de novas tecnologias que possam contribuir com o controle desta espécie. O objetivo do presente estudo foi avaliar de forma inédita a diversidade genética de populações de *L. fortunei* presentes em três pisciculturas dos reservatórios de Canoas I (PCAN), Rosana (PROS) e Capivara (PCAP), Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. Cinco *loci* microssatélite foram amplificados usando DNA extraído do músculo adutor de 75 indivíduos (25 por população). Os cinco *loci* utilizados produziram 38 alelos e o número de alelos por *locus* variou de 26 (Lf06) a 13 (Lf22) com uma média geral de 7,6. Houve baixa presença de alelos nulos. Os valores médios de riqueza alélica (R_a) foram diferentes entre as populações. A média do número de alelos efetivos (A_e) variou de 2,032 (PCAN) a 3,282 (PROS). A heterozigosidade observada (H_o) foi menor que a esperada (H_e) em todas as populações, com desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor médio do Coeficiente de endogamia (F_{is}) foi positivo e significativo para todas as populações. A análise de variância molecular (AMOVA) identificou maior variabilidade genética dentro do que entre as populações e o índice de fixação (F_{st}) mostrou uma pequena diferenciação genética entre elas. Foram observadas associações significativas ($P = <0,05$) de desequilíbrio de ligação em todas as populações. Foi identificada a ocorrência de fluxo gênico em todas as populações e ausência de efeito Bottleneck recente, com correlação entre distância genética e geográfica. As populações foram separadas no dendrograma com a formação de dois agrupamentos: PCAN x PCAP e PROS. A análise de agrupamento populacional mostrou um $K = 2$, com similaridade genética entre as três populações e maior proximidade entre PCAN e PCAP, corroborando com os dados gerados pelo dendrograma. Os resultados poderão ser utilizados para contribuir com o desenvolvimento de alternativas mais específicas que possam controlar de forma satisfatória esta espécie invasora.

Palavras-chave: Mexilhão dourado. *Limnoperna fortunei*. Variabilidade Genética. Microssatélite. Controle do Mexilhão.

MURARI, Pâmela Juliana Furlan. **Genetic variability of Golden mussel populations (*Limnoperna fortunei*) in fish farms of Paraná reservoirs.** 2016. 61 p. Dissertation (Master's degree Science in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

The golden mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), is a bivalve mollusc originating in Southeast Asia and its arrival in Brazil took place by ships ballast water, from then on it has reached high densities, dramatically altering freshwater ecosystems. This mollusk is a freshwater invader, which has physiological and ecological characteristics that favor their rapid and effective proliferation in the water. Several methods have been employed to control the infestation *Limnoperna fortunei* and major environmental impacts are being generated due to the use of non-specific methods. Research conducted through the study of genetics and molecular biology would provide more information on the golden mussel, allowing new development technologies that contribute to the control of this species. The aim of this study was to evaluate in an unprecedented manner the genetic diversity of *L. fortunei* populations present in three fish farms from Canoas I (PCAN), Rosana (PROS) and Capivara (PCAP) reservoirs, Paranapanema River, Paraná, Brazil. Five microsatellite *loci* were amplified using DNA extracted from the adductor muscle of 75 individuals (25 per population). The five *loci* used produced 38 alleles and the number of alleles per locus ranged from 26 (Lf06) to 13 (Lf22) with an overall average of 7.6. There was a low presence of null alleles. The average values of allelic richness (A_r) differed between populations. The average number of effective alleles (A_e) ranged from 2.032 (PCAN) to 3.282 (PROS). The observed heterozygosity (H_o) was lower than expected (H_e) in all populations, with deviation in Hardy-Weinberg equilibrium. The average value of inbreeding coefficient (F_{is}) was positive and significant for all populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) identified greater genetic variability within than between populations and the fixation index (F_{st}) showed little genetic differentiation between them. Significant associations were observed ($P = <0.05$) of linkage disequilibrium in all populations. The occurrence of gene flow in all populations and absence of recent Bottleneck effect, with correlation between genetic and geographic distance was identified. The populations were separated in a dendrogram with the formation of two groups: PCAN x PCAP and PROS. The population cluster analysis showed $K = 2$, with genetic similarity among the three populations and greater proximity between PCAN and PCAP, confirming the data generated by the dendrogram. The results could be used to contribute to the development of more specific alternatives to satisfactorily control this invasive species.

Keywords: Golden mussel. *Limnoperna fortunei*. Genetic variability. Microsatellite. Control of Mussel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Características do Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*): a. Mexilhão dourado inteiro; b. Valvas do mexilhão; c. Músculos internos do mexilhão; d. Colônia do mexilhão 20
- Figura 2** – Incrustação do Mexilhão dourado em componentes utilizados nas pisciculturas com criação em sistema tanques-rede: a. Oclusão das malhas dos tanques causada por incrustação do mexilhão; b. Vários tanques-rede com incrustação do mexilhão; c. Boias de demarcação com incrustações; d. Cordas com incrustação 23
- Artigo A – Variabilidade genética de populações de Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) em três reservatórios brasileiros**
- Figura 1** – Localização gráfica dos locais de coleta de amostras das três populações de *Limnoperna fortunei*: 1. PCAN - Piscicultura Canoas I; 2. UHE de Canoas I; 3. PCAP - Piscicultura Capivara; 4. UHE de Capivara; 5. UHE de Taquaruçu; 6. PROS – Piscicultura Rosana; 7. UHE de Rosana 32
- Figura 2** – Detalhamento das coletas e cuidados aplicados durante as coletas de *L. fortunei*: a. Mexilhões coletados e mantidos no balde antes da primeira limpeza; b. Limpeza dos mexilhões coletados; c. Separação das colônias e nova limpeza dos mexilhões após a insensibilização e abate; d. Mexilhões ensacados e identificados; e. Mexilhões armazenados em caixas térmicas com gelo para transporte..... 34
- Figura 3** – Detalhamento da retirada do músculo adutor dos mexilhões dourados, utilizado para extração de DNA: a. Mexilhão ainda fechado devido o músculo adutor; b. Músculo adutor localizado no canto superior da valva direita do mexilhão (seta); c. Extração do músculo através do uso de uma pinça; d. Músculo adutor armazenado para posterior extração do DNA 35
- Figura 4** – Análise gráfica da estrutura genética nas três populações analisadas de *L. fortunei*: A. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, conforme distância genética de Nei (1978); B. Agrupamentos (K = 2) formados pela análise de estrutura populacional - 1. PCAN; 2. PROS; 3. PCAP..... 43

LISTA DE TABELAS

Artigo A – Variabilidade genética de populações de Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) em três reservatórios brasileiros

- Tabela 1** – Identificação, localização e distância geográfica parcial e total (km) dos pontos de coleta e das UHE onde foram realizadas as coletas das amostras de *Limnoperna fortunei* 33
- Tabela 2** – Sequências de pares de *primers* testados para o *Limnoperna fortunei*..... 37
- Tabela 3** – Detalhamento do tamanho de pares de bases e das temperaturas de alelamento para os *primers* amplificados 38
- Tabela 4** – Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em cinco locos de microssatélites para as três populações (Pop) de *L. fortunei*. * Significativo ao nível de 5% para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg e para o coeficiente de endogamia (Fis) 40
- Tabela 5** – Testes para excesso e deficiência de heterozigotos nas três populações de *L. fortunei* 41
- Tabela 6** – Análise de variância molecular (AMOVA) e índice de fixação (Fst) para as três populações de *L. fortunei*. Nível de significância de 1023 permutações. 42
- Tabela 7** – Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições de proporção de indivíduos não-migrantes e migrantes para as populações de *L. fortunei*, com base no método de atribuição bayesiana. * Significativo ao nível de 5% para o número de migrantes 42
- Tabela 8** – Distância geográfica em km (acima da diagonal) e valores de distância genética de Nei (1978) (abaixo da diagonal) das populações de *L. fortunei* estudadas 43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
AMOVA	Análise de Variância Molecular
He	Heterozigosidade Esperada
Ho	Heterozigosidade Observada
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
MMA	Ministério do Meio Ambiente
Na	Número de Alelos
Ne	Número de Alelos Efetivo
Pb	Pares de Bases
PCAN	Piscicultura Canoas I
PCAP	Piscicultura Capivara
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PROS	Piscicultura Rosana
Ra	Riqueza Alélica
SSR	Sequência Simples Repetida
TA	Temperatura de Anelamento
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UHE	Usina Hidrelétrica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	CONSUMO E PRODUÇÃO DE PESCADO	17
2.2	DESAFIOS NA AQUICULTURA BRASILEIRA	18
2.3	MEXILHÃO DOURADO (<i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i>)	19
2.3.1	Características do Mexilhão Dourado	19
2.3.2	Disseminação do Mexilhão Dourado No Brasil.....	20
2.3.3	Prejuízos Ocasionados pelo Mexilhão Dourado	21
2.3.4	Técnicas Moleculares Aplicadas no Estudo da Variabilidade Genética	23
2.3.5	Estudos Genéticos para o <i>Limnoperna fortunei</i>	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4	ARTIGO A (normas revista Aquaculture) – VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MEXILHÃO DOURADO (<i>LIMNOPERNA FORTUNEI</i>) EM TRÊS RESERVATÓRIOS BRASILEIROS	28
6	CONCLUSÃO FINAL	56
	REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

O peixe é considerado uma fonte vital de proteínas e nutrientes essenciais, motivo pelo qual o seu consumo tem apresentado um crescimento significativo atualmente (FAO, 2014). Este fato é extremamente vantajoso para o nosso país, o qual apresenta-se como um dos poucos países com condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura (MPA, 2014a).

O crescimento da produção de pescado no Brasil está sendo possível, dentre outras alternativas, através da criação de peixes em tanques-rede, localizados nos reservatórios de propriedades da União (OLIVEIRA et al., 2014). Apesar do enorme potencial para a produção de pescado presente nos reservatórios, a máxima produção ainda não foi atingida (MATIAS, 2015).

Os principais desafios que a aquicultura brasileira enfrenta estão relacionados com os impactos ambientais e econômicos (OECD-FAO, 2015). Dentre eles, encontram-se os prejuízos observados nos últimos anos devido à infestação do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) em pisciculturas que utilizam a criação de peixes em tanques-rede, por meio das incrustações deste molusco em suas telas (LÖSCH et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2014).

O *Limnoperna fortunei*, também conhecido como mexilhão dourado, é um molusco bivalve originário do sudeste da Ásia (BARBOSA; MELO, 2009). Presume-se que sua chegada ao Brasil ocorreu através da água de lastro de embarcações, desde então, altas densidades populacionais estão sendo alcançadas, alterando drasticamente os ecossistemas aquáticos continentais (OLIVEIRA et al., 2010).

Este molusco é uma espécie de água doce e é considerado como uma espécie altamente invasora (MONTALTO; DRAGO, 2003), não possuindo predadores naturais e apresentando características que favorecem sua rápida e eficaz proliferação na água (DARRIGRAN; PASTORINO, 1995). Entre as principais características, destacam-se o rápido crescimento, alto poder osmorregulador, presença de estágio larval planctônico (DARRIGRAN et al., 2003), com grande facilidade de fecundação e formação de colônias (CATALDO et al., 2005; RUCKERT et al., 2004).

A espécie tem ocasionado grandes danos em sistemas de captação de águas (CAPÍTOLI et al., 2008), ameaçando o potencial dos reservatórios e centrais de tratamento da água (MARENGONI et al., 2013). Impactos negativos na navegação fluvial e no turismo também foram observados (AGUDO-PADRÓN, 2008). Em pisciculturas com sistema de

cultivo em tanques-rede, devido a incrustação do *Limnoperna fortunei* nas telas dos tanques, ocorre a redução da renovação de água, causando baixa oxigenação e liberação de resíduos dos animais, gerando também ferimentos epidérmicos nos peixes e ruptura dos tanques (LÖSCH et al., 2009; CANZI, 2011).

Segundo Giordani (2013), diversos métodos tem sido utilizados para controlar a infestação do *Limnoperna fortunei*, porém, as medidas aplicadas não são específicas, gerando grandes impactos ambientais. De acordo com Oliveira et al. (2014), pesquisas realizadas através do estudo da genética e biologia molecular forneceriam informações sobre o mexilhão dourado, possibilitando o desenvolvimento de novas tecnologias e estratégias que poderiam contribuir com o controle da espécie de forma mais adequada e específica.

Desta forma, este estudo foi conduzido com a finalidade de realizar uma avaliação da variabilidade genética de populações do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*), presentes em pisciculturas com sistema de cultivo em tanques-rede, localizadas em reservatórios no Estado do Paraná. Através desse levantamento, novas informações sobre esta espécie serão geradas e estarão disponíveis para serem utilizadas no desenvolvimento de alternativas mais específicas que possam contribuir com o controle desta espécie invasora.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CONSUMO E PRODUÇÃO DE PESCADO

De acordo com a FAO (2014), o consumo de peixe nunca foi tão significativo quanto atualmente, sendo considerado uma fonte vital de proteínas e nutrientes essenciais, muitas vezes difíceis de serem obtidas em outras fontes alimentares essenciais de alta qualidade. A recomendação por parte da Organização Mundial da Saúde (OMS) é para um consumo anual de pescado de pelo menos 12 quilos por habitante/ano (MPA, 2014a).

O consumo mundial de peixe elevou de 9,9 kg em 1960, 17,0 kg na década de 2000, 18,9 kg em 2010, para 19,2 kg em 2012 (FAO, 2014). De acordo com OECD-FAO (2015), as projeções de consumo para 2024 são para alcançar 21,5 kg. No Brasil, o consumo interno de peixe tem aumentado de forma constante, com um crescimento de 6,0 kg em 2005 para 9,9 kg em 2014, e as expectativas de consumo são para atingir 12,7 kg/p em 2024, portanto, com um crescimento de 30%.

Logo, é imprescindível que a produção de pescado tenha também um bom crescimento. De acordo com OECD-FAO (2015), em 2012 a produção mundial de pescado foi de 158 milhões de toneladas. Deste total, 136,2 milhões de toneladas foram utilizadas para o consumo humano, sendo 69,6 milhões de toneladas (51,1%) provenientes da pesca, enquanto 66,6 milhões (48,9%) de toneladas tiveram origem na aquicultura (FAO, 2014).

Para 2024 espera-se atingir 191 milhões de toneladas totais, com a aquicultura como principal contribuinte, a qual deverá chegar a 96 milhões de toneladas, ultrapassando a pesca de captura a partir de 2023, e estima-se que no ano de 2030 a aquicultura ficará responsável por mais de 60% da produção mundial de pescado para o consumo humano (THE WORLD BANK, 2013).

