



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FELIPE PINHEIRO DE SOUZA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO  
PARENTAL DE *PROCHILODUS LINEATUS* NOS SISTEMAS  
REPRODUTIVOS SEMINATURAL E EXTRUSÃO**

FELIPE PINHEIRO DE SOUZA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO  
PARENTAL DE *PROCHILODUS LINEATUS* NOS SISTEMAS  
REPRODUTIVOS SEMINATURAL E EXTRUSÃO**

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  
2017

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

Souza, Felipe Pinheiro de.

Variabilidade genética e contribuição parental de *Prochilodus lineatus* nos sistemas reprodutivos seminatural e extrusão / Felipe Pinheiro de Souza. - Londrina, 2017.  
71 f. : il.

Orientador: Nelson Mauricio Lopera-Barrero.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, 2017.

1. Conservação genética - Tese. 2. Marcadores microssatélites - Tese. 3. Paternidade - Tese. 4. Programa de repovoamento - Tese. I. Lopera-Barrero, Nelson Mauricio . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. III. Título.

FELIPE PINHEIRO DE SOUZA

**VARIABILIDADE GENÉTICA E CONTRIBUIÇÃO PARENTAL DE  
*PROCHILODUS LINEATUS* NOS SISTEMAS REPRODUTIVOS  
SEMINATURAL E EXTRUSÃO**

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 Maurício Lopera-  
Barrero  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh  
Universidade Federal do Mato Grosso do Sul -  
UFMS

---

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

Londrina, 09 de maio de 2017.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Estadual de Londrina pela possibilidade de cursar a Pós Graduação no programa de Ciencia Animal e obter o título de mestre.

Agradeço a CAPES pela bolsa concedida durante este período.

A Universidade Estadual de Maringá, junto ao laboratório de Biotecnologia do grupo PEIXEGEN, por ter possibilitado a realização de parte do meu projeto de mestrado.

A Universidade Estadual do Norte do Paraná, por ter concedido a oportunidade de ser Médico Veterinario.

Aos meus pais, Luiz Carlos de Souza e Sandra Regina Pinheiro de Souza, por tudo conquistei até agora, isso foi graças a força e confiança de vocês.

Ao professor Dr. Nelson Mauricio Lopera Barrero, por ter me aceitado como orientado, pelos ensinamentos, amizade, confiança e conselhos a mim transmitidos durante este periodo, permitindo maior crescimento pessoal e profissional.

Aos companheiros de trabalho e amigos do NEPAG, Andrei, Angela, Diego, Fernanda, Maxwell, Pamela e Victor, por toda ajuda nas atividades do laboratorio durante minha pós graduação, com certeza aprendi muito com vocês e espero ter ensinado igualmente.

Aos amigos da Universidade Estadual de Maringá, especialmente ao Professor Ricardo Pereira Ribeiro, os pós graduandos Pedro e Elenice e aos demais estagiários. Aos amigos e colegas de trabalho do laboratório de Biologia Molecular de Plantas, especialmente para a Professora Claudete e ao Professor Eduardo, aos pós graduandos Bruna, Dani, Lucas, Rafaella, Renata e também aos estagiários deixo o meu muito obrigado pela ajuda e ensinamentos.

Aos meus grandes amigos de Santa Cruz do Rio Pardo, Londrina e aos amigos da “Panela”, que com certeza contruíram para minha formação de caráter e crescimento pessoal, obrigado pelas conversas, festas, pescarias e demais atividades. Guardarei todos no fundo do peito.

Agradeço a todos que contribuíram diretamente ou indiretamente no meu trabalho, tudo o que alcancei devo um pouco a cada um que me apoiou para chegar mais longe.

SOUZA, Felipe Pinheiro de. **Variabilidade genética e contribuição parental de *Prochilodus lineatus* nos sistemas reprodutivos seminatural e extrusão**. 2017. 71f. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

O Rio Tiête é um importante rio brasileiro, principalmente devido ao seu grande potencial hidrelétrico que abastece diversas cidades no estado de São Paulo. No entanto, a construção de usinas hidrelétricas tem gerado barreiras para a migração de algumas espécies de peixes, interferindo no seu ciclo reprodutivo. Este fator, associado à contaminação ambiental tem diminuído drasticamente as populações naturais de peixes, incluindo o Curimba (*Prochilodus lineatus*), espécie de grande importância socioeconômica nessa região. Como forma de mitigar o impacto negativo da construção de hidrelétricas nessas populações de peixes do rio Tietê, algumas ações têm sido realizadas, principalmente a utilização de programas de repovoamento. Esses programas têm como finalidade realizar solturas de alevinos nos rios como forma de reposição dos estoques naturais, entretanto, muitas questões a respeito da reprodução das espécies ameaçadas ainda não foram elucidadas, como a melhor proporção de sexo nos acasalamentos e contribuição parental dos reprodutores. O objetivo do presente estudo foi avaliar a variabilidade genética e a contribuição parental de *P. lineatus* submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e por extrusão. Foram coletadas amostras de nadadeira caudal de 25 reprodutores submetidos ao sistema reprodutivo por extrusão em diferentes proporções de sexo (1♂:1♀ e 2♂:1♀) e de 138 alevinos oriundos desses acasalamentos. De maneira similar, foram coletadas amostras de nadadeira de 10 reprodutores (1♂:1♀) submetidos ao sistema reprodutivo seminatural e de 70 alevinos gerados nesse acasalamento. Os 10 *loci* microssatélites pesquisados produziram 132 alelos. Foi observada alta variabilidade intrapopulacional para os parentais e alevinos de ambos os sistemas reprodutivos. Foi constatado um déficit de heterozigotos através do coeficiente de endogamia (*F<sub>is</sub>*). Foi identificado o desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ) para os alevinos de todos os sistemas. De acordo com a AMOVA, houve maior variação genética dentro dos sistemas reprodutivos que entre eles. Foi identificada paternidade múltipla em ambos os sistemas. Constatou-se contribuição mais homogênea das fêmeas e dos machos no sistema seminatural, possivelmente devido à sincronização natural na liberação dos gametas. No sistema por extrusão 1:1, observou-se que apenas um macho foi responsável pela produção de 41,8% dos descendentes, caracterizando maior dominância reprodutiva nesse sistema. Na proporção 2:1, quatro machos contribuíram entre 14,5 a 21,7%. A análise seminal demonstrou variações individuais na qualidade do sêmen dos machos no sistema de extrusão, o que influenciou na composição da sua progênie. Conclui-se que ambos os sistemas reprodutivos e proporções de sexo no acasalamento foram capazes produzir alevinos com elevada variabilidade genética, sendo que o sistema seminatural permitiu uma maior homogeneidade na contribuição reprodutiva.