Em relação ao Brasil, a FAO (2014) destaca uma melhora de forma significativa no “ranking” global dos últimos anos. De acordo com dados do IBGE (2014), a produção brasileira de pescado atingiu um aumento de 20,9% em 2014, quando comparada ao ano anterior, com uma produção de 474,33 mil toneladas. Este aumento da produção de pescado deve-se principalmente à aquicultura, a qual apresenta uma taxa média de crescimento de 9% ao ano na última década, com perspectivas de crescimento de 52% acima do nível médio de 2012-14 até 2024 (OECD-FAO, 2015).

Um dos principais motivos para o crescimento da aquicultura é devido a produção em água doce, representando cerca de 75% do total produzido (OECD-FAO, 2015).

No Paraná a produção com maior destaque é a piscicultura continental com criações de tilápias (*Oreochromis niloticus*) (MATIAS, 2015), espécie mais criada no país em 2014, com produção de 198,49 mil toneladas, o equivalente a 41,9% do total da piscicultura, registrando um aumento de 17,3% em relação à produção obtida em 2013 (IBGE, 2014).

2.2 DESAFIOS NA AQUICULTURA BRASILEIRA

O Brasil é um dos poucos países com condições de atender à crescente demanda mundial por produtos de origem pesqueira, sobretudo por meio da aquicultura. Este evento só é possível devido às condições favoráveis que o país possui, entre elas 12% da água doce disponível do planeta, um litoral de mais de oito mil quilômetros, com uma faixa marítima equivalente ao tamanho da Amazônia, a qual é passível de uso sustentável para produção em cativeiro, e ainda mais de 3,5 milhões de hectares de lâmina d'água em reservatório de usinas hidrelétricas e propriedades particulares no interior do país (MPA, 2014b).

Há um enorme potencial para a produção de peixes nos reservatórios de água doce, porém, muito ainda precisa ser feito para alcançar este grande potencial que o país possui (MATIAS, 2015). O setor de pesca e aquicultura está enfrentando grandes desafios ligados a questões ambientais e impactos em biodiversidade e serviços ecossistêmicos (FAO, 2014). Um dos principais riscos para as perspectivas otimistas em relação ao Brasil, estão relacionados ao seu desempenho macroeconômico e fatores externos (OECD-FAO, 2015).

Entre os sistemas de cultivo da aquicultura continental, destaca-se o cultivo de peixes em tanques-rede (TACON e HALWART, 2007). Descritos como gaiolas flutuantes confeccionadas com diversos materiais e em diferentes tamanhos (retangulares, quadradas, ovais ou cilíndricas), revestidas por telas de diferentes tamanhos de malha (FERREIRA, 2010). Os tanques-rede são classificados como sistema intensivo de produção, com alta e contínua renovação de água, mantendo sua qualidade (BEVERIDGE, 1987).

É por meio deste sistema de cultivo que a produção está sendo realizada nos reservatórios públicos do país (MATIAS, 2015), nas quais estão sendo implantados parques aquícolas para a produção intensiva do pescado, ofertando milhares de áreas nestes parques e atendendo a demanda de pequenos, médios e grandes produtores. O uso dos reservatórios para a aquicultura de forma ordenada e planejada é uma forma de evitar impactos ambientais indesejados e de garantir o uso múltiplo das águas (MPA, 2012).

Na região oeste do Paraná o uso de tanques-rede está em fase de planejamento e adaptação com crescente aceitação por produtores e consumidores. Porém, um dos problemas quanto ao seu uso refere-se à incrustação de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) nas telas, dificultando a renovação da água, a qual se faz necessária à oxigenação e, também, para que ocorra a retirada de resíduos tóxicos aos animais. Pode-se destacar ainda a dificuldade de manejo de tanques-rede com a presença dessas incrustações, as quais expõem os peixes a constantes ferimentos epidérmicos, além de causar rupturas nos tanques (LÖSCH et al., 2009).

2.3 MEXILHÃO DOURADO (*LIMNOPERNA FORTUNEI*)

2.3.1 Características do Mexilhão Dourado

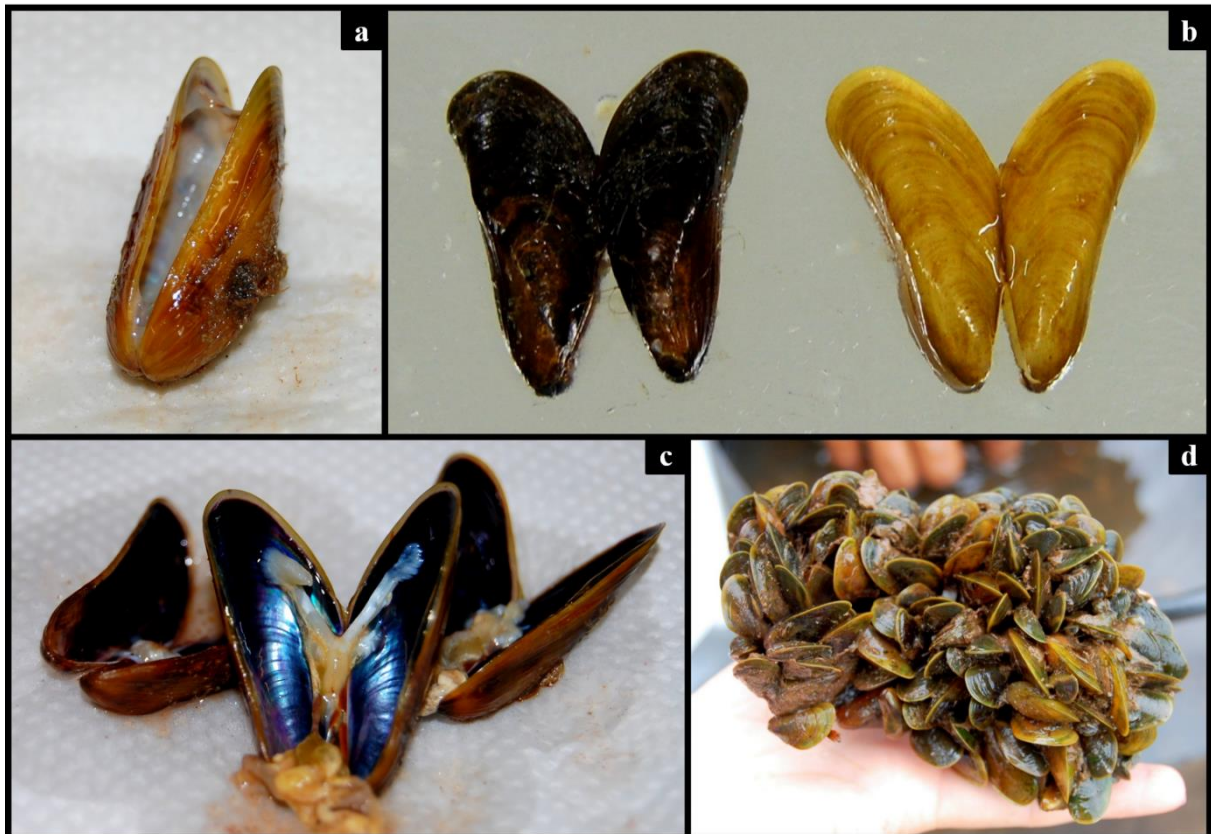
O mexilhão dourado (Figura 1.a), *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), é também conhecido em outros países como golden mussel ou mejillón dorado, trata-se de um molusco bivalve da família dos mexilhões marinhos (Mytilidae, Mytiloidea) (NEWELL, 1969). Os animais desta classe são simétricos, comprimidos nas laterais e possuem uma concha composta por duas valvas (Figura 1.b), encaixadas em dobradiças dorsalmente e unidas internamente por um ou dois fortes músculos que envolvem todo o corpo (Figura 1.c) (CANZI, 2011).

Considerado como uma espécie altamente invasora de água doce (MONTALTO; DRAGO, 2003), o *Limnoperna fortunei*, além de não possuir predadores naturais, apresenta características fisiológicas e ecológicas que favorecem sua rápida e eficaz proliferação na água (DARRIGRAN; PASTORINO, 1995), tais como rápido crescimento, ciclo de vida curto, larvas planctônicas (veliger), alto poder osmorregulador (DARRIGRAN et al., 2003), com alta taxa de filtração (133 mL/indivíduo/hora), e grande facilidade de fecundação e formação de colônias (Figura 1.d), com densidades de mais de 150.000/m² (CATALDO et al., 2005; RUCKERT et al., 2004). Os indivíduos adultos são dióicos e os eventos reprodutivos ocorrem uma ou duas vezes por ano. (MAGARA et al., 2001), podendo atingir entre 3 e 4 cm quando adulto (RUPERT et al., 2004).

O mexilhão dourado possui grande capacidade de adaptação ao ambiente local (MMA, 2004). Apresentando como uma das suas principais características, uma glândula que secreta filamentos proteicos, conhecidos como bisso, permitindo a ele fixar-se sobre quase todo tipo de substrato natural ou artificial, tais como madeira, rocha, vegetação,

tubulações, válvulas, telas, superfícies de concreto. Desta forma, este molusco representa hoje uma enorme preocupação para todos os setores que desenvolvem atividades associadas ao uso da água. (GIORDANI, 2013).

Figura 1 – Características do Mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*): a. Mexilhão dourado inteiro; b. Valvas do mexilhão; c. Músculos internos do mexilhão; d. Colônia do mexilhão



Fonte: O próprio autor

2.3.2 Disseminação do Mexilhão Dourado no Brasil

Este molusco é originário do sudeste da Ásia (especificamente da cabeceira do rio do leste) nos países Camboja, China, Coréia, Indonésia, Laos, Tailândia e Vietnã (BARBOSA; MELO, 2009). Nas Américas, o *L. fortunei* foi registrado pela primeira vez no rio de la Plata - Argentina em 1991 no Balneário de Bagliardi (PASTORINO et al., 1993).

No Brasil, seu primeiro registro ocorreu em 1998, no Rio Grande do Sul, junto ao delta do rio Jacuí, em frente ao porto de Porto Alegre (MANSUR et al., 2003). Os mesmos autores destacam que os moluscos encontrados referiam-se a indivíduos isolados, porém, posteriormente observaram algumas variações de densidade e tamanho nos mexilhões encontrados.

A dispersão do mexilhão se dá por diversos meios, envolvendo diferentes fases do seu ciclo de vida, larvas e adultos (MMA, 2004). Sua introdução no Brasil não foi intencional, provavelmente ocorreu através da água de lastro de embarcações. Desde então, ele vem se proliferando, atingindo altas densidades populacionais e alterando severamente os ecossistemas aquáticos continentais (OLIVEIRA et al., 2010).

No final de 1999 o mexilhão dourado já estava presente na bacia do lago Guaíba e dois anos depois na Lagoa dos patos (Mansur et al., 1999). Posteriormente, foi relatada sua presença na bacia dos rios Paraguai e Paraná, região do Pantanal (DARRIGRAN; PASTORINO, 2003; OLIVEIRA et al., 2006) e dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. No Estado do Paraná a presença deste molusco tem sido reportada desde o ano 2002 (ZANELLA; MARENDA, 2002; CAMPOS et al., 2012; PESTANA et al., 2010)

2.3.3 Prejuízos Ocasionados pelo Mexilhão Dourado

Sem inimigos naturais, a presença do mexilhão nos ecossistemas aquáticos brasileiros vem provocando grandes danos ambientais e econômicos, demandando manutenções específicas e mais frequentes, gerando altos custos, forçando mudanças nas práticas de controle ambiental, na rotina de pesca de populações tradicionais e criações do peixe nos reservatórios (MMA, 2004).

Devido ao fato de possuir bisco para fixação, esta espécie ocasiona grandes danos em sistemas de captação de águas (CAPÍTOLI et al., 2008), principalmente relacionados ao entupimento de tubulações e filtros, redução do diâmetro das tubulações e diminuição do fluxo de água, chegando a inviabilizar o funcionamento de pequenas centrais hidrelétricas (MMA, 2004; RESENDE; MARTINEZ, 2008) e centrais de tratamento da água. Impactos negativos na navegação fluvial e no turismo também foram observados (AGUDO-PADRÓN, 2008).

O mexilhão dourado tem causado grandes prejuízos e alterações nos ecossistemas aquáticos devido a sua incrustação em raízes de aguapés, vegetações, rizomas de juncos, outros bivalves (Corbiculidae ou Unionoida), com riscos até mesmo de acelerar a extinção de espécies mais raras de bivalves, e também através da sua característica como filtrador, acumulando grandes quantidades de pseudofeces nos locais em que encontram-se fixados, ocasionando o desenvolvimento de bactérias e fungos. (MANSUR et al., 2003).

L. fortunei tem avançado de forma alarmante nos cultivos de peixes em tanques-rede, formando colônias que diminuem a renovação da água no tanque por oclusão das malhas, conforme ilustrado na Figura 2.(a,b,c e d). Esse evento diminui o fornecimento de oxigênio, aumenta a acumulação de detritos e ocasiona estresse, pouco crescimento, aparecimento de ferimentos e doenças e em casos extremos, altas mortalidades de peixes. Por outro lado, desde o ponto de vista econômico, a formação de colônias resulta num aumento da mão-de-obra utilizada na limpeza dos tanques-rede e danos estruturais nestes, o que ocasiona um aumento dos custos operacionais e até ruptura dos tanques e fuga dos peixes (LÖSCH et al., 2009; CANZI, 2011; OLIVEIRA et al., 2014).

Considerando todos os efeitos deletérios ocasionados pela espécie e a vasta abundância nos ambientes invadidos (CANZI, 2011), é necessário encontrar métodos de controle do mexilhão que resolvam de forma satisfatória os problemas de incrustações, sem causar danos à saúde da população ou impactos ambientais (GIORDANI, 2013). Para tanto, são necessárias pesquisas que permitam aumentar o conhecimento científico dessa espécie (DARRIGRAN; DAMBORENEA, 2005).