**Palavras-chave:** Conservação genética. Marcadores microssatélites. Paternidade. Programa de repovoamento.

SOUZA, Felipe Pinheiro de. **Genetic variability and parental contribution of *Prochilodus lineatus* in semi-natural reproductive systems and extrusion**. 2017. 71 p. Dissertation (Master's Degree in Animal Science) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

The Tietê River is an important Brazilian river, mainly because of its large hydroelectric potential that supplies several cities in the State of São Paulo. However, the construction of hydroelectric power plants have generated barriers to some migratory species of fish, interfering with the reproductive cycle. This factor is associated with the environmental pollution that is decreasing the natural population of these, including the Curimba (*Prochilodus lineatus*), this species is important for the economy of the region. In order to mitigate the negative impact of the construction of hydroelectric power in those fish populations of the Tiete River; some actions have been made, for example restocking programs. These programs has the principal objective of introducing fingerlings in the rivers, as a way to increase the existing natural stocks, but, many questions about the reproduction of endangered of extinction species have not yet been elucidated, like what is the best sex ratio in the mating and parental contribution of breeders. The objective of this study was to evaluate the genetic variability and parental contribution of *P. lineatus* submitted to semi-natural and extrusion reproductive systems. Samples of caudal fin of 25 breeders subjected by extrusion reproduction system were collected at different sex ratios (1♂: 1♀ and 2♂: 1♀) and 138 fingerlings originating from these matings. Similarly, samples were collected from 10 breeders (1♂ : 1♀) submitted to semi-natural reproductive system and 70 fingerlings generated this mating. Ten microsatellite loci were evaluated, producing 132 alleles. It was observed a high interpopulation variability for breeders and fingerlings in both reproductive systems. It was found a deficit of heterozygotes through the coefficient of inbreeding (Fis). Also has been identify a deviation in Hardy – Weinberg equilibrium ( $P < 0.05$ ) on fingerling in all of the systems. According with AMOVA, they was a high genetic variation within the reproductive systems that between them. Multiple paternity was identified in both systems. A more homogeneous contribution of females and males was observed in the seminatural system, possibly due to the natural synchronization of gametes release. In the 1:1 extrusion system, it was observed that only one male was responsible for the 41.8 % of the offspring, characterizing the reproductive grade dominance in this system. In the 2:1 ratio, four males contributed between 14.5 and 21.7 %. The seminal analysis demonstrate an individual variation in the semen quality of the male extrusion system that influenced in the composition of their progeny. It was concluded that both reproductive systems and sex proportion in mating were able to produce fingerlings with high genetic variability, and the seminatural system allowed a greater homogeneity in the reproductive contribution.

**Key words:** Genetic conservation. microsatellites markers. Paternity. Restocking programs.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ).....	12
Figura 2 – Rio Tietê e localização da UHE Promissão .....	15
Figura 3 – Procedimento de extrusão .....	18
Figura 4 – Tanque com correnteza artificial.....	18
<b>ARTIGO B - Contribuição parental na progênie de Curimba em diferentes sistemas reprodutivos.....</b>	<b>47</b>
Figura 1 - Contribuição reprodutiva de machos e fêmeas na progênie de <i>Prochilodus lineatus</i> nos sistemas reprodutivos por extrusão 1:1, extrusão 2:1 e seminatural 1:1.....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Artigo A –</b>	<b>Influência do sistema reprodutivo e da proporção de sexo na variabilidade genética de progênies de <i>Prochilodus lineatus</i></b> .....	26
<b>Tabela 1 –</b>	Caracterização dos dez <i>loci</i> microssatélites utilizados .....	31
<b>Tabela 2 –</b>	Médias da Heterozigose observada ( $H_o$ ), heterozigose esperada ( $H_e$ ), índice de Shannon ( $I$ ), riqueza alélica ( $R_a$ ), índice de fixação ( $F_{is}$ ) e teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_w$ ) para os reprodutores e alevinos de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	33
<b>Tabela 3 –</b>	AMOVA e diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) calculados para os seis grupos de reprodutores e alevinos de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	37
<b>Artigo B –</b>	<b>Contribuição parental na progênie de Curimba em diferentes sistemas reprodutivos</b> .....	47
Tabela 1 –	Composição das famílias (%) na progênie de <i>P. lineatus</i> , utilizando os sistemas reprodutivos extrusão (1:1 e 2:1) e seminatural (1:1) .....	57
Tabela 2 –	Análise dos parâmetros seminais de machos de Curimba ( <i>Prochilodus lineatus</i> ) submetidos ao sistema reprodutivo por extrusão .....	58
Tabela 3 -	Fst par a par dos reprodutores de <i>P. lineatus</i> nos sistemas reprodutivos por extrusão 1:1, 2:1 e seminatural 1:1 .....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMOVA	Análise de Variância Molecular
$H_w$	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
$F_{is}$	Índice de fixação
$F_{ST}$	Diferenciação genética
GW	Gigawhatt
I	Índice de Shannon
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IN	Índice de normalidade
$H_e$	Heterozigosidade Esperada
$H_o$	Heterozigosidade Observada
MEP	Motilidade espermática progressiva
$R_a$	Riqueza alélica
Pb	Pares de Bases
Sptz	Espermatozóides
UHE	Usina Hidrelétrica

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	12
2.1	CURIMBA( <i>PROCHILODUS LINEATUS</i> ) .....	12
2.2	HISTÓRICO SOBRE O RIO TIÊTE E UHE PROMISSÃO E IMPACTOS DAS BARRAGENS SOBRE AS POPULAÇÕES DE PEIXES.....	14
2.3	INDUÇÃO HORMONAL .....	16
2.4	SISTEMAS REPRODUTIVOS.....	17
2.5	MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES .....	19
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	20
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	25
3.1	OBJETIVO GERAL.....	25
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICO.....	25
<b>4</b>	<b>ARTIGO A – INFLUÊNCIA DO SISTEMA REPRODUTIVO E DA PROPORÇÃO DE SEXO NA VARIABILIDADE GENÉTICA DE PROGÊNIES DE <i>PROCHILODUS LINEATUS</i></b> .....	26
<b>5</b>	<b>ARTIGO B – CONTRIBUIÇÃO PARENTAL NA PROGÊNIE DE CURIMBA EM DIFERENTES SISTEMAS REPRODUTIVOS</b> .....	47
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	65
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	66

## 1 INTRODUÇÃO

Devido as características biogeográficas presentes em nosso país, o Brasil possui uma grande diversidade faunística de peixes de água doce (NOGUEIRA et al., 2010), entretanto, devido a ação antrópica nos ecossistemas de águas continentais, diversas espécies de peixes estão ameaçadas em virtude da poluição, sobrepesca e construção de usinas hidrelétricas (ANDRADE, 2009; REYNALTE-TATAJE et al., 2013).