Figura 2 – Incrustação do Mexilhão dourado em componentes utilizados nas pisciculturas com criação em sistema tanques-rede: a. Oclusão das malhas dos tanques causada por incrustação do mexilhão; b. Vários tanques-rede com incrustação do mexilhão; c. Boias de demarcação com incrustações; d. Cordas com incrustação



Fonte: O próprio autor

2.3.4 Técnicas Moleculares Aplicadas no Estudo da Variabilidade Genética

A detecção precoce de espécies invasoras e o conhecimento de sua estrutura populacional através de marcadores moleculares e técnicas aplicadas para estudos genéticos, são considerados fatores importantes para uma melhor e mais eficiente gestão (VIDIGAL et al., 2013), como no caso do mexilhão dourado, tornando os resultados destes estudos mais precisos, rápidos, eficientes e abrangentes (PIE et al., 2006)

Na biologia molecular, muitas técnicas são aprimoradas e focadas no próprio DNA como principal ponto para o desenvolvimento de marcadores (LEOI, 2003). Os marcadores genéticos, por exemplo, são utilizados para estudar divergências genéticas e tem como principal função identificar alelos que possuem difícil identificação. Eles são divididos em marcadores morfológicos ou moleculares (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004). A distinção de indivíduos que são geneticamente diferentes se dá através dos chamados marcadores moleculares (BORÉM; SANTOS, 2004)

A técnica chamada reação em cadeia da polimerase ou PCR (*Polymerase Chain Reaction* – Reação em Cadeia pela Polimerase), surgiu no final da década de 80 (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004) e desde então está revolucionando procedimentos de análises da variabilidade genética, principalmente por dependerem de pequenas quantidades de DNA, o que torna as análises mais rápidas e possíveis de serem realizadas (BORÉM; SANTOS, 2004), podendo ser aplicada a qualquer tipo de organismo vivo e a grandes quantidades de indivíduos (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

A PCR é caracterizada por realizar a síntese enzimática *in vitro* de milhões de cópias de um fragmento específico do DNA, através da enzima DNA polimerase e por meio de um pequeno segmento da molécula, chamado *primer*, ou iniciador. Desta forma, apenas as sequências identificadas pelos *primers* serão replicadas (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2004).

O princípio desta técnica consiste na reação chamada amplificação (BORÉM; SANTOS, 2004), a qual é realizada através de um ciclo que é repetido por diversas vezes e que possui 3 etapas específicas: desnaturação (elevação da temperatura para desnaturação do DNA da amostra), anelamento (redução da temperatura, a qual dependerá do *primer* utilizado, para ocorrer a hibridização DNA do *primer* com o DNA da amostra) e extensão (aumento da temperatura novamente para que a enzima polimerase realize a síntese do DNA resultante da etapa anterior) (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

Diversos marcadores moleculares foram desenvolvidos por meio da técnica da PCR, entre eles está o marcador do tipo SSR (*Simple Sequence Repeats*) ou também conhecido como microssatélite, o qual é formado por pequenas sequências simples de nucleotídeos repetidas em *tandem* em determinadas regiões do DNA. Dentre as principais características, eles destacam-se pela alta frequência e melhor distribuição ao longo do DNA, por apresentar locos muito polimórficos, com alta variabilidade, com presença de vários alelos de diferentes tamanhos e medidas de pares de bases (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995; BORÉM; SANTOS, 2004).

Por apresentar alta variabilidade e grande facilidade de amplificação pela PCR, os marcadores microssatélites, são amplamente utilizados para as análises que tem como objetivos a determinação da variabilidade genética (BORÉM; SANTOS, 2004).

2.3.5 Estudos Genéticos para o *Limnoperna fortunei*

A abordagem genética é uma alternativa importante que pode ser utilizada para entender o processo de estabelecimento de espécies, como do *Limnoperna fortunei*, nos ecossistemas aquáticos do Brasil (LOPES et al., 2014). De acordo com Oliveira et al. (2014), pesquisas realizadas através do estudo do comportamento genético e utilizando ferramentas da biologia molecular forneceriam informações sobre o mexilhão dourado, o que poderia colaborar com o desenvolvimento de novas tecnologias utilizadas no controle da espécie.

O uso de marcadores moleculares é uma ferramenta importante nos esforços de gestão para controlar as populações do mexilhão dourado (BOEGER et al., 2007). Ao utilizar estes marcadores é possível observar e comparar a diversidade genética em mexilhões *L. fortunei* coletados em diversas regiões, entendendo melhor como ocorreu sua introdução nos ambientes invadidos (GHABOOLIL et al., 2013).

Invasão biológica é o termo usado para definir a presença de uma espécie em um local onde não havia seu registro antes, como é o caso do mexilhão dourado. No caso específico deste molusco, a invasão biológica é caracterizada por ser de introdução, este evento ocorre quando as espécies são transportadas por atividades humanas, intencionalmente ou não, para uma área onde não ocorriam (LOPES et al., 2014). Ghaboolil et al. (2013), afirma que a introdução de *L. fortunei* na América do Sul provavelmente ocorreu através de diversas introduções, resultando em populações com alta diversidade genética em relação a populações nativas amostradas na Ásia.

Quando são introduzidas em um novo ambiente, as espécies invasoras ficam sujeitas a mudanças evolutivas que podem proporcionar o sucesso no seu estabelecimento, o qual estará relacionado ao nível de variação genética da espécie, pois ela oferece às populações invasoras uma maior flexibilidade nas respostas às pressões do novo ambiente (LOPES et al., 2014). Lopes et al. (2014), destaque que as populações invasoras de *L. fortunei*, presentes tanto no Brasil (Lago Guaíba, RS; Porto Esperança, MS e Usina de Itaipu, PR, Praia de Itaipu, RJ) quanto na Argentina (Balneário Bagliardi e Usina de Yaciretá), apresentaram altos níveis de variação genética.

Ao determinar a variação genética em diferentes escalas geográficas, será possível melhorar o entendimento sobre a dispersão do *L. fortunei* nos ambientes invadidos e sua estrutura genética populacional (ZHAN et al., 2012; GHABOOLIL et al., 2013). Em estudos conduzidos por Zhan et al. (2012), utilizando análises genéticas realizadas com marcadores microssatélites avaliados em músculos adutores de mexilhões (*L. fortunei*)

coletados em diversas regiões, foi possível esclarecer mecanismos de dispersão do mexilhão, examinando a relação entre a estrutura genética populacional, o arranjo espacial das bacias, e o movimento de vetores humanos entre eles.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um levantamento da variabilidade e da estrutura genética de populações de mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) presentes em pisciculturas com sistema de cultivo em tanque-rede, localizadas em reservatórios no rio Paranapanema, Estado do Paraná.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a variabilidade genética populacional através da análise genética por marcadores microssatélite.
- Avaliar a estrutura genética entre as populações coletadas utilizando informações de marcadores microssatélite.
- Organizar as informações obtidas para desenvolver estratégias mais específicas que possam controlar de forma satisfatória essa espécie invasora.

4 ARTIGO A (normas revista Aquaculture)

VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE MEXILHÃO DOURADO (*LIMNOPERNA FORTUNEI*) EM TRÊS RESERVATÓRIOS BRASILEIROS

GENETIC VARIABILITY OF GOLDEN MUSSEL POPULATIONS (*LIMNOPERNA FORTUNEI*) IN THREE BRAZILIAN RESERVOIRS

RESUMO

O mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) é um molusco bivalve originário do sudeste da Ásia considerado como uma espécie altamente invasora no Brasil. Seu impacto produtivo, econômico e biológico na aquicultura brasileira tem sido observado principalmente na piscicultura em tanques-rede. Poucos estudos genéticos analisando essas populações invasoras têm sido realizados. O objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de populações de *L. fortunei* presentes em três pisciculturas dos reservatórios de Canoas I (PCAN), Rosana (PROS) e Capivara (PCAP), Rio Paranapanema, Paraná, Brasil. Oito *loci* microsatélite foram amplificados usando DNA extraído do músculo adutor de 75 indivíduos (25 por população). Três dos oito *loci* utilizados (Lf04, Lf19 e Lf38) foram excluídos das análises devido a problemas de amplificação. Os cinco *loci* utilizados produziram 38 alelos e o número de alelos por *locus* variou de 26 (Lf06) a 13 (Lf22) com uma média geral de 7,6. Somente foram observados cinco alelos nulos. Os valores médios de riqueza alélica (R_a) foram diferentes entre as populações. A média do número de alelos efetivos (A_e) variou de 2,032 (PCAN) a 3,282 (PROS). A heterozigosidade observada (H_o) foi menor que a esperada (H_e) em todas as populações, com desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg. O valor médio do Coeficiente de endogamia (F_{is}) foi positivo e significativo para todas as populações. A análise de variância molecular (AMOVA) identificou maior variabilidade genética dentro do que entre as populações e o índice de fixação (F_{st}) mostrou uma pequena diferenciação genética entre elas. Foram observadas associações significativas ($p = <0,05$) de desequilíbrio de ligação em todas as populações. Foi identificada a ocorrência de fluxo gênico em todas as populações e ausência de efeito Bottleneck recente, com correlação entre distância genética e geográfica. As populações foram separadas no dendrograma com a formação de dois agrupamentos: PCAN x PCAP e PROS. A análise de agrupamento populacional mostrou um $K = 2$, com similaridade genética entre as três populações e maior proximidade entre PCAN e PCAP, corroborando com os dados gerados pelo dendrograma. Os resultados demonstraram alta variabilidade genética nas três populações estudadas, com similaridade genética entre as populações, ocorrência de fluxo gênico, correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica e ausência de influência do efeito Bottleneck.

Palavras-chave: bioinvasor, bivalve, conservação ambiental, análise genética, marcadores microsatélites.

ABSTRACT

The golden mussel (*Limnoperna fortunei*) is a bivalve mollusc originating in Southeast Asia considered a highly invasive species in Brazil. Its productive, economic and biological impact on the Brazilian aquaculture has been observed mainly in fish farming in cages. Few genetic studies analyzing these invasive populations have been conducted. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of *L. fortunei* populations present in three fish farms from Canoas I (PCAN), Rosana (PROS) and Capivara (PCAP) reservoirs, Paranapanema River, Paraná, Brazil. Eight microsatellite loci were amplified using DNA extracted from the adductor muscle of 75 individuals (25 per population). Three of the eight loci used (Lf04, Lf19 and Lf38) were excluded from analysis due to amplification problems. The five loci used produced 38 alleles and the number of alleles per locus ranged from 26 (Lf06) to 13 (Lf22) with an overall average of 7.6. Only five null alleles were observed. The average values of allelic richness (A_r) differed between populations. The average number of effective alleles (A_e) ranged from 2.032 (PCAN) to 3.282 (PROS). The observed heterozygosity (H_o) was lower than expected (H_e) in all populations, with deviation in Hardy-Weinberg equilibrium. The average value of inbreeding coefficient (F_{is}) was positive and significant for all populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) identified greater genetic variability within than between populations and the fixation index (F_{st}) showed little genetic differentiation between them. Significant associations were observed ($p = <0.05$) of linkage disequilibrium in all populations. The occurrence of gene flow in all populations and absence of recent Bottleneck effect, with correlation between genetic and geographic distance was identified. The populations were separated in a dendrogram with the formation of two groups: PCAN x PCAP and PROS. The population cluster analysis showed $K = 2$, with genetic similarity among the three populations and greater proximity between PCAN and PCAP, confirming the data generated by the dendrogram. The results showed high genetic variability in the three study populations with genetic similarity between populations, gene flow, positive correlation between genetic distance and geographical distance and absence of influence Bottleneck effect.

Keywords: bioinvasion, bivalve, environmental conservation, genetic analysis, microsatellite markers.

1. Introdução

O mexilhão dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), é um molusco bivalve da família dos mexilhões marinhos (Mytilidae, Mytiloidea) (Newell, 1969), originário do sudeste da Ásia (Barbosa; Melo, 2009). Possui um rápido crescimento, ciclo de vida curto, alto poder osmorregulador e presença de estágio larval planctônico (veliger) (Darrigran et al., 2003). Quando adulto atinge entre 3 e 4 cm e apresenta concha composta por duas valvas (Rupert et al., 2004). A espécie apresenta como características uma alta taxa de filtração e grande facilidade de fecundação e formação de colônias, podendo atingir densidades de mais de 150.000/m² (Cataldo et al., 2005; Ruckert et al., 2004). De acordo com Magara et al. (2001), os indivíduos adultos são dióicos e os eventos reprodutivos ocorrem uma ou duas vezes por

ano. Giordani (2013), ainda destaca que este organismo possui uma glândula que secreta filamentos proteicos, conhecidos como bisso, permitindo a ele fixar-se sobre quase todo tipo de substrato natural ou artificial. Representando hoje uma enorme preocupação para todos os setores que desenvolvem atividades associadas ao uso da água.

No Brasil, o primeiro registro do mexilhão dourado ocorreu em 1998, no Rio Grande do Sul, junto ao delta do rio Jacuí, em frente ao porto de Porto Alegre (Mansur et al., 2003) e atualmente ele já está presente em grandes densidades na lagoa Guaíba, no rio Paraguai e Paraná, e mesmo na região do Pantanal. Sua dispersão se dá por diversos meios, envolvendo diferentes fases do seu ciclo de vida, larvas e adultos (MMA, 2004).

A presença do mexilhão nos ecossistemas aquáticos brasileiros vem provocando grandes danos ambientais e econômicos, demandando manutenções específicas e mais frequentes, gerando altos custos, forçando mudanças nas práticas de controle ambiental, na rotina de pesca de populações tradicionais e criações de peixe nos reservatórios (Giordani, 2013; MMA, 2004). Este molusco tem avançado de forma alarmante nos cultivos de peixes em tanques-rede, formando colônias que diminuem a renovação da água no tanque por oclusão das malhas, diminuindo o fornecimento de oxigênio, aumentando o acúmulo de detritos e ocasionando estresse, pouco crescimento, aparecimento de ferimentos e doenças e em casos extremos, altas mortalidades de peixes (Lösch et al., 2009; Canzi, 2011; Oliveira et al., 2014).

Considerando todos os efeitos deletérios ocasionados pela espécie e a vasta abundância nos ambientes invadidos (Canzi, 2011), é necessário encontrar métodos de controle do mexilhão que resolvam de forma satisfatória os problemas de incrustações, sem causar danos à saúde da população ou impactos ambientais (Giordani, 2013). Estudos genéticos realizados utilizando técnicas de biologia molecular podem fornecer maiores informações sobre o mexilhão dourado, possibilitando o desenvolvimento de novas tecnologias que contribuam com o controle da espécie (Oliveira et al., 2014). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2004), uma das maiores barreiras para a implantação de medidas de controle da dispersão do mexilhão dourado é a falta de informação. De acordo com Zhan et al. (2012), a ocorrência do mexilhão em diferentes bacias hidrográficas e suas características fisiológicas (larvas de natação livre e adultos sésseis) sugerem que a espécie existe como diversos grupos populacionais grandes definidos por sistemas de drenagem, limitados através das drenagens, mas com vasta variabilidade ocorrendo entre eles.