Por representar uma fonte de energia de baixo custo e sustentável, e pelo imenso potencial hídrico do Brasil, quase 71% de toda capacidade energética do país é derivada de usinas hidrelétricas (BRASIL, 2015). Contudo, a instalação dessas usinas pode acarretar em sérias alterações no local de construção, entre elas alterações ambientais (LIMA, 2015) que podem afetar a reprodução de peixes, onde a barragem atua como barreira física para a movimentação desses animais para as partes superiores da bacia hidrográfica, interferindo no ciclo reprodutivo dos peixes migradores (ANDRADE, 2009). O Curimba (*Prochilodus lineatus*) surge nesse contexto como uma espécie de peixe migradora ameaçada pela construção dessas usinas. Essa espécie é encontrada nas bacias dos rios Paraná e Paraguai e tem grande importância econômica e ecológica entre as espécies de peixes nativas de médio e grande porte (BOTTA et al., 2010).

Nesse sentido, programas de repovoamento são utilizados como estratégia para minimizar tais impactos, já que possibilitam a reposição dos estoques naturais através da soltura de alevinos nas bacias afetadas (REYNALTE-TATAJE et al., 2013; SIROL e BRITO, 2006). Porém, é imprescindível o monitoramento genético dos alevinos que serão liberados nos rios e também dos reprodutores, tendo em vista que a variabilidade genética é fundamental para a sobrevivência e adaptação dos animais no ambiente natural (LOPERA-BARRERO et al., 2010; POVH et al., 2008). Além disso, o correto manejo reprodutivo é fundamental para evitar acasalamentos ineficientes, acarretando queda nas características reprodutivas, seminais e de desempenho, além da redução da variabilidade genética (POVH et al., 2010).

Se tratando de espécies nativas e migradoras, o uso de hormônios sexuais se faz necessário para manipulação do ciclo reprodutivo de peixes. Essa técnica, se utilizada corretamente, representa um eficiente método para a indução da desova e espermição, permitindo que a reprodução destes indivíduos ocorra no momento desejado e em condições controladas de cativeiro (SOLIS-MURGAS et al., 2011). Os sistemas reprodutivos por

extrusão e seminatural são os mais utilizados em programas de repovoamento, entretanto, poucos estudos em espécies nativas foram realizados para determinar qual sistema permite a melhor conservação da variabilidade genética dos alevinos (LOPERA-BARRERO et al., 2014, POVH et al., 2010). Além disso, pesquisas indicam que a proporção de reprodutores utilizada nos acasalamentos também pode exercer influência na composição genética na progênie, de modo a afetar a contribuição parental e a variabilidade genética dos alevinos (CASTRO, 2015; RIBOLI e ZANIBONI-FILHO, 2009), no entanto, nenhum estudo avaliou esses fatores na reprodução de *P. lineatus*.

O uso de marcadores moleculares microssatélites para o levantamento de informações sobre variabilidade genética e de estrutura de populações de peixes é um importante passo para o estudo da conservação das espécies de peixes em suas populações naturais (ABDUL-MUNEER, 2014). Devido às características desse marcador, como o alto polimorfismo e herança mendeliana, diversos trabalhos utilizando estes marcadores foram realizados nos últimos anos para estudo de variabilidade de peixes em estoques e populações naturais (ABDUL-MUNEER, 2014; CASTRO, 2015; LOPERA-BARRERO et al., 2014).

Levando em conta a ausência de informações sobre como o sistema reprodutivo e a proporção de sexo durante os acasalamentos afetam a composição genética de alevinos de *P. lineatus*, estudos que permitam diagnosticar quais são os métodos que proporcionam a manutenção da variabilidade genética são fundamentais para melhor compreensão do comportamento reprodutivo da espécie. Além disso, essas informações seriam de extrema utilidade para programas de cunho conservacionistas, como os programas de repovoamento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CURIMBA (*PROCHILODUS LINEATUS*)

Taxonomia do Curimba (REIS et al., 2003):

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Família: Prochilodontidae

Gênero: *Prochilodus*

Espécie: *Prochilodus lineatus*

Conhecido popularmente por Curimbatá, Curimba, Curimatã, Curimatã-Pioa, Curimatã-Pacu, Capa-Terra e Corimbatá, *Prochilodus lineatus* é uma espécie de médio a grande porte (tamanho médio em torno de 46 cm e máximo de 80 cm), de hábito iliófago (se alimenta de detritos no fundo dos rios) e reolífica (migra durante a piracema); no ambiente natural possui desova única por temporada com grande número de oócitos, além de fecundação externa e ausência de cuidado parental (LOWE-MCCONNELL, 1999, REIS, et al. 2003). Essa espécie é encontrada nas bacias dos rios Paraná e Paraguai (BOTTA et al., 2010), mas também possui registros da presença nas bacias do São Francisco e Paraíba do Sul (ALLAMAN, 2008) (Figura 1).

Figura 1 – Curimba (*Prochilodus lineatus*)



Fonte: O autor (2015)

De acordo com Reis et al. (2003), essa espécie possui o corpo moderadamente alto, comprido, cabeça discretamente concava com perfil triangular, palpebras adiposas presentes mas pouco desenvolvidas, lábios carnosos, grossos e com dentículos. Possuem coloração amarelo-prateado, com porções mais escuras na região mais dorsal do corpo e da cabeça (REIS et al., 2003). O gênero *Prochilodus* confere a característica de alta prolificidade, uma fêmea de 60 cm de comprimento pode produzir em torno de um milhão ou mais óocitos, a maturidade dessa espécie ocorre por volta dos dois anos de idade (LOPERA-BARRERO et al., 2007). Segundo Allaman et al. (2012), uma fêmea com aproximadamente 2 Kg pode produzir em torno de 358 g de ovos, o que corresponde a cerca 1200 ovos por grama de desova.