Desta forma, este estudo foi conduzido com a finalidade de realizar uma avaliação da variabilidade genética do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*) presente em pisciculturas

com sistema de cultivo em tanque-rede, localizadas em três reservatórios do rio Paranapanema, no Estado do Paraná. Colaborando para a compreensão dos padrões de invasão na região pesquisada e fornecendo informações que poderão contribuir com o futuro desenvolvimento de alternativas que possam controlar de forma satisfatória esta espécie invasora.

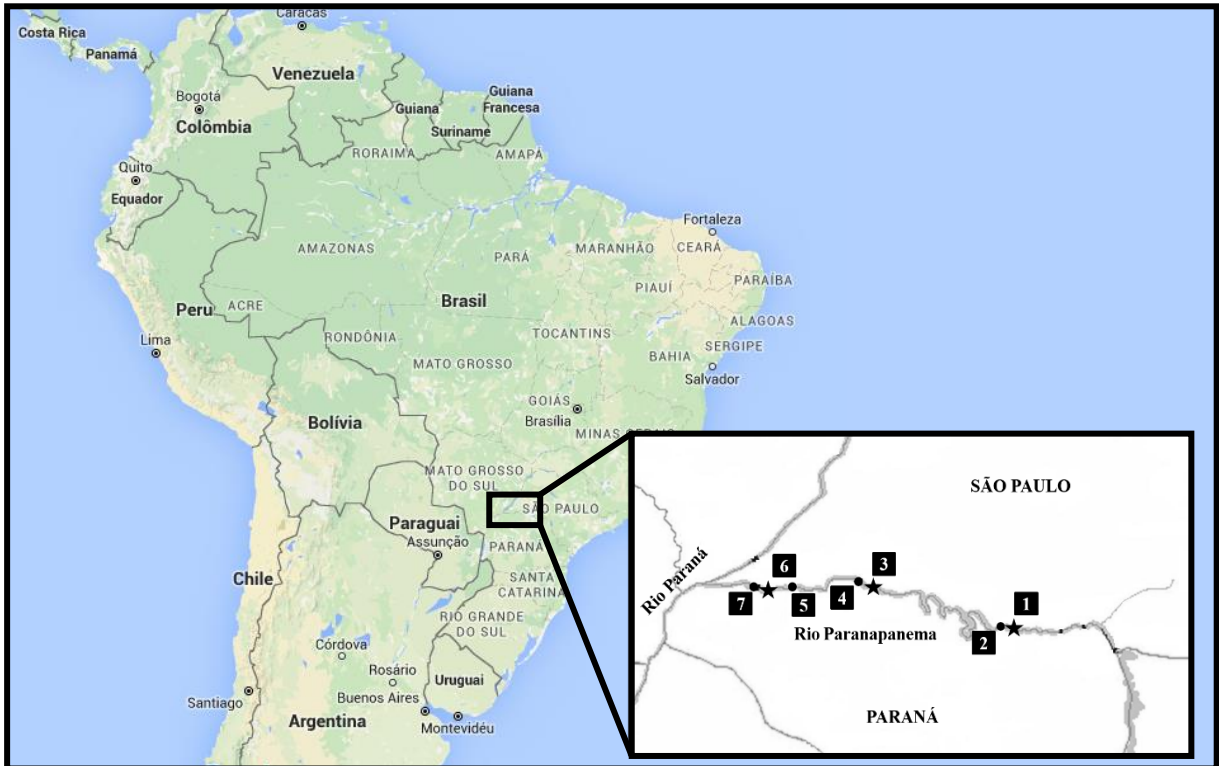
2. Material e métodos

2.1. Coleta do material biológico

As coletas foram realizadas em dezembro de 2014 em pisciculturas do Estado do Paraná localizadas em três reservatórios do rio Paranapanema (Figura 1; Tabela 1):

- Piscicultura Angola, denominada “PCAN” (Piscicultura Canoas I) por estar localizada no reservatório de Canoas I, próxima à cidade de Itambaracá e à Usina Hidrelétrica (UHE) Canoas I;
- Piscicultura Estância Alvorada, denominada “PCAP” (Piscicultura Capivara) por estar localizada no reservatório de Capivara, próxima à cidade de Alvorada do Sul e à UHE Capivara;
- Piscicultura da Universidade Estadual de Maringá, denominada “PROS” (Piscicultura Rosana) por estar localizada no reservatório de Rosana, próxima à cidade de Diamante do Norte e à UHE Rosana.

Figura 1 – Localização gráfica dos locais de coleta de amostras das três populações de *Limnoperna fortunei*: 1. PCAN - Piscicultura Canoas I; 2. UHE de Canoas I; 3. PCAP - Piscicultura Capivara; 4. UHE de Capivara; 5. UHE de Taquaruçu; 6. PROS - Piscicultura Rosana; 7. UHE de Rosana



Fonte: Google Maps, modificado pelo autor

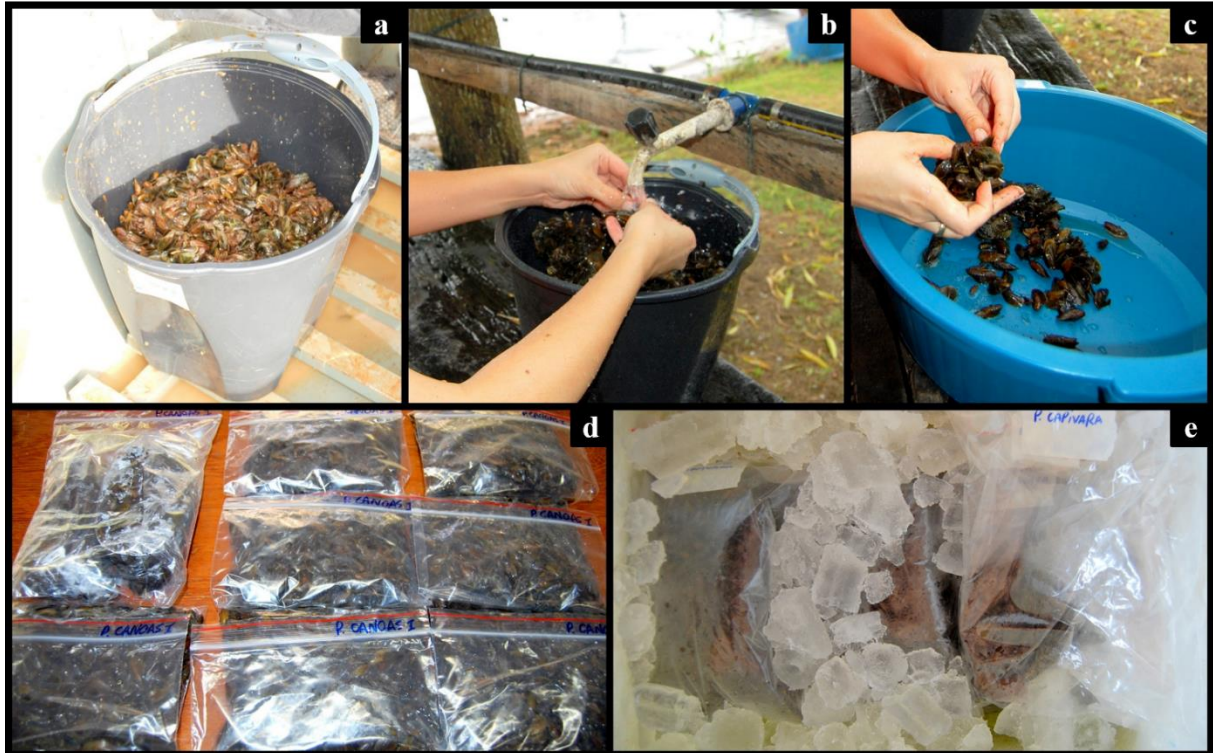
Tabela 1 – Identificação, localização e distância geográfica parcial e total (km) dos pontos de coleta e das UHE onde foram realizadas as coletas das amostras de *Limnoperna fortunei*

Identificação	Locais	Coordenadas	Distância parcial (km)
1	PCAN	22° 56' 25,63" S 50° 24' 49,86" W	Até 2: 10,1
2	UHE Canoas I	22° 56' 30,65" S 50° 31' 3,13" W	Até 3: 83,58
3	PCAP	22° 41' 17,16" S 51° 17' 51,30" W	Até 4: 7,05
4	UHE Capivara	22° 39' 22,79" S 51° 21' 27,22" W	Até 5: 66,28
5	UHE Taquaruçu	22° 32' 41,16" S 52° 0' 3,57" W	Até 6: 80,11
6	PROS	22° 39' 25,20" S 52° 46' 52,78" W	Até 7: 11,10
7	UHE Rosana	22° 36' 0,67" S 52° 52' 12,82" W	Até o Rio Paraná: 23,34
	Encontro: rio Paranapanema com rio Paraná	22° 39' 30,49" S 53° 5' 15,99" W	---
Distância total			281,56

PCAN: Piscicultura Canoas I; PCAP: Piscicultura Capivara; PROS: Piscicultura Rosana

As coletas foram realizadas em pisciculturas que utilizam o sistema de produção com tanques-rede com cultivo de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). A coleta dos moluscos foi feita através da extração mecânica das colônias, as quais permaneciam fixadas nas telas dos tanques-rede. Após a retirada, conforme ilustrado na Figura 2.a, os mexilhões foram colocados em baldes e levados para locais próximos onde foram limpos retirando todo e qualquer tipo de sujeira superficial (lodo, barro, etc.) (Figura 2.b). Em seguida, os moluscos foram mantidos por duas horas em bacias com gelo (5°C aproximadamente) para insensibilização e abate, sendo realizada logo depois a separação das colônias mantendo os mexilhões soltos individualmente (Figura 2.c). Nessa fase, foi feita uma nova limpeza para retirada de sujeiras que permaneciam entre os mexilhões, colocando-os em sacos plásticos identificados (Figura 2.d). Estes sacos foram fechados e colocados dentro de caixas térmicas com gelo (Figura 2.e) para realização do transporte até o laboratório onde foram analisados.

Figura 2 – Detalhamento das coletas e cuidados aplicados durante as coletas de *L. fortunei*: a. Mexilhões coletados e mantidos no balde antes da primeira limpeza; b. Limpeza dos mexilhões coletados; c. Separação das colônias e nova limpeza dos mexilhões após a insensibilização e abate; d. Mexilhões ensacados e identificados; e. Mexilhões armazenados em caixas térmicas com gelo para transporte



Fonte: O próprio autor

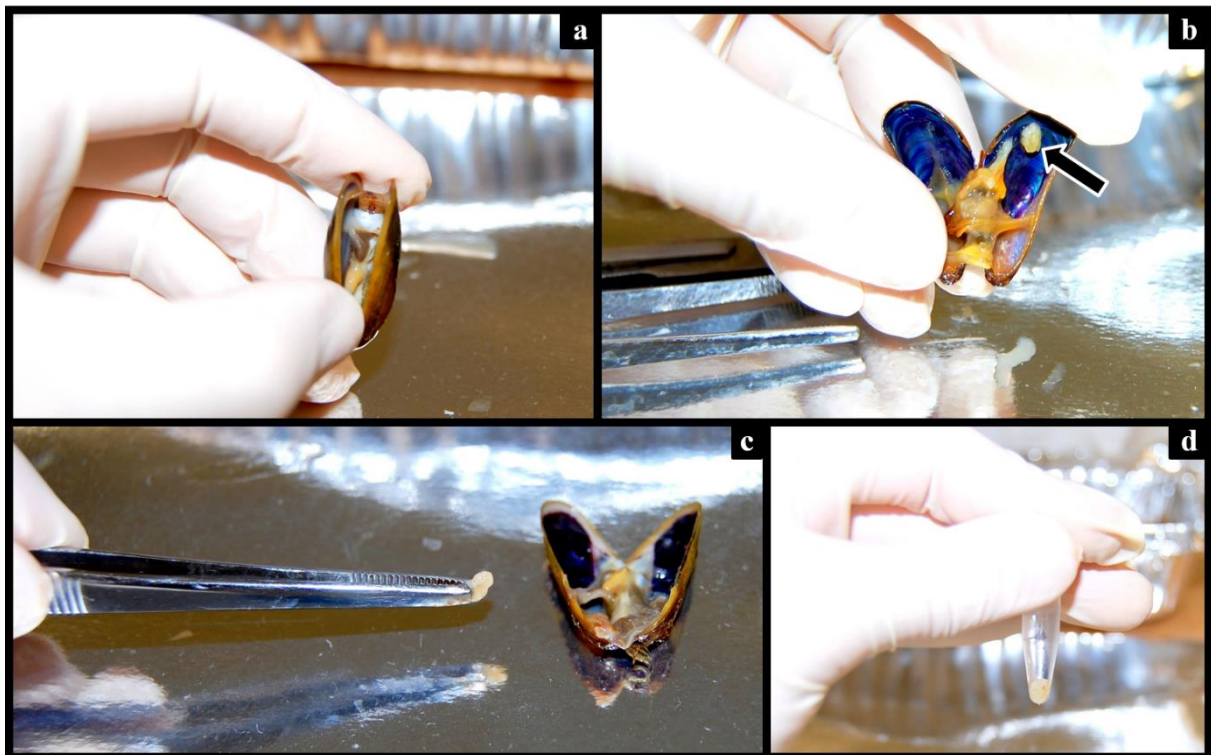
2.2. Extração e quantificação do DNA

Na extração do DNA foi utilizado o protocolo adaptado da metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008), realizada nas instalações do Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Estudo e Pesquisa em Aquicultura e Genética da Universidade Estadual de Londrina (UEL),

Setenta e cinco mexilhões (25 amostras por piscicultura) foram analisados no total. A concha do mexilhão foi aberta (Figura 3.a), sendo identificado (Figura 3.b) e retirado o músculo adutor (Figura 3.c), com o uso de uma pinça através de secção no local de inserção (base). A amostra foi lavada com álcool absoluto e em seguida, a amostra foi inserida em microtubo estéril onde foi mantida a temperatura ambiente por 10 minutos para a evaporação do álcool residual (Figura 3.d). Após esse período, foram adicionados às amostras 700 μL de tampão lise, 50 μL de SDS (20%) e 15 μL de proteinase K (200 $\mu\text{L mL}^{-1}$), sendo

condicionadas em banho maria a 50°C por 17 horas. Logo depois, retirou-se o microtubo do banho maria e adicionou-se 700 µL de NaCl 5M, sendo misturada a solução por inversão. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm.

Figura 3 – Detalhamento da retirada do músculo adutor dos mexilhões dourados, utilizado para extração de DNA: a. Mexilhão ainda fechado devido o músculo adutor; b. Músculo adutor localizado no canto superior da valva direita do mexilhão (seta); c. Extração do músculo através do uso de uma pinça; d. Músculo adutor armazenado para posterior extração do DNA



Fonte: O próprio autor

Após a centrifugação foram retirados 800 µL do sobrenadante de cada amostra. Esse sobrenadante foi acondicionado em um novo microtubo estéril, adicionando-se 700 µL de etanol absoluto gelado na solução, com objetivo de precipitar o DNA. Para aumentar a eficiência deste processo, os microtubos foram armazenados no freezer a -20°C por duas horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm sendo em seguida desprezado todo o etanol, as amostras foram secas em temperatura ambiente por 30 minutos. Foi adicionado 35 µL de TE (Tris e EDTA) e 5 µL de RNase (30 µg mL⁻¹). Após esse procedimento, a solução foi mantida em banho maria à 37°C por 40 minutos, após este procedimento as amostras foram armazenadas a -20°C.

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro PICODROP® (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom). As amostras foram diluídas para uma concentração de 30 ng μL^{-1} . Para conferir a qualidade do DNA extraído, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500 mmol L^{-1} Tris-HCl, 60 mmol L^{-1} ácido bórico e 83 mmol L^{-1} EDTA), por 1 hora, a 70 volts.

2.3. Amplificação e eletroforese capilar do DNA

A amplificação foi realizada nas instalações do Laboratório de Marcadores Moleculares e Citogenética de Plantas do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Para o estudo das regiões de microssatélites foram testados oito pares de *primers*, desenvolvidos previamente para *L. fortunei* por Zhan et al. (2012), conforme descrito na Tabela 2. Para a genotipagem foi utilizada a marcação indireta por fluoróforos, por meio do sistema que tem como base a adição de três *primers* na reação de PCR, conforme descrito por Schuelke (2000). Neste método, uma cauda de sequência M13 (TGTAACGACGGCCAGT) é adicionada na extremidade 5' do *primer*. As reações de amplificação foram preparadas com 4,5 μL de GoTaq Green Master Mix (tampão 2x, pH 8,5, 1600 μM dNTP e MgCl_2 3 mM; Promega, Winchester-USA), 0,08 μL de *primer forward* (5 pM), 0,3 μL de *primer reverse* (5 pM), e 0,3 μL de *primer M13* (5 pM), marcado com um fluoróforo (Ned, Hex, 6-Fam) (5 pM), 1 μL de DNA (30 ng/ μL) e 3,82 μL de água livre de nucleases para ajustar o volume final para 10 μL .

Tabela 2 – Sequências de pares de *primers* testados para o *Limnoperna fortunei*

Primers		Sequência 5'-3'	TA	Motivo	Pb
Lf04	HQ843811	F: M13-GTTGAAGCGGTCACTAAAGG R: GATGCGGAATTGTGGCAAGAGC	50	(AC) ₉	148-346
Lf06	HQ843812	F: M13-CACAAATCACCCATTACAC R: TTTCTAGTACCTTTTCGCGT	54	(AC) ₆ ...(AC) ₄ ... (AC) ₅ ...(AC) ₉	129-263
Lf07	HQ843813	F: M13-TGTTAGGAGGCAGTAAGTCT R: GTTTTCAAGCAGCAATGTAG	50	(AC) ₈ ...(AC) ₂₂ ... (AC) ₁₅	196-292
Lf19	HQ843814	F: M13- GGAAATAGGAAAATAGGCACTC R: TGAATTCGTTGAGGAGGTGG	50	(GA) ₂₃	167-289
Lf21	HQ843815	F: M13-GTAATGCTCAGTCTTCTTGGGT R: TTACGAACCGTTGATGTGC	50	(GT) ₄ ...(CAAT) ₁₇	197-349
Lf22	HQ843816	F: M13-ACAGTAATGGAAGCAGGAGG R: TTGATTTGTAAGCAGAACCG	56	(TTGA) ₆	196-232
Lf23	HQ843817	F: M13-TCGACGATCCGACGAATGTC R: ATACCACCGCTGCCCAAAGG	56	(AC) ₉	134-174
Lf38	HQ843818	F: M13-TATGACAAATGGGTGACTAC R: TATACGGTGTCTGGTGCCTGC	56	(AC) ₂₁	200-246

TA: Temperatura de anelamento; pb: Tamanho de pares de bases

Fonte: Zhan et al. (2012)

As reações de PCR foram feitas utilizando-se termociclador PTC200 (MJ Research, Massachusetts-USA), no programa de gradiente. Todos os oito *primers* foram testados, no entanto apenas cinco foram utilizados, por apresentarem os resultados esperados: foram polimórficos e amplificaram alelos microssatélite consistentes e reproduzíveis. Estes cinco *primers* foram submetidos aos ciclos de PCR que consistiam em 1 ciclo de 94°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, T°C de anelamento específica para cada *primer* por 30s, e 72°C por 30s; seguindo de uma extensão final de 72°C por 10 minutos. Através do programa de gradiente foi possível estabelecer a melhor temperatura de anelamento para cada *primer* utilizados (Tabela 3). O produto final da amplificação foi submetido à eletroforese capilar no sequenciador automático 3500xL (Applied Biosystems, Califórnia-USA) com as reações Formamida Hi-Di – 8,8 µL, GeneScan LIZ600 Size Standard – 0,2 µL e DNA (PCR) – 1 µL.

Tabela 3 – Detalhamento do tamanho de pares de bases e das temperaturas de alelamento para cinco pares de *primers* amplificados

<i>Primers</i>	Lf06	Lf07	Lf21	Lf22	Lf23
Pb	148-258	201-230	261-291	193-225	57-154
TA	57,2	50,0	52,0	55,2	50,0

Pb: Tamanho de pares de bases; TA: Temperaturas de alelamento

2.4. Análise estatística

Foi utilizado o programa Gene Marker v. 2.6, que permite determinar o tamanho dos alelos, usando como padrão o marcador de peso molecular GeneScan™ 600-LIZ® Size Standard (Life Technologies, Califórnia-USA). Por meio de matrizes de dados os resultados foram organizados e submetidos aos seguintes programas computacionais:

a) FSTAT (Goudet, 2014) aplicado para a análise do número de alelos por loco, o número de alelos efetivos, riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada e o coeficiente de endogamia (Fis), onde para cada população foi realizada a correção de Bonferroni, a fim de verificar se estas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg;

b) POPGENE (Yeh et al., 1999) utilizado para determinar a distância genética;

c) MICRO-CHECKER 2.2.3. (Van Oosterhout et al., 2004) usado para detectar possíveis alelos nulos, como bandas *Stutter* que ocorrem durante a PCR e afeta a leitura dos SSRs;

d) BOTTLENECK (Cornuet; Luikart 1996) utilizado para verificar se as populações passaram por gargalo genético recente, levando em conta os três modelos evolutivos para locos de SSRs (IAM - Infinite Allele Model, TPM - Two Phase Model e SSM - Stepwise Mutation Model);

e) ARLEQUIN v. 3.11 (Excoffier et al., 2005) utilizado na análise de variância molecular (AMOVA), no índice de fixação alélica (Fst) e no desequilíbrio de ligação. Como método de diferenciação dos valores de Fst foi utilizada a definição de Wright (1978), no qual os valores entre 0,00 a 0,05; 0,051 a 0,15; 0,151 a 0,25 e > 0,25 indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética;

f) BAYESASS (Wilson; Rannala, 2003) aplicado para estimar o fluxo gênico pelo método bayesiano;

g) BIOESTAT 5.0 (Ayres et al., 2007) para verificar uma possível correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas (teste de Pearson);

h) STRUCTURE v.2.3.3 (Pritchard et al., 2000) usado para identificar a formação de grupos (K) de populações geneticamente similares, seguindo o modelo misto de *clusters* com período de comprimento de 10000 e 100000 repetições e o número de *clusters*, os resultados foram interpretados com o uso do software Structure Harvester.

i) GENEPOP v.3.4 (Raymond; Rousset, 1995) foi utilizado para calcular o teste exato de equilíbrio de Hardy–Weinberg;

j) MEGA versão 5.0 (Tamura et al., 2011) para a construção de um dendrograma obtido a partir de uma matriz de distância genética de Nei (1978), usando o método de agrupamentos UPGMA;

k) TFGA 1.3 (Miller, 1997) utilizado para verificar o nível de significância do coeficiente de endogamia (Fis) e realização do bootstrap, aplicado para avaliar o grau de confiança do dendrograma.

3. Resultados

Três dos oito *loci* utilizados (Lf04, Lf19 e Lf38) não amplificaram ou apresentaram resultados inespecíficos, razão pela qual foram excluídos das análises. Os cinco *loci* utilizados (Lf06, Lf07, Lf21, Lf22 e Lf23) foram polimórficos e amplificaram alelos microssatélite consistentes e reproduzíveis, com tamanhos esperados entre 57 pb (Lf23) e 291 pb (Lf21). No total, 38 alelos foram detectados para os 75 indivíduos das três populações naturais de *L. fortunei*. O *locus* que apresentou maior número de alelos (Na) foi o Lf06 (12 alelos), seguido do Lf07 e Lf23 (07 alelos) e Lf21 e Lf22 (06 alelos). O número de alelos (Na) por *locus* variou de 26 (Lf06) a 13 (Lf22). Foi identificada uma baixa frequência de alelos nulos (05 alelos = 13,1%) nas populações de *L. fortunei* estudadas (PCAN: Lf06 e Lf07; PROS: Lf06 e Lf22; PCAP: Lf06).

Considerando os resultados apresentados para verificar as estimativas dos parâmetros de diversidade genética dos cinco *loci* utilizados (Tabela 4), a média do número de alelos (Na) por população caracterizou-se entre 7,0 (PROS) a 4,6 (PCAN). Os valores médios de riqueza alélica (Ra) foram diferentes entre as populações ($P < 0,05$) sendo menor em PCAN. A média do número de alelos efetivos (Ae) variou de 2,032 (PCAN) a 3,282 (PROS), com um valor médio entre as populações de 2,493. Houve diferença ($P < 0,05$) entre a heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He) para todos os *loci*, sendo He maior que Ho em todas as populações. Esses valores caracterizaram-se pelo desequilíbrio de Hardy-Weinberg. A Ho média em cada população apresentou valores entre 0,457 (PROS) e 0,275 (PCAN). O

Coefficiente de endogamia (Fis) apresentou valor médio positivo significativo para todas as populações.

Tabela 4 – Estimativas de parâmetros genéticos de diversidade em cinco locos de microssatélites para as três populações (Pop) de *L. fortunei*. * Significativo ao nível de 5% para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg e para o coeficiente de endogamia (Fis)

<i>Primers</i>	Pop	Na	Ra	Ae	Ho	He	Fis
Lf06	PCAN	07	6.919	2,717	0,400	0,645*	0,385*
	PROS	11	10.466	4,032	0,560	0,767*	0,274*
	PCAP	08	7.639	3,858	0,560	0,756*	0,263*
Lf07	PCAN	05	5,000	3,085	0,368	0,694*	0,476*
	PROS	06	6,000	4,060	0,600	0,773*	0,228*
	PCAP	05	4,950	2,469	0,500	0,610*	0,185*
Lf21	PCAN	04	3,998	1,797	0,125	0,453*	0,728*
	PROS	06	5,999	4,100	0,304	0,773*	0,612*
	PCAP	04	3,946	1,743	0,360	0,435*	0,176*
Lf22	PCAN	03	2,946	1,331	0,280	0,254	-0,105*
	PROS	06	5,464	1,846	0,280	0,468*	0,406*
	PCAP	04	3,913	1,357	0,2083	0,269*	0,228*
Lf23	PCAN	04	3,652	1,229	0,200	0,190	-0,053*
	PROS	06	5,543	2,370	0,542	0,590	0,084*
	PCAP	04	3,890	1,398	0,320	0,291	-0,103*
Média	PCAN	(23) 4,6	4,503	2,032	0,275	0,447*	0,391*
	PROS	(35) 7,0	6,694	3,282	0,457	0,674*	0,327*
	PCAP	(25) 5,0	4,867	2,165	0,390	0,472*	0,178*

Pop: Populações dos mexilhões; Na: número de alelos por população; Ra: Riqueza alélica; Ae: número de alelos efetivos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; Fis: coeficiente de endogamia; PCAN: Piscicultura Canoas I; PCAP: Piscicultura Capivara; PROS: Piscicultura Rosana

Os resultados para os três modelos de mutação utilizados indicaram que nas populações não estão ocorrendo redução significativa do tamanho populacional em um curto período de tempo, portanto o efeito Bottleneck recente não foi observado (Tabela 5).

Tabela 5 – Testes para excesso e deficiência de heterozigotos nas três populações de *L. fortunei*

População	He	Heq	P	Heq	P	Heq	P
	I.A.M.			T.P.M.		S.M.M.	
PCAN	0,445	0,523	0,262	0,583	0,196	0,638	0,117
PROS	0,674	0,678	0,161	0,728	0,121	0,777	0,188
PCAP	0,472	0,555	0,315	0,614	0,178	0,670	0,059

I.A.M.: Infinite allele model; T.P.M.: Two-phase model; S.M.M.: Stepwise mutation model; He: heterozigosidade esperada pelo Equilíbrio de Hardy-Weinberg; Heq: heterozigosidade esperada sob equilíbrio de mutação e deriva. PCAN: Piscicultura Canoas I; PCAP: Piscicultura Capivara; PROS: Piscicultura Rosana

Utilizando a análise de variância molecular (AMOVA) identificou-se maior variabilidade genética dentro do que entre os três agrupamentos das populações estudadas (Tabela 6). Por outro lado, o índice de fixação demonstrou uma pequena diferenciação genética entre elas, de acordo com a definição de Wright (1978), na qual valores entre 0,00 a 0,05; 0,051 a 0,15; 0,151 a 0,25 e > 0,25 indicam pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente. Em termos comparativos, PCAN x PROS apresentou o maior valor (0,0502) e PCAN x PCAP o menor (0,0042). Foram observadas associações significativas ($P = 0,05$) de desequilíbrio de ligação nas análises par a par realizadas para os *loci* estudados em todas as populações. Em PCAN foram observadas 04 associações, 05 em PROS e 04 em PCAP.