A carne do Curimba é rica em proteína de alta qualidade, sendo bastante apreciada por populações ribeirinhas, além disso, seu custo no mercado é inferior quando comparado a outros peixes (ORFÃO, 2006). Por possuir hábito iliófago, essa espécie é muito utilizada no controle da qualidade da água em pisciculturas de engorda, principalmente por auxiliar na redução da quantidade de matéria orgânica depositada no fundo dos viveiros (ALLAMAN, 2008). Outra grande utilidade da criação de Curimbas em pisciculturas é que suas larvas servem de alimento para outras espécies de maior interesse comercial (conhecidas como larvas forrageiras), como é o caso do Dourado (*Salminus brasiliensis*), a Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) e o Jaú (*Paulicea luetkeni*) (ORFÃO, 2006).

Em termos de produtividade, segundo os dados do IBGE (2015), o Curimba ocupa a 12ª colocação de peixes mais produzidos no Brasil, representando um total de 2.554.052 kg no ano de 2015. Essa quantidade representa 0,5% de toda a produção de pescados no país. Por outro lado, de acordo com os dados da FAO (2016), a pesca extrativa do gênero *Prochilodus* no ano de 2015 alcançou 26.903.000 Kg.

De maneira geral, o Curimba não muito priorizado nas pisciculturas, sendo na maioria das vezes utilizada como espécie secundária para a redução da matéria orgânica, controle da qualidade da água ou para a produção de larvas forrageiras. Todavia, devido à facilidade de predação, essa espécie é muito visada na pesca extrativa o que pode ocasionar em redução das populações naturais nos rios. Outro fator que contribui com essa redução populacional é a instalação de barreiras físicas (usinas hidrelétricas, por exemplo) as quais exercem influência negativa sobre sua reprodução. Por essas razões, programas de repovoamento vêm sendo cada vez mais utilizados objetivando a preservação dessas populações naturais (LOPERA-BARRERO et al., 2015; SCHORK et al., 2012).

## 2.2 HISTÓRICO SOBRE O RIO TIÊTE E UHE PROMISSÃO E IMPACTOS DAS BARRAGENS SOBRE AS POPULAÇÕES DE PEIXES

O rio Tietê, além de ser um rio de grande importância econômica para o estado de São Paulo, historicamente está relacionado às conquistas territoriais realizadas pelos Bandeirantes que desbravavam os sertões, processo que promoveu o início e desenvolvimento de muitas cidades no interior do Estado (DAEE, 2013). A nascente desse rio encontra-se na Serra do Mar, a uma altitude de 1030 metros no município de Salesópolis, em seguida, atravessa a região metropolitana de São Paulo seguindo para o interior, banhando 62 municípios e seis bacias e sub-bacias hidrográficas, percorrendo 1100 km até desaguar no rio Paraná (DAEE, 2013).

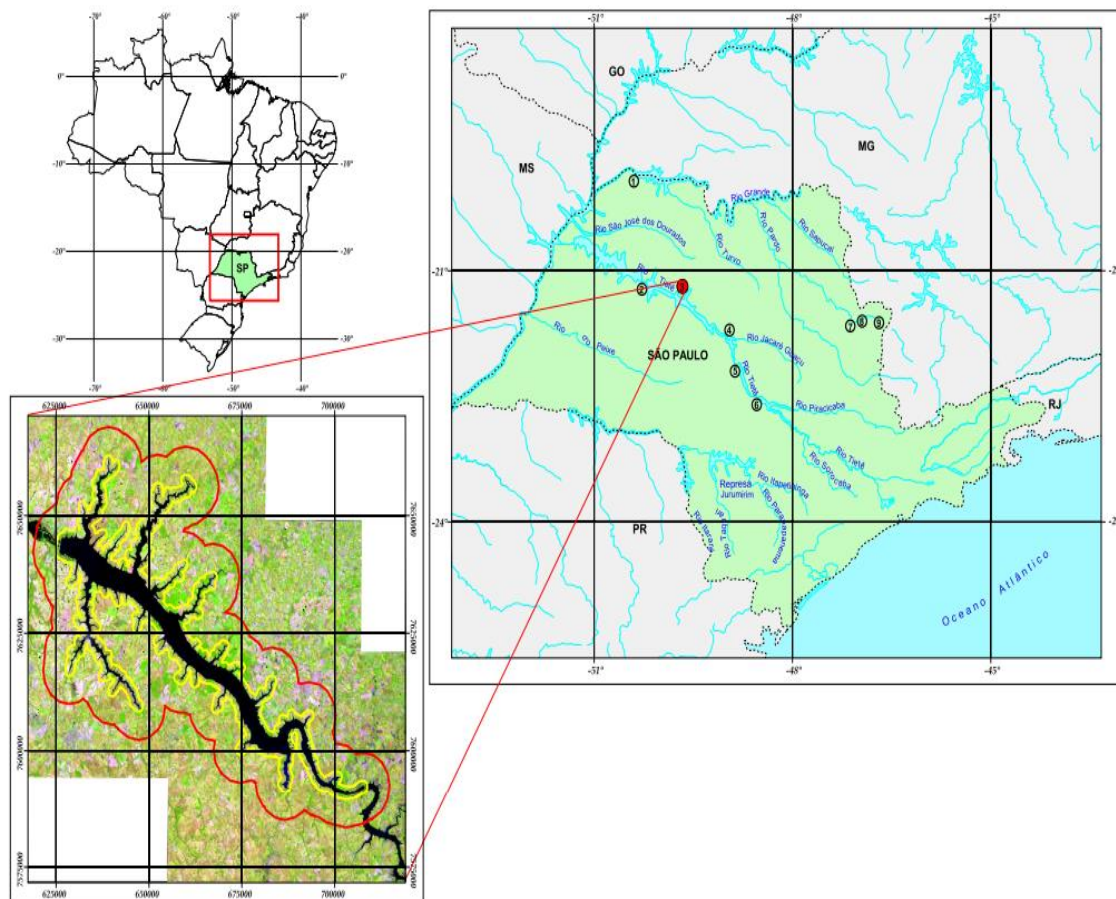
Uma importante função econômica desse rio se deve a utilização para a navegação pluvial, movimentando toneladas de grãos ao longo das safras agrícolas. Entretanto, esse rio também é conhecido pelos seus problemas ambientais gerados principalmente pelo crescimento desordenado das cidades próximas às margens (FERREIRA et al., 2015). Outro fator econômico de interesse do rio Tietê é seu alto potencial elétrico através de Usinas Hidrelétricas (UHE) capazes de suprir a demanda energética de várias regiões do estado do São Paulo. As principais UHE são: Edgar de Souza (em Santana do Parnaíba), Pirapora do Bom Jesus (no município de Pirapora do Bom Jesus), Laras (próximo a Laranjal Paulista), Anhembi (no município de Anhembi), Barra Bonita (no município de Barra Bonita), Ibitinga (entre Borborema e Içanga) Três Irmãos (entre Andradina e Pereira Barreto) e Promissão (entre Promissão e Avanhandava). Juntas, essas usinas hidrelétricas podem produzir mais de 1GW (OLIVEIRA, 2014).

A UHE Promissão, também conhecida como UHE Mário Lopes Leão (Figura 2), local das amostragens do presente estudo, teve sua instalação autorizada em 15/09/1965, quando a Companhia Hidrelétrica do Rio Pardo – CHERP assinou contrato com a Tecno Construtora de Usinas hidrelétricas S/A (SILVA JUNIOR, 2006). A usina entrou em operação em 1975, está localizada no Rio Tietê e ocupa uma área de represamento de 63 km<sup>2</sup> e volume de 607 x 106 m<sup>3</sup>. A barragem possui comprimento de 856,25 m e a eclusa possui capacidade de 10 milhões de ton/ano (CRACCO et al., 2008).

A construção de barragens ao longo da história contribuiu para o desenvolvimento na irrigação, abastecimento e produção de energia, e, devido ao aumento da demanda para suprir as necessidades industriais, a construção de hidrelétricas têm crescido de

maneira significativa, ao igual que os impactos ambientais negativos na biodiversidade (PEREIRA, 2014).

Figura 2 – Rio Tietê e localização da UHE Promissão



**Fonte:** IBGE (2002)

A grande maioria da energia elétrica em nosso país é provinda de hidrelétricas (BRASIL, 2015), entretanto, elas atuam como barreira física dificultando a migração dos peixes, podendo em situações mais críticas impossibilitar a reprodução (ANDRADE, 2009). Alternativas como as escadas de transposição de peixes são utilizadas para mitigar o efeito decorrente do bloqueio imposto pelas barragens. Essas escadas tem a função de permitir a passagem dos peixes da região jusante a montante (e vice-versa) das barragens, entretanto, pesquisas apontaram que apenas algumas espécies possuem a capacidade de ascender esses sistemas. Poucos estudos sobre a importância e a efetividade desses dispositivos na preservação de populações naturais nas bacias hidrográficas têm sido realizados (AGOSTINHO et al., 2007).

Segundo Agostinho et al. (1993), outro importante impacto observado pela construção de usinas hidrelétricas através da interrupção de rotas migratórias para os peixes migradores é a tendência da formação de acúmulo de peixes no sopé das barragens, ocasionando mortalidade de peixes em turbinas hidráulicas e vertedouros. Em relação aos vertedores, a mortalidade de peixes é devido ao impacto direto ou então pela supersaturação de gás. Nas turbinas, no entanto, o nível de mortalidade para os peixes migradores é bem mais acentuado. A alta mortalidade de peixes dessa maneira é considerada danosa à fauna pela legislação federal (e.g., Lei de Crime Ambientais, Lei 9.605 de 13/02/98) e, portanto, tal infração é sujeita as penalidades previstas (ANDRADE e ARAÚJO, 2011).

Conforme mostrado, a inserção de usinas hidrelétricas no ambiente natural, embora proporcione a geração de energia, promove uma série de impactos ambientais, entre eles vários relacionados à migração de peixes reolíficos, interferindo na reprodução e causando mortalidade em várias espécies. Tais consequências antrópicas justificam cada vez mais a incorporação de mecanismos mais eficientes na transposição de peixes, além da inclusão de programas de repovoamento de maneira a repor as populações naturais afetadas por esses mecanismos.

### 2.3 INDUÇÃO HORMONAL

Um dos fatores que auxiliam na desova é a subida nos rios realizada pelos peixes durante a piracema (ZANIBONI-FILHO e NUÑER, 2004). Ambientes lânticos, ausência de qualidade ambiental adequada para a reprodução como migração, profundidade ou corredeiras são alguns dos motivos que impossibilitam a reprodução de peixes migradores em cativeiro (MYLONAS et al., 2010).

A maioria das espécies de peixes, quando criadas em pisciculturas, não apresentam atividade reprodutiva normal. Nesses casos, as fêmeas não conseguem maturação final dos oócitos e não conseguem desovar, o macho, por sua vez, apresenta ausência ou diminuição da produção de sêmen, sendo esses processos mediados pelas gonadotrofinas: hormônio folículo estimulante (FSH) e hormônio luteinizante (LH) (MEHDI e MOUSAVI, 2011; SOLIS-MURGAS et al., 2011). Tendo isso em vista, a manipulação artificial do ciclo reprodutivo através de hormônios que induzem ao desenvolvimento e maturação gonadal constitui uma técnica eficiente para a obtenção dos gametas e consequente no controle sobre a reprodução desses animais (SOLIS-MURGAS et al., 2011).

O extrato da pituitária de Carpa (CPE) ou de outros peixes, o GnRH, além de hormônios extraídos de mamíferos como o hormônio coriônico humano (HCG), têm sido os métodos mais utilizados para promover a indução à desova em peixes (MYLONAS et al., 2010), no entanto, devido a maior simplicidade e praticidade, o extrato da pituitária de Carpa ainda é o método mais utilizado em peixes reolíficos brasileiros. Para espécies migradoras como o Curimba, o extrato pituitário de Carpa pode ser utilizado para a obtenção dos gametas através de duas aplicações hormonais intramusculares próximos a nadadeira dorsal. A primeira aplicação (dose de 0,5mg/kg) é realizada apenas nas fêmeas, após doze horas faz-se a segunda aplicação (5,5mg/kg) nas fêmeas (ANDRADE et al., 2014) e também nos machos (2,5mg/kg) de maneira concomitante a última aplicação na fêmea.