Tabela 6 – Análise de variância molecular (AMOVA) e índice de fixação (Fst) para as três populações de *L. fortunei*. Nível de significância de 1023 permutações

Fonte de variação	G.L	Soma de quadrados	Componentes da variância	Porcentagem de variação	Fst
PCAN x PROS					
Entre populações	1	0,980	0,00342	5,02	0,0502
Dentro populações	98	79,260	0,80878	94,98	
Total	99	80,240	0,81220		
PCAN x PCAP					
Entre populações	1	2,810	0,04186	0,42	0,0042
Dentro populações	98	70,260	0,71694	99,58	
Total	99	73,070	0,75880		
PROS x PCAP					
Entre populações	1	3,550	0,05020	4,60	0,0460
Dentro populações	98	101,940	1,04020	95,40	
Total	99	105,490	1,09040		

PCAN: Piscicultura Canoas I; PCAP: Piscicultura Capivara; PROS: Piscicultura Rosana; G.L: graus de liberdade

No estudo da análise bayesiana para o número de migrantes, foi identificada a ocorrência de fluxo gênico em todas as populações. A menor taxa de fluxo gênico foi verificada em PROS com uma porcentagem de 0,010 migrantes oriundos de PCAP e a maior foi observada em PCAP, com 0,213 oriundos de PROS (Tabela 7).

Tabela 7 – Médias e intervalo de confiança a 95% (IC) das distribuições de proporção de indivíduos não-migrantes e migrantes para as populações de *L. fortunei*, com base no método de atribuição bayesiana. * Significativo ao nível de 5% para o número de migrantes

População	Não migrantes	Migrantes
PCAN	0,788	0,110 (PROS)*; 0,101 (PCAP)*
PROS	0,785	0,205 (PCAN)*; 0,010 (PCAP)*
PCAP	0,766	0,020 (PCAN)*; 0,213 (PROS)*

PCAN: Piscicultura Canoas I; PCAP: Piscicultura Capivara; PROS: Piscicultura Rosana

Os resultados mostraram baixos valores de distância genética, sendo observada a maior entre PCAN e PROS e a menor entre PCAN e PCAP. Houve correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica pelo teste de correlação de Pearson ($r = 0,9119$; $R^2 = 0,8316$; $p = 0,0000$) para todos os agrupamentos de populações (Tabela 8).

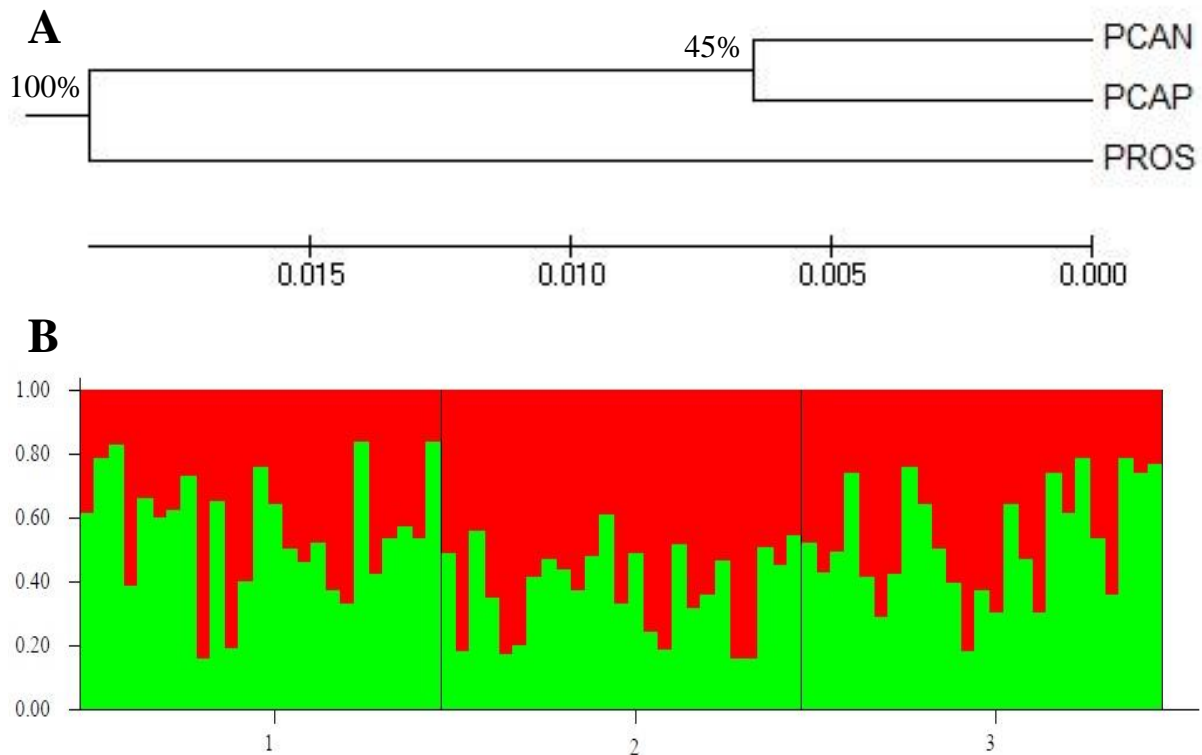
Tabela 8 – Distância geográfica em km (acima da diagonal) e valores de distância genética de Nei (1978) (abaixo da diagonal) das populações de *L. fortunei* estudadas

População	PCAN	PROS	PCAP
PCAN	-	247,12	94,92
PROS	0,058	-	152,20
PCAP	0,022	0,049	-

PCAN: Piscicultura Canoas I; PCAP: Piscicultura Capivara; PROS: Piscicultura Rosana

O dendrograma a partir da distância genética de Nei (1978) mostrou a formação de dois agrupamentos: um formado pelas populações PCAN e PCAP e outro formado individualmente por PROS, entretanto, os dois agrupamentos estão geneticamente relacionados (Figura 4A). A análise de agrupamento populacional mostrou um $K = 2$, com similaridade genética entre as três populações e maior proximidade entre PCAN e PCAP, corroborando com os dados gerados pelo dendrograma (Figura 4B).

Figura 4 – Análise gráfica da estrutura genética nas três populações analisadas de *L. fortunei*: A. Dendrograma gerado pelo método de agrupamento UPGMA, conforme distância genética de Nei (1978); B. Agrupamentos ($K = 2$) formados pela análise de estrutura populacional - 1. PCAN: 2. PROS: 3. PCAP



Fonte: O próprio autor

4. Discussão

*Variabilidade genética do *Limnoperna fortunei**

Os *loci* utilizados foram altamente polimórficos e amplificaram alelos microssatélite consistentes e reproduzíveis. De acordo com Fopp-Bayat et al. (2010) um elevado grau de polimorfismo implica que cada *locus* é informativo e pode ser usado em estudos populacionais.

Não foram encontrados números significativos de alelos nulos. Esse resultado pode ter sido influenciado pela proximidade genética entre as populações que mantiveram conservadas as regiões flangeadoras dos microssatélites. Por outro lado, a alta repetibilidade e polimorfismos com o qual os *primers* foram selecionados podem ter contribuído para incrementar a qualidade das amplificações, diminuindo a presença de alelos nulos.

A riqueza alélica (R_a), que caracteriza o número de alelos que segregam numa determinada população (Caballero et al., 2010), foi maior em PROS do que em PCAN e PCAP. Por outro lado, o número de alelos efetivos (A_e), que é o número de alelos igualmente frequentes necessário para se atingir o valor determinado de heterozigosidade esperada (H_e), também foi maior em PROS e menor em PCAN e PCAP. Esses resultados foram similares para a heterozigosidade observada (H_o) e H_e , os quais mostraram diferença ($P < 0,05$) entre as heterozigosidades em todas as populações. Essa diferença caracterizou-se pelo déficit de heterozigotos sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Contudo, os resultados médios de H_o , R_a e N_e foram altos para as populações o que caracterizou uma adequada variabilidade genética intra-populacional indicando que, apesar do déficit de heterozigotos observado, a variabilidade foi mantida. Zhan et al. (2012) e Ghabooli et al. (2013) observaram valores menores de H_o no rio Baía (0,2285), Corumbá (0,2214) e Itaipú (0,2802) em relação a PROS e PCAP. Já para PCAN o valor médio de H_o (0,275) foi menor em comparação com os mesmos autores. Holland (2001) ao analisar a bioinvasão de *Perna* no Golfo do México observaram alta variação genética dentro das populações e baixa diferenciação populacional, este fato foi atribuído às condições nas quais foi realizada a invasão, como por exemplo, a mais de um evento de introdução, a introdução de um alto número de larvas de várias populações geneticamente distintas ou a introdução de um alto número de larvas de uma única população de origem geneticamente diversa.

O déficit de heterozigotos pode surgir pela presença de alelos nulos (Aung et al., 2010), efeito Wahlund ou a combinação de ambos (Hatanaka et al., 2006), por endogamia

(O'Connell; Wright, 1997), ou pelo efeito Bottleneck (González-Wanguemert et al., 2012). A análise realizada através do programa Micro-Checker não apontou a presença de um grande número de alelos nulos o que descarta a sua influência. Acredita-se que o efeito Wahlund, definido como a inclusão de indivíduos de uma amostra que se originou a partir de populações geneticamente diferenciadas (Hartl; Clark, 2007) não influenciou os resultados, já que as amostragens foram realizadas em diferentes locais separados geograficamente, os quais por sua vez, apresentavam fragmentação do habitat causado por barreiras naturais e artificiais. Igualmente, o efeito Bottleneck, definido como uma redução significativa do tamanho populacional em um período curto de tempo, não teve influência nas populações amostradas pelos três modelos de mutação avaliados. Dessa forma, a influência de um processo de endogamia pode ser a explicação mais lógica do déficit de heterozigotos observado. Essa influência foi corroborada pelos resultados positivos da média do coeficiente de endogamia (Fis) os quais são um indício de que o desvio do EHW se deva a um excesso de homozigotos.

*Estrutura genética do *Limnoperna fortunei**

Os parâmetros utilizados para analisar a estrutura genética das populações mostraram com clareza a existência de similaridade genética entre as populações estudadas. A análise de variância molecular (AMOVA) identificou maior variabilidade genética dentro das populações do que entre as três populações estudadas e o índice de fixação (Fst) demonstrou uma pequena diferenciação genética entre elas, PCAN x PROS apresentou o maior valor (0,0502) e PCAN x PCAP o menor (0,0042). Igualmente, foi identificada a ocorrência de fluxo gênico em todas as populações, pequena distância genética entre as populações e correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica. Finalmente, corroborando os resultados, o dendrograma a partir da distância genética de Nei (1978) mostrou a formação de dois agrupamentos: um formado pelas populações PCAN e PCAP e outro formado individualmente por PROS sendo confirmado pela análise de agrupamento populacional (K = 2). Pelo ineditismo da presente pesquisa, não existem estudos prévios de estrutura genética realizados nas regiões amostradas que permitam uma confrontação científica dos resultados. Somente dois artigos publicados por Zhan et al. (2012) e Ghabooli et al. (2013) numa população do rio Baía - Alto rio Paraná foram encontrados, porém sem muita relação com as condições experimentais da presente pesquisa.

Em relação à discussão da similaridade entre as populações de *L. fortunei* amostradas no presente estudo, três situações devem ser explanadas: 1) Nas Américas, *L. fortunei* foi

registrado pela primeira vez no rio de la Plata - Argentina em 1991 no Balneário de Bagliardi (Pastorino et al., 1993). A partir desse ponto invadiu de forma ascendente o Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil num período de oito anos e a uma velocidade de 240 km por ano (Brugnoli et al., 2005; Darrigran; Drago, 2000). No Brasil, esse mexilhão foi registrado pela primeira vez em 1998, no Rio Grande do Sul, junto ao delta do rio Jacuí, em frente ao porto de Porto Alegre, de acordo com a pesquisa realizada por Mansur et al. (2003), em seguida, na bacia do lago Guaíba no final de 1999, sendo encontrado na Lagoa dos patos dois anos depois (Mansur et al., 1999). Posteriormente, foi relatada a sua presença na bacia dos rios Paraguai e Paraná e ecossistemas aquáticos da região do Pantanal (Darrigran; Pastorino, 2003; Oliveira et al., 2006) e dos Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. No Estado do Paraná tem sido reportada a presença deste molusco desde o ano 2002 (Zanella; Marena, 2002; Campos et al., 2012; Pestana et al., 2010), sendo descrita a presença deste no rio Paranapanema (afluente do rio Paraná) e em várias hidrelétricas da região desde 2006 (Garcia et al., 2009; Mäder Netto, 2011). 2) Os pontos de amostragem realizados no rio Paranapanema (PCAN, PCAP e PROS) encontram-se separados por quatro Usinas Hidroelétricas (UHE) antes de desaguar suas águas no rio Paraná: Canoas I, Capivara, Taquaruçu e Rosana (ver Figura 1 e Tabela 1). Dessa forma, existe uma divisão espacial entre as populações criada pelas barragens artificiais. 3) Larvas (veliger) e adultos de *L. fortunei* apresentam habilidades natatórias limitadas contra correntes, sendo sua dispersão realizada principalmente por difusão passiva, o que resulta num fluxo principal de invasão seguindo as correntes, de jusante à montante (Ricciardi, 1998).

Ao analisar as situações expostas anteriormente três hipóteses iniciais deveriam ser propostas. A primeira hipótese a ser apreciada seria a ausência desse molusco invasor nos pontos amostrados, já que a migração teria que ter sido feita contra a correnteza natural do rio Paranapanema. Uma segunda hipótese seria que, mesmo ultrapassando essa dificuldade de migração, a presença de *L. fortunei* em PROS, PCAP e PCAN criaria uma condição propícia para a formação de subpopulações, já que no trajeto existem quatro barreiras artificiais representadas pelas UHE a montante. Finalmente, uma terceira hipótese seria caracterizada na obtenção de baixos níveis de variabilidade genética (por causa da subdivisão populacional) e formação de populações estruturadas para os três pontos de coleta. Os resultados da presente pesquisa desvirtuaram com clareza todas as hipóteses iniciais.

As bioinvasões aquáticas são realizadas através de vários vetores: barcos, bio-controle, escape de espécies transportadas (com fins ornamentais, agrícola ou de pesquisa), canais, aquicultura e combinados (Ruiz; Carlton, 2002). Belz (2006) somou como vetores de risco o

transporte de areia, a pesca (artesanal e esportiva), o abandono de fios de nylon e anzóis, a movimentação de embarcações no rio e o transporte por via terrestre de pequenos barcos. Entretanto, de acordo com Darrigran e Damborenea (2009), para as introduções de moluscos em particular se destacam três: item alimentício, peixes parasitados com larvas de bivalves e água de lastro. Pestana et al. (2010) ao avaliarem pontos amostrais nos rios Tibagi, Ivaí, Piquiri e Iguaçu (Paraná) em várias estações do ano, observaram a presença de *L. fortunei* nos ambientes (com exceção do rio Ivaí) atribuindo essa invasão a fatores antropogênicos.