Para estimar a hora aproximada da realização da extrusão para a desova, deve-se calcular a hora-grau (hora aproximada da maturação oocitária e espermática). Para o cálculo, deve-se somar a temperatura da água a cada hora, até atingir o valor determinado para a espécie (220 horas-grau). Após a hora-grau ser atingida, as fêmeas devem ser capturadas e as papilas genitais devem ser secas, normalmente, é comum observar natação em agitação e/ou natação em círculos por parte dos reprodutores quando estiverem aptos a desovar. Deve-se empregar uma leve pressão no sentido crânio-caudal no abdômen da fêmea para os oócitos serem liberados em um recipiente. Posteriormente, é realizado o mesmo procedimento com os machos para a liberação do sêmen. Em seguida, deve ser adicionado água na mistura (oócitos + sêmen) para ativação e fecundação dos gametas. Deve-se misturar o conteúdo por aproximadamente 3 minutos, e então, então os ovos devem ser inseridos na incubadora (Adaptado de PEREIRA et al., 2009).

## 2.4 SISTEMAS REPRODUTIVOS

Segundo Reynalte-Tataje et al. (2013), existem dois sistemas reprodutivos que são utilizados para espécies migratórias: o sistema por extrusão e o sistema seminatural. O primeiro sistema (por extrusão) não precisa de tanques de desova (menores investimentos) e possibilita manipular os gametas, o que por outro lado, pode causar maior estresse e mortalidade aos animais, bem como a diminuição da variabilidade genética (LOPERA-BARRERO et al., 2014) (Figura 3).

Figura 3 – Procedimento de extrusão. A = Extrusão dos oócitos das fêmeas. B = Extrusão do sêmen dos machos (o sêmen do macho é despejado sobre os oócitos das fêmeas)



**Fonte:** PeixeGen (2015)

O sistema reprodutivo seminatural apresenta menos interferência do piscicultor sobre a reprodução, entretanto, permite a diminuição do estresse e conseqüentemente da mortalidade dos animais. Nesse sistema, após a indução hormonal, as matrizes e os reprodutores são alocados em um tanque capaz de simular o ambiente natural por meio da circulação forçada de água (simulando as condições de correnteza) (LOPERA-BARRERO, 2009), o que permite a maturação dos gametas (Figura 4). A fertilização ocorre de maneira direta e aleatória (LOPERA-BARRERO, 2007, 2009).

Figura 4 – Tanque com correnteza artificial



**Fonte:** PeixeGen (2015)

Uma maior diversidade genética em alevinos oriundos do sistema seminatural foi encontrada em alguns trabalhos com espécies nativas. Povh (2007), em pesquisa com Pacus (*Piaractus mesopotamicus*), encontrou maior variabilidade nesse sistema quanto comparado ao sistema por extrusão. Outro trabalho realizado com Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) demonstrou que o sistema seminatural permite uma diminuição da mortalidade por causar menos estresse, além manter a alta variabilidade genética (LOPERA-BARRERO et al. 2014), o que caracterizam as principais vantagens desse sistema.

Segundo Reynalte-Tataje et al. (2013), o método de extrusão oferece maior praticidade na desova, entretanto, diminui a sobrevivência dos reprodutores e a taxa de fertilização quando comparado ao método seminatural, sendo mais indicada em situações onde há grande número de reprodutores. A grande vantagem do sistema por extrusão é que não demanda de tanques de desova, tornando a infraestrutura menos onerosa e os gametas podem ser visualizados e manipulados pelo produtor. Por outro lado, de acordo com Povh et al. (2010), existe a possibilidade do sistema seminatural gerar dominância reprodutiva por parte de alguns machos. Esse sistema é mais indicado quando os reprodutores possuem alta variabilidade genética e a perda destes por mortalidade durante o processo reprodutivo gere prejuízos incalculáveis (REYNALTE-TATAJE et al., 2013).

## 2.5 MARCADORES MOLECULARES MICROSSATÉLITES

A análise genética a partir de marcadores moleculares é uma importante ferramenta para a obtenção de informações das espécies. No caso dos peixes, os estudos envolvendo marcadores moleculares objetivam analisar a variabilidade genética de populações, identificação de espécies ou estudos evolutivos (GASQUES et al., 2013). A avaliação da distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações é uma importante etapa para o desenvolvimento e sustentabilidade de programas de conservação e repovoamento de peixes (IWERSEN, 2010).

Diversas técnicas moleculares podem ser utilizadas para estudos genéticos, as quais utilizam DNA nuclear ou mitocondrial (mtDNA). Se tratando do DNA nuclear, que abrange a grande maioria das análises, técnicas como o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), VNTR (Variable Number Tandem Repeat, dos quais enquadram os microssatélites e minissatélites) e SNP (Single Nucleotide Polymorphism) podem ser utilizadas, no entanto, devido a algumas

características específicas como o alto polimorfismo por locus, os marcadores microssatélites são amplamente utilizados para análises populacionais em peixes (ABDUL-MUNEER, 2014).

Os marcadores moleculares microssatélites, também conhecidos como Sequências simples repetidas (SSR - *Simple Sequence Repeats*), consistem em pequenas sequências com um a oito nucleotídeos de comprimento, repetidas em *tandem* (ALAM e ISLAM, 2005). São marcadores de importantes para estudos de genética de populações tendo em vista o elevado conteúdo polimórfico, sua abundância no genoma e sua herança do tipo mendeliana (PERINI, 2013). Possuem características de codominância, ou seja, é possível identificar cada loco e o comprimento dos alelos herdados, possibilitando a identificação dos indivíduos homozigotos e heterozigotos e permitindo a análise por meio dos métodos estatísticos de genética populacional (CHISTIYAKOV et al., 2006).

Diversos trabalhos recentes têm mostrado resultados consistentes e satisfatórios com o uso desses marcadores para análises de variabilidade genética em peixes migradores, tanto para populações naturais como na avaliação de reprodutores e alevinos em centrais de repovoamento (BARROCA et al., 2012; HAMOY e SANTOS, 2012; LOPERA-BARRERO et al., 2014, 2015, 2016; PERINI, 2013) ou mesmo na busca do monitoramento da variabilidade genética ao longo das gerações para diminuir problemas causados por indivíduos aparentados (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2013).

## REFERÊNCIAS

ABDUL-MUNEER, P. M. Application of microsatellite markers in conservation genetics and fisheries management: recent advances in population structure analysis and conservation strategies. **Genetics Research International**, Cairo, v. 2014, p. 1-11, 2014.

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

AGOSTINHO, A. A.; MENDES, V. P.; SUZUKI, H. I.; CANZI, C. Avaliação da atividade reprodutiva da comunidade de peixes dos primeiros quilômetros a jusante do reservatório de Itaipu, **Revista UNIMAR**, Marília, v. 15, supl., p. 175-189, 1993.

ALAM, M.S.; ISLAM, M.S. Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 246, n. 1-4, p. 151-160, 2005.

ALLAMAN, I. B. **Efeito materno e paterno em Curimatá, *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**. 2008. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

- ALLAMAN, I. B.; FREITAS, R. T. F.; VIVEIROS, A. T. M.; NASCIMENTO, A. F.; OLIVEIRA, G. R.; REIS NETO, R.V. **Efeito materno e paterno sobre as taxas de fertilização e eclosão em curimba (*Prochilodus lineatus*)**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v. 64, n. 6, 1584–1590, 2012.
- ANDRADE, E. S. **Aspectos da biologia reprodutiva de piapara (*Leporinus obtusidens*), capturados a jusante da Usina Hidrelétrica do Funil, Perdões/Minas Gerais**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- ANDRADE, E. S.; ARAUJO, J. C. Medidas mitigadoras dos impactos ambientais causados por usinas hidrelétricas sobre peixes. **Revista Eletrônica de Veterinária**, Málaga, v. 12, n. 3, p. 1-30, 2011.
- ANDRADE, E. S.; CARVALHO, A. F. S.; FERREIRA, M. R.; PAULA, F. G.; RODRIGUES, F. S.; FELIZARDO, V. O.; REIS NETO, R.V.; MURGAS, L.D.S. Indutores hormonais na reprodução artificial de curimba (*Prochilodus lineatus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 38, n. 4, p. 230-236, 2014.
- BARROCA, T. M.; SANTOS, G. B.; DUARTE, N.V.R.; KALAPOTHAKIS, E. Evaluation of genetic diversity and population structure in a commercially important freshwater fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae) using complex hypervariable repeats. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 4, p. 4456-4467, 2012.
- BOTTA, P.; SCIARA, A.; ARRANZ, S.; MURGAS, L. D .S; PEREIRA, G. J. M; OBERLENDER, G. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*). **Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia , v. 42, n. 2, p. 109-114, 2010 .
- BRASIL, 2015. **Banco de informações de geração da ANEEL**. <Disponível em: <http://www.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/capacidadebrasil.cfm>> Acesso em: 14 de set de 2015.
- CASTRO, P. L. **Contribuição genética e reprodutiva de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão**. 2015. 42f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2015.
- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B., VOLCKAERT, F. M. A. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 255, n. 1, p. 1-29.
- CRACCO, A. S.; ARRIBARD, P. T. B.; FRASTRONE, T.; RIBEIRO, M. D. C. **Gestão da sustentabilidade: Um Estudo de Caso em uma Empresa do Setor Energético**. 2008. 114p. Monografia (Administração). Centro Universitário Católico Salesiano Auxilium. Lins. 2008.
- DAEE. **Histórico do rio Tietê**. São Paulo: Departamento de águas e energia elétrica, 2013. Disponível em: [http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com\\_content&id=793:historico-do-rio-tiete&Itemid=53](http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com_content&id=793:historico-do-rio-tiete&Itemid=53). Acesso em: 03 mar. 2017.

FAO, 2016. **Fisheries and aquaculture software**. FishStatJ - software for fishery statistical time series. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Roma, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en>. Acesso em: 07 mar. 2017

FERREIRA, D. L.; PENEREIRO, J. C.; FONTOLAN, M. R. Análises estatísticas de tendências das séries hidro-climáticas e de ações antrópicas ao longo das sub-bacias do rio tietê. **HOLOS**, Natal, v. 2, p. 50-68, 2015.

GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 16, n. 1, p. 47-50, 2013.

HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the Tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 11, n. 1, p. 141-146, 2012.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002. **Relatório Ambiental – UHE Promissão**. Disponível em: [http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com\\_content&id=793:histórico-do-rio-tiete&Itemid=53](http://www.dae.sp.gov.br/index.php?option=com_content&id=793:histórico-do-rio-tiete&Itemid=53). Acesso em: 24 out. 2015.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2015. **Produção Pecuária Municipal 2015**, Rio de Janeiro, v. 43, p.1-49, 2015.

IWERSEN, L. H. L. **Diversidade genética em Curimba *Prochilodus lineatus* (pisces, characiformes) na bacia do alto Rio Uruguai, Brasil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LIMA, M. A. **Desenvolvimento local e políticas públicas para comunidades atingidas por barragens: o caso da Usina Hidrelétrica do Funil**. 2015. Dissertação (Mestrado em Administração Pública) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.

LOPERA-BARRERO, N. M. Conservation of *Brycon orbignyanus* natural populations and stocks for their reproductive, genetic, environmental sustainability: A model for species threatened with extinction. **Ciencia e Investigación Agrária**, Santiago, v. 36, n. 2, p. 191-208, 2009.

LOPERA-BARRERO, N. M.; ALVAREZ, C. A. R.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JR, D. P.; SIROL, R. N.; RIBEIRO, R. P. Diversidade genética e paternidade de progênies de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 35, n. 1, p.541-554, 2014.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A. **O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar?** Aquicultura & Pesca, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 71-74, 2007.

LOPERA BARRERO, N. M.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; STREIT JR, D. P.; FORNARI, D. C. Reproductive contribution of a *Brycon orbignyanus* (Cuvier and Valenciennes, 1850) offspring in the semi-natural

reproductive system using microsatellite markers. **Zootecnia Tropical**, Maracay, v. 28, n. 3, p. 403-411, 2010.