A presença de *L. fortunei* à montante do ponto de encontro do rio Paraná com o rio Paranapanema certamente aconteceu por fatores antropogênicos. Em respeito a esta hipótese, quatro situações devem ser discutidas:

1. Avelar et al. (2004) revelou a presença do mexilhão no rio Paraná em 2002, à jusante da cidade de Rosana (22° 32' 56,9" S - 53° 2' 48" W) caracterizando a população como jovem e em pleno processo de colonização (comprimento de concha entre 12 a 13,5 mm). Desse local até o ponto de encontro do rio Paraná com o Paranapanema existe aproximadamente 13 km, ou seja, desde 2002 ou antes o mexilhão dourado já estava presente nessa área e iniciando a colonização no rio Paraná.
2. Se são comparadas essas informações com as fornecidas por Garcia et al. (2009) que determinou a presença do molusco invasor no rio Paranapanema (jusante de Canoas I e Canoas II) em 2006, pode verificar-se que possivelmente a invasão a esse rio demorou teoricamente em torno de quatro anos, período no qual já se encontrava presente em PCAN.
3. Segundo Brugnoli et al. (2005) e Darrigran e Drago (2000) a invasão ascendente do Uruguai, Paraguai, Bolívia e Brasil foi realizada num período de oito anos a uma velocidade de 240 km por ano. Do ponto de encontro do rio Paraná e Paranapanema até PCAN existem aproximadamente 281,56 km, ou seja, teoricamente num período de um ano este molusco teria invadido grande parte do rio Paranapanema. Entretanto, a presença do mexilhão somente foi verificada nesse local em 2006, ou seja, a velocidade de migração durante esses quatro anos foi teoricamente de 70,39 km por ano. Dessa forma, o mexilhão teria alcançado na teoria a UHE de Taquaruçu em pouco mais de um ano (114,55 km desde o ponto de encontro dos rios), a UHE Canoas I em dois anos e alguns meses (156,91 km) e PCAN em poucos meses (10,10 km).
4. Foi encontrada alta variabilidade genética, com ausência de estruturação populacional, ocorrência de fluxo gênico, correlação positiva entre a distância genética e a distância geográfica e sem presença do efeito Bottleneck.

Baseado nessas situações verificou-se que houve uma migração do *L. fortunei* através do rio Paranapanema mediada por um ou vários vetores, os quais permitiram ultrapassar as barreiras naturais (correnteza) e artificiais (UHE). Por causa dessas condições, em teoria, a velocidade de migração foi baixa (aproximadamente 70 km por ano), mas com a formação de colônias com alta variabilidade genética, sem estruturação nem redução do tamanho efetivo populacional, ou seja, formando um pool genético único para todo o trecho do rio amostrado (PROS até PCAN), indicando que a colonização destas áreas analisadas foram feitas por grande quantidade de indivíduos. De acordo com Holland (2001) quando uma população com baixa variabilidade genética invade um habitat heterogêneo e desconhecido, a probabilidade de fixação é reduzida. Pelo contrário, para populações invasoras com alta variabilidade genética está prevista uma fixação no ambiente evolutivamente superior.

Estratégias para controle do Limnoperna fortunei

Em publicações pioneiras sobre bioinvasões de moluscos já era determinada a importância da realização de estudos genéticos na compreensão de processos evolutivos associados ao efeito fundador, deriva genética, fluxo gênico, entre outras, que permitiriam compreender a introdução e estabelecimento de eventos invasivos (Holland, 2001). Porém, poucos estudos genéticos estão disponíveis para espécies como o *L. fortunei* na atualidade (Zhan et al., 2012; Ghabooli et al., 2013). O presente estudo permitiu verificar a variabilidade e a estrutura genética de populações de *L. fortunei* que impactaram pisciculturas localizadas em reservatórios do rio Paranapanema e determinar padrões teóricos de invasão. Ao verificar os importantes resultados obtidos, considera-se relevante a realização de novos estudos que poderiam ainda estar relacionados a variabilidade e estrutura genética destes moluscos invasores, porém verificando pontos de coletas em regiões diferenciadas das analisadas no rio Paranapanema. Por meio destes estudos, os controles aplicados neste rio terão uma base de informações mais completa e específica.

A ocorrência de fluxo gênico em todas as populações analisadas, ultrapassando as barreiras naturais (correnteza) e artificiais (UHE) nos permite concluir que qualquer controle aplicado deverá ser realizado igualmente e forma única para todo o trecho do rio Paranapanema, e não apenas em determinadas regiões. Através deste método, todas as populações do mexilhão dourado presentes no rio serão atingidas e controlados, sem o risco

de uma nova migração do *L. fortunei* ocorrer entre as barreiras e prejudicar o controle realizado.

Considerando que os fatores antropogênicos são os principais causadores da disseminação do *L. fortunei* à montante do ponto de encontro do rio Paraná com o rio Paranapanema, algumas medidas de controle poderiam ter uma maior contribuição quando direcionadas diretamente a eles. Tais como, uma melhor fiscalização nos locais de risco (isentos da presença do *L. fortunei*, porém próximos a locais contaminados) para impedir a saída despercebida destes moluscos, seja qual for a fase de desenvolvimento (larva ou adulto), evitando novas colonizações, ou até mesmo migrações entre locais já contaminados. Segundo Agudo-Padrón (2008), o estabelecimento de forças tarefa locais e regionais em locais considerados geograficamente vulneráveis a invasão, seriam as melhores medidas preventivas. Outra medida poderia estar relacionada a divulgação sobre todos os aspectos importantes referentes ao mexilhão dourado por meio de visitas a piscicultores e pescadores, ou através de meios eletrônicos ou jornais, para esclarecimento sobre este invasor, suas características, formas de disseminação e como evitá-la. De acordo com Agudo-Padrón (2008), em locais onde o molusco invasor foi encontrado, a aplicação de programas de educação ambiental sobre o problema, seriam formas adequadas para controlar seu rápido avanço.

5. Conclusões

Os resultados encontrados demonstraram que as populações do *Limnoperna fortunei*, coletadas no rio Paranapanema, apresentavam alta variabilidade genética, e apesar das barreiras naturais (correntezas), ou barreiras artificiais (usinas hidrelétricas), foram observadas similaridades entre as populações, com ocorrência de fluxo gênico entre elas.

Através dos dados apresentados, é possível concluir que os métodos de controles poderão obter melhores resultados quando realizados de forma única para todo o trecho do rio Paranapanema, e não apenas em determinadas regiões. Considerando também que os fatores antropogênicos são os principais agentes causadores da disseminação do *L. fortunei* nos locais analisados, medidas direcionadas a eles possibilitarão o controle do mexilhão dourado de forma mais efetiva. Contudo, para que outras medidas de controles possam ser verificadas, novas pesquisas avaliando a variabilidade e estrutura genética do *Limnoperna fortunei* deverão ser realizadas em locais ainda não verificados, ampliando a base de informações relacionadas a este invasor no rio Paranapanema e em outras regiões.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos pesquisadores, estudantes, técnicos e produtores envolvidos na obtenção e processamento das amostras.

Referências

- Agudo-Padrón, A.I. Vulnerabilidade da rede hidrográfica do estado de Santa Catarina, SC, ante o avanço invasor do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). Revista Discente Expressões Geográficas, v. 4, p. 75-103, 2008.
- Aung, O., Nguyen, T.T.T., Poompuang, S., Kamonrat, W., 2010. Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks and wild populations of mrigal, *Cirrhinus cirrhosus* in Myanmar. *Aquaculture* 299, 37-43.
- Avelar, W.E.P., Martim, S.L., Vianna, M.P., 2004. A new occurrence of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1856) (Bivalvia, Mytilidae) in the state of São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 64, 739-742.
- Ayres, M., Ayres, J.R.M., Ayres, D.L., Santos, A.S., 2007. Bioestat: 2.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológica e médicas. Sociedade Civil Mamirauá, Belém.
- Barbosa, F.G., Melo, A.S., 2009. Modelo preditivo de sobrevivência do Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) em relação a variações de salinidade na Laguna dos Patos, RS, Brasil. *Biota Neotropica* 9, 407-412.
- Belz, C.E., 2006. Análise de risco de bioinvasão por *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857): um modelo para a bacia do rio Iguaçu, Paraná. (Tese de Doutorado). Universidade Federal do Paraná. Curso de Pós-Graduação em Zoologia, Curitiba, PR.
- Brugnoli, E., Clemente, J., Boccardi, L., Borthagaray, A., Scarabino, F. 2005. Golden mussel *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) distribution in the main hydrographical basins of Uruguay: update and predictions. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77, 235-244.
- Caballero, A., Rodríguez-Ramilo, S.T., Ávila, V., Fernández, J., 2010. Management of genetic diversity of subdivided populations in conservation programmes. *Conservation Genetics* 11, 409-419.
- Campos, M.C.S., Lanzer, R., Castro, P.T., 2012. Hydrological stress as a limiting factor of the

- invasion of *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) in the Upper Paraná River (Brazil). *Acta Limnologica Brasiliensia*, 24, 64-82.
- Canzi, C., 2011. Avaliação da utilização do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei* Dunker, 1857) na elaboração de farinha para alimentação da tilápia (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758). Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca, Universidade Estadual do Oeste do Paraná. 53p.
- Cataldo, D., Boltovskoy, D., Hermosa, J.L., Canzi, C. 2005. Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei*, bivalvia: mytilidae. *Journal of Molluscan Studies* 71, 41-46.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Ecology Resources* 9, 1322-1332.
- Darrigran, D., Damborenea, C., 2009. Introdução a biologia das invasões: o Mexilhão Dourado na América do Sul: biologia, dispersão, impacto, prevenção e controle. São Carlos, São Paulo, Cubo Multimídia Ltda., 246 p.
- Darrigran, G., Drago, I.E., 2000. Invasion of the exotic freshwater mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in South America. *The Nautilus* 114, 69-73.
- Darrigran, G., Damborenea, M.C., Penchaszadeh, P., Taraborelli, C. 2003. Adjustments of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia : Mytilidae) after 10 years of invasion in America. *Journal of Shellfish Research* 22, 141-146.
- Darrigran, G.; Pastorino, G., 2003. The golden mussel *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) in the Neotropical region: a 10 years story of invasion. *Tentacle* 11: 8-9.
- Earl, Dent A; VonHoldt, Bridgett M. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing Structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4, 359-361.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1, 47-50.
- Fopp-Bayat, D., Jankun, M. and Kuzminski, H., 2010. Genetic characterization of Polish cultured brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), based on microsatellite DNA analysis. *Archives of Polish Fisheries* 18, 93-99.
- Garcia, D.A.Z., Orsi, M.L., Casimiro, A.C.R., Kurcheski, G., 2009. Registro de ocorrência de *Limnoperna fortunei* no médio e baixo Paranapanema: uma ameaça as suas águas. *Anais do*

IX Congresso de Ecologia do Brasil, São Lourenço – MG.

Ghabooli, S., Zhan, A., Sardiña, P., Paolucci, E., Sylvester, F., Perepelizin, P.V., Briski, E., Cristescu, M.E., MacIsaac, H.J., 2013. Genetic diversity in introduced Golden mussel populations corresponds to vector activity PLoSOne 8, 1-12.

Giordani, S., 2013. O que é o mexilhão dourado. Sanare -Revista Técnica da Sanepar 20, 03-05.

González-Wanguemert, M., Fernández, T.V., Pérez-Ruzafa, A., Giacalone, M., D'Anna, G., Badalamenti, F., 2012. Genetic considerations on the introduction of farmed fish in marine protected areas: The case of study of white seabream restocking in the Gulf of Castellammare (Southern Tyrrhenian Sea). Journal of Sea Research 68, 41-48.

Goudet J., 2014. FSTAT: a program to estimate and test diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution.

Hartl, D.L., Clark, A.G., 2007. Principles of Population Genetics (Fourth edition). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., Galetti Jr, P.M., 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. Genetica 126, 153-159.

Holland, B.S., 2001. Invasion without a Bottleneck: microsatellite variation in natural and invasive populations of the Brown mussel *Perna perna* (L). Marine Biotechnology 3, 407-415.

Lopera-Barrero N.M., J.A. Povh, R.P. Ribeiro, P.C. Gomes, C.B. Jacometo y T.S. Lopes. 2008. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sódio. Cien. Inv. Agr., 35(1): 77-86.

Lösch, J.A. Boscolo, W.R., Feiden, A., Lorenz, E.K., Bittencourt, F., 2009. Presença de mexilhão dourado no trato gastrointestinal de três espécies nativas de peixes cultivados em tanques-rede no reservatório de Itaipu. In: Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, 1, Cascavel: Anais... Toledo: UNIOESTE.

Mäder Netto, O.S., 2011. Controle da incrustação de organismos invasores em materiais de sistemas de resfriamento de usinas hidrelétricas. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Engenharia, 112 p.

- Magara, Y., Matsui, Y., Goto, Y., Yusa, A. 2001. Invasion of the non-indigenous nuisance mussel, *Limnoperna fortunei*, into water supply facilities in Japan. *Journal of Water Supply: research and technology* 50, 113-124.
- Mansur, M.C.D., Richinitti, L.M.Z., Santos, C.P. Dos. 1999. *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), molusco bivalve invasor na bacia do Guaíba, Rio Grande do Sul, Brasil. *Biociências* 7, 147-149.
- Mansur, M.C.D., Santos, C.P., Darrigran, G., Heydrich, I., Callil, C.T., Cardoso, F.R., 2003. Primeiros dados quali-quantativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. *Revista Brasileira de Zoologia* 20, 75-84.
- Miller, M. TFGA (Tools for population genetic analyses). Version 1.3: a windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data, 1997.
- Ministério do Meio Ambiente, 2004. Plano de ação emergencial: força-tarefa nacional para controle do mexilhão dourado. Brasília. Abril.
- Mu, X.D., Hu, Y.C., Wang, X.J., Song, H.M., Yang, Y.X., Luo, J.R., 2011. Genetic variability in cultured stocks of *Scleropages formosus* in Mailand China revealed by microsatellite markers. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 10, 555-561.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.
- Newell, N.D., 1969. Classification of bivalvia. In: Moore, R. (Ed). *Treatise on Invertebrate Paleontology*. Lawrence: University of Kansas. p. 205-223.
- O'Connell, M., Wright. J.M., 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 7, 331-363.
- Oliveira, M.D., Takeda, A.M., Barros, L.F., Barbosa, D.S.; Resende, E.K., 2006. Invasion by *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae) of the Pantanal wetland, Brazil. *Biol. Invasions*. 8, 97-104.
- Oliveira, M.D., Ayroza, D.M.R., Castellani, D., Campos, M.C.S., Mansur, M.C.D., 2014. O mexilhão dourado nos tanques-rede das pisciculturas das Regiões Sudeste e Centro-Oeste. *Panorama da Aqüicultura* 24, p. 22.
- Pastorino, G., Darrigran, G., Martin, S., Lunaschi, L., 1993. *Limnoperna fortunei* (Dunker,

- 1857) (Mytilidae), nuevo bivalvo invasor em águas Del Rio de la Plata. *Neotropica* 39 101-102.
- Pestana, D.; Ostrenski, A.; Tschá, M.K.; Boeger, W.A., 2010. Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 50, 553-559.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Ricciardi, A., 1998. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): Another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling* 13, 97-106.
- Ruckert, G.V., Campos, M.C.S., Rolla, M.E., 2004. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences* 26, 421-429.
- Ruiz, G.M., Carlton, J.T., 2003. Invasion vectors: a conceptual framework for management. In: Ruiz, G.M., Carlton, J.T. (Ed.), *Invasive Species: vectors and management strategies*. Island Press, Washington, 459-504.
- Rupert, E.E., Fox, R.S., Barnes, R.D. 2004. *Invertebrate Zoology*. 7th ed. Belmont: Brooks/Cole.
- Schuelke, M., 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18, 233-234.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., 2011. Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2731-2739.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535-538.
- Wilson, G.A., Rannala, B., 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163, 1177-1191.
- Wright, S., 1978. *Evolution and genetics of population*, Chicago: University of Chicago Press,

p. 580.

Yeh, F.C., Boyle, T.Y.Z., Xiyan, J.M., 1999. PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Alberta, AB: University of Alberta and Center for International Forestry Research. Available at www.ualberta.ca/~fyeh/.

Zanella, O.; Marena, L.D., 2002. Ocorrência de *Limnoperna fortunei* na Central Hidrelétrica de Itaipu. In: CONGRESSO LATINOAMERICANO DE MALACOLOGIA, 5.. Resumo... São Paulo: Instituto Butantan/ Instituto de Biociências-USP. p. 41.

Zhan, A., Perepelizin, P.V., Ghabooli, S., Paolucci, E., Sylvester, F., Sardiña, P., Cristescu, M.E., MacIsaac, H.J., 2012. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity in an invading mollusc in South America. *Diversity and Distributions* 18, 1042-1055.

6 CONCLUSÃO FINAL

Com a realização desta pesquisa foi possível verificar um levantamento genético de populações do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*), presentes nas pisciculturas com sistema de cultivo em tanques-rede, localizadas nos reservatórios de Canoas I, Capivara e Rosana, no Estado do Paraná. Os resultados encontrados demonstraram que as populações do *Limnoperna fortunei*, coletadas no rio Paranapanema, apresentavam alta variabilidade genética, e apesar das barreiras naturais (correntezas) ou barreiras artificiais (usinas hidrelétricas), foram observadas similaridades entre as populações, com ocorrência de fluxo gênico entre elas.

Através dos dados apresentados, é possível concluir que os métodos de controles poderão obter melhores resultados quando realizados de forma única para todo o trecho do rio Paranapanema, e não apenas em determinadas regiões. Considerando também que os fatores antropogênicos são os principais agentes causadores da disseminação do *L. fortunei* nos locais analisados, medidas direcionadas a eles possibilitarão o controle do mexilhão dourado de forma mais efetiva. Contudo, para que outras medidas de controles possam ser verificadas, novas pesquisas avaliando a variabilidade e estrutura genética do *Limnoperna fortunei* deverão ser realizadas em locais ainda não verificados, ampliando a base de informações relacionadas a este invasor no rio Paranapanema e em outras regiões.

REFERÊNCIAS

- AGUDO-PADRÓN, A.I. Vulnerabilidade da rede hidrográfica do estado de Santa Catarina, SC, ante o avanço invasor do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857). **Revista Discente Expressões Geográficas**, v. 4, p. 75-103, 2008.
- BARBOSA, F.G.; MELO, A.S. Modelo preditivo de sobrevivência do Mexilhão Dourado (*Limnoperna fortunei*) em relação a variações de salinidade na Laguna dos Patos, RS, Brasil. **Biota Neotrop.** v. 9, p. 407-412, 2009.
- BEVERIDGE, M.C.M. Cage aquaculture. Surrey, England: **Fishing News Books**, 1987.
- BORÉM, A.; SANTOS, F. R. **Biotecnologia simplificada**. 2 ed. Viçosa: UFV – Universidade Federal de Viçosa, 2004.
- BOEGER, W. A.; PIE, M. R.; FALLEIROS, R. M.; OSTRENSKY, A.; DARRIGRAN, G.; MANSUR, M. C. D.; BELZ, C. E. Testing a molecular protocol to monitor the presence of golden mussel larvae (*Limnoperna fortunei*) in plankton samples. **Journal of Plankton Research**. v. 29, p. 1015–1019, 2007.
- CANZI, C. **Avaliação da Utilização do mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei* Dunker, 1857) na elaboração de farinha para alimentação da tilápia (*Oreochromis niloticus linnaeus, 1758*)**. 2011. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Engenharia de Pesca), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Toledo, 2011.
- CAPÍTOLI, R.R.; COLLING, L.A.; BEMVENUTI, C.E. Cenários de distribuição do mexilhão dourado *Limnoperna fortunei* (Mollusca – Bivalvia) sob distintas condições de salinidade no complexo lagunar Patos-Mirim, RS – Brasil. **Atlântica**, Rio Grande. v. 30, p. 35-44, 2008.
- CATALDO, D.; BOLTOVSKOY, D.; HERMOSA, J.L.; CANZI, C. Temperature-dependent rates of larval development in *Limnoperna fortunei*, bivalvia: mytilidae. **Journal of Molluscan Studies**. v. 71, p. 41-46, 2005.

DARRIGRAN, G. A.; DAMBORENEA, C. A South American bioinvasion case history: *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857), the Golden mussel. **American Malacological Bulletin**. v. 20, p. 105-112, 2005.

DARRIGRAN, G.; DAMBORENEA, M.C.; PENCHASZADEH, P.; TARABORELLI, C. Adjustments of *Limnoperna fortunei* (Bivalvia: Mytilidae) after 10 years of invasion in America. **Journal of Shellfish Research**. v. 22, p. 141-146, 2003.

DARRIGRAN, G.; PASTORINO, G. The recent introduction of a freshwater Asiatic bivalve, *Limnoperna fortunei* (Mytilidae) into South America. **The Veliger**. v. 38, p. 171-175, 1995.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of World Fisheries and Aquaculture Opportunities and challenges**. Roma, p. 223, 2014.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1995.

FERREIRA, P. L.S.B. 2010. **Análise técnica de visitas a cultivos em tanques-rede em diferentes regiões do Brasil**. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia de aquicultura) – Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina. 2010.

GHABOOLIL, S.; ZHAN, A.; SARDIN, P.; PAOLUCCIL, E.; SYLVESTER, F.; PEREPELIZIN, P. V.; BRISKI, E.; CRISTESCU, M.; MACISAACL, H. J. Genetic Diversity in Introduced Golden Mussel Populations Corresponds to Vector Activity. Sharyn Jane Goldstien, University of Canterbury, New Zealand. **PLoS ONE**. v. 8, 2013.

GIORDANI, S. O que é o mexilhão dourado. **Sanare - Revista Técnica da Sanepar**, Curitiba. v. 20, p. 03-05, 2013.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Mundial 2014. **Produção Pecuária Municipal**. Rio de Janeiro. v. 42, p. 1-39, 2014.

LEOI, L. C. T. 2003. **Desenvolvimento de Marcadores Microsatélites (SSR) em *Archis hypogaea***. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciências Genômicas e Biotecnologia) – Universidade Católica de Brasília, Brasília, 2003.

LOPES, R. P.; DUARTE, M. R.; SILVA, E. P. A Genética e as invasões biológicas: dois estudos de caso de bivalves invasores do Brasil. **Genética na Escola**. Universidade Fluminense, Niterói. v. 9, p. 86-91, 2014.

LÖSCH, J. A.; BOSCOLO, W. R.; FEIDEN, A.; LORENZ, E. K.; BITTENCOURT, F. Presença de mexilhão dourado no trato gastrointestinal de três espécies nativas de peixes cultivados em tanques-rede no reservatório de Itaipu. In: Seminário Internacional de Ciência, Tecnologia e Ambiente, 1, 2009, Cascavel: **Anais...** Toledo: Unioeste, 2009.

MAGARA, Y.; MATSUI, Y.; GOTO, Y.; YUSA, A. Invasion of the non-indigenous nuisance mussel, *Limnoperna fortunei*, into water supply facilities in Japan. **Journal of Water Supply: research and technology**. v. 50, p. 113-124, 2001.

MANSUR, M. C. D.; SANTOS, C. P.; DARRIGRAN, G.; HEYDRICH, I.; CALLIL, C. T.; CARDOSO, F. R. Primeiros dados quali-quantativos do mexilhão-dourado, *Limnoperna fortunei* (Dunker), no Delta do Jacuí, no Lago Guaíba e na Laguna dos Patos, Rio Grande do Sul, Brasil e alguns aspectos de sua invasão no novo ambiente. **Revista Brasileira de Zoologia**. v. 20, p. 75-84, 2003.

MATIAS, J. F. N. Aquicultura e os desafios de produzir com sustentabilidade. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 25, 2015, Fortaleza: **Anais...** Fortaleza: ZOOTEC, 2015.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Plano de ação emergencial: força-tarefa nacional para controle do mexilhão dourado**. Brasília, p. 4, 2004.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Parques Aquícolas Continentais**. 2012. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/index.php/aquicultura/aguas-da-uniao/parques-aquicolas/parques-aquicolas-continentais>>. Acesso em 23 abr. 2015.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Potencial Brasileiro**. 2014a. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>> Acesso em 2 maio 2015.

MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção**. 2014b. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/producao>> Acesso em 4 maio 2015.

MARENGONI, N. G.; KLOSOWSKI, E. S.; OLIVEIRA, K. P.; CHAMBO, A. P. S.; JUNIOR, C. G. Bioacumulação de metais pesados e nutrientes no mexilhão dourado do reservatório da usina hidrelétrica de itaipu binacional. **Química Nova**, Cândido Rondon. v. 36, p. 359-363, 2013.

MONTALTO, L.; DRAGO, I.E. Tolerance to desiccation of an invasive mussel, *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) (Bivalvia, Mytilidae), under experimental conditions. **Hydrobiologia**. v. 498, p. 161-167, 2003.

NEWELL, N.D. Classification of Bivalvia. In: Moore, R. (Ed). **Treatise on Invertebrate Paleontology**. Lawrence: University of Kansas, p. 205-223, 1969.

OECD – FAO. **Agricultural Outlook 2015-2014**. Paris, 2015.

OLIVEIRA, M. D.; AYROZA, D. M. R.; CASTELLANI, D.; CAMPOS, M. C. S.; MANSUR, M. C. D. O mexilhão dourado nos tanques-rede das pisciculturas das Regiões Sudeste e Centro-Oeste. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro. v. 24, p. 22, 2014.

OLIVEIRA, K.P.; CHAMBO, A.P.S.; ESTEVEZ, R.L.; WILD, M.B.; CHAMBÓ, E.D.; MARENGONI, N.G. Teores de N, P, K, Ca e Mg no *Limnoperna fortunei* no reservatório da usina de Itaipu Binacional. In: XIX Encontro Anual de Iniciação Científica - EAIC, 19, 2010, Guarapuava: **Anais...**Guaratuba – PR: UNICENTRO, 2010.

PESTANA, D; OSTRENSKY, A.; TSCHÁ, M. K.; BOEGER, W. A. Prospecção do molusco invasor *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857) nos Principais corpos hídricos do estado do Paraná, Brasil. **Papéis Avulso de Zoologia**, São Paulo. v. 50, p. 553-559, 2010.

PIE, M.R.; W.A. BOEGER; L. PATELLA & R. FALLEIROS. A Fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. **Journal of Molluscan Studies** v. 72, p. 218-219, 2006.

RAMALHO, M. A. P.; SANTOS, J. B.; PINTO, C. A. B. P. **Genética na agropecuária**. 3 ed. Lavras: UFLA - Universidade Federal de Lavras, 2004.

RESENDE, M.F.; MARTINEZ, C.B. Impacto da infestação de condutos forçados de PCH's pelo *Limnoperna fortunei*. In: Simpósio Brasileiro sobre Pequenas e Médias Centrais Hidrelétricas, 6, 2008, Belo Horizonte, **Anais...** Belo Horizonte, 2008.

RUCKERT, G.V.; CAMPOS, M.C.S.; ROLLA, M.E. Alimentação de *Limnoperna fortunei* (Dunker, 1857): taxas de filtração com ênfase ao uso de Cyanobacteria. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*. v. 26, p. 421-429, 2004.

RUPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Invertebrate Zoology**. 7 ed. Belmont: Brooks/Cole, 2004.

TACON, A.G.J.; HALWART, M. Cage aquaculture: a global overview. In M. Halwart, D. Soto and J.R. Arthur (Editors). *Cage aquaculture – Regional reviews and global overview*, **FAO Fisheries Technical Paper**. Roma, v. 498, p. 1-16, 2007.

THE WORLD BANK. *Fish to 2030: Prospects for Fisheries and Aquaculture*. **Agricultural and Environmental Services (AES)**, Washington. v. 3, 2013.

VIDIGALL, T. H.D.A.; COSCARELLIL, D.; MONTRESOR, L. C. Molecular studies in Brazilian malacology: Tools, trends and perspectives. **Instituto de Ciências Biológicas**, Belo Horizonte. v. 11, p. 47-63, 2013.

ZHAN, A.; PERPELIZIN, P. V.; GHABOOLIL, S.; PAOLUCCI, E.; SYLVESTER, F.; SARDIN, P.; CRISTESCU, M. E.; MACISSAC H. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity in an invading mollusc in South America. **Diversity and Distributions**, Canada. v. 18, p. 1042-1055, 2012.