LOPERA-BARRERO, N. M.; SANTOS, S. C. A.; GOES, E. S. R.; CASTRO, P. L.; SOUZA, F. P.; POVEDA-PARRA, A. R.; CASSETA, J.; PONTILLO, B.G.; RIBEIRO, R.P. Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 6, p. 1621-1628, 2016.

LOPERA-BARRERO, N. M.; SANTOS, S. C. A.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; FORNARI, D. C. F.; ZANCHETA, C.; POVEDA-PARRA, A. R.; OLIVEIRA, C. A. L.; RIBEIRO, R. P. Genetic diversity of wild populations and broodstocks of Curimba for restocking programs in the Tietê, Grande, Pardo and mogi-guaçu rivers (Brazil). **Boletim Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 41, n. 2, p. 287-304, 2015.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Neotropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. 535 p.

MEHDI, Y.; MOUSAVI, S. E. A review of the control of reproduction and hormonal manipulations in finfish species. **African Journal of Agricultural Research**, v. 6, n. 7, p. 1643-1650, 2011.

MYLONAS, C.C; FOSTIER, A.; ZANUY, S. Broodstock management and hormonal manipulations of fish reproduction. **General and Comparative Endocrinology**, Denver, v.165, n. 3, p.516-534, 2010.

NOGUEIRA, C.; BUCKUP, P.A.; MENEZES, N. A.; OYAKAWA, O. T.; KASECKER, T. P.; NETO, M. B. R.; SILVA, J. M. C. Restricted-Range Fishes and the Conservation of Brazilian Freshwaters. **PLoS One**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1-10, 2010.

OLIVEIRA, A. B. K. O rio Tietê: O processo histórico e sua importância para São Paulo. **In: 1º Simpósio Mineiro de Geografia**, Alfenas. Anais. Alfenas: UFA, 2014. p. 271-285.

ORFÃO, L.H. **Resfriamento e criopreservação de sêmen de Curimba *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836)**. 2006. Dissertação (Mestrado em Produção Animal) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG. 2006

PEREIRA, A. L. Impactos sócio-ambientais da Hidrelétrica do Funil na comunidade de Ponta Negra. **Sinapse Múltipla**, Betim, v. 3, n. 2, p. 135-146, 2014.

PEREIRA, G. J. M.; MURGAS, L. D. S.; SILVA, J. M. A.; MILIORINI, A. B.; LOGATO, P. V. R.; LIMA, D. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG E EBHC. **Revista Ceres**, v. 56, n. 2, p. 156-160, 2009.

PERINI, V. R. **Biologia reprodutiva e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* em um remanescente lótico da Bacia do Rio Grande**. Tese (Doutorado em Ciências). Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte. 2013.

POVH, J. A. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do Pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2007. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2007.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JR, D. P.; MOREIRA, H. L. M.; SIEWERDT, F.; LOPERA-BARRERO, N. M.; MANGOLIN, C. A.; VARGAS, L. Microsatellite Analysis of the Parental Contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the Production of Offspring in the Semi-natural System of Reproduction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 2, p. 389-396, 2010.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; STREIT JR, D.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Diversidade genética de Pacu do rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 2 p. 201-206, 2008.

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. **The Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: Edipucrs. RS. 2003, 729p.

REYNALTE-TATAJE, D. A.; LOPES, C. A.; ÁVILA-SIMAS, S.; GARCIA, J. R. E.; ZANIBONI-FILHO, E. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning? **Natural Science**, Delaware, v. 5, n. 7, p. 1-6, 2013.

RIBOLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, Maringá, v.7, n. 4, p.629-634, 2009.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; ALBUQUERQUE, D. M.; GOES, E. S. R.; PRADO, O. P. P. ; RIBEIRO, R. P. Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 48, n. 10, p. 1385-1393, 2013.

SCHORK, G.; HERMES-SILVA, S.; BEUX, L. F.; ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. D. O. Diagnóstico da pesca artesanal na usina hidroelétrica de Machadinho, alto Rio Uruguai–Brasil. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v. 38, n. 2, p. 97-108, 2012.

SILVA JUNIOR. **Uso do entorno do reservatório da UHE Promissão: uma análise ambiental atualizada, face à perspectiva de zoneamento**. 2006. Dissertação (Mestrado em Planejamento e Gestão Ambiental) – Universidade Católica de Brasília, Brasília. 2006.

SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata**. São Carlos: Rima, 2006. p. 275-284.

SOLIS-MURGAS, L.D; FELIZARDO, V.O; FELIZARDO; FERREIRA M.R.; ANDRADE, E.S.; VERAS, G.C. Importância da avaliação dos parâmetros reprodutivos em peixes nativos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 35, n. 2, p.186-191, 2011.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O.; Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALOSSO, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 45-73.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a variabilidade genética e a contribuição parental de *P. lineatus* obtidos dos sistemas de reprodução seminatural e por extrusão.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a variabilidade genética de *P. lineatus* obtidos dos sistemas reprodutivos seminatural e por extrusão na proporção de sexo 1:1 e 2:1.
- Analisar a divergência genética do estoque de reprodutores e dos alevinos de *P. lineatus* obtidos nos diferentes sistemas reprodutivos.
- Analisar a paternidade de *P. lineatus* obtidos nos diferentes sistemas de reprodução.

#### 4 ARTIGO A – NORMAS DO PERIÓDICO SCIENTIA AGRICOLA

##### **Influência do sistema reprodutivo e da proporção de sexo na variabilidade genética de progênies de *Prochilodus lineatus***

RESUMO: O curimba (*Prochilodus lineatus*) é um peixe migrador de grande importância econômica e ecológica. Devido a fatores antrópicos, como contaminantes poluentes, sobrepesca e construção de usinas hidrelétricas, tem-se observado redução populacional dessa espécie nos rios brasileiros, por este motivo a sua inclusão em programas de repovoamento tem incrementado nos últimos anos. O objetivo do presente trabalho foi avaliar variabilidade genética de *P. lineatus* obtidos dos sistemas reprodutivos seminatural e por extrusão na proporção de sexo 1:1 e 2:1. Foram coletadas amostras de nadadeira caudal de 25 reprodutores submetidos ao sistema por extrusão em diferentes proporções de sexo (1♂:1♀ e 2♂:1♀), 10 amostras de reprodutores submetidos ao sistema seminatural e da progênie obtida de cada um desses sistemas, sendo 138 e 70 amostras de nadadeira, respectivamente. Os 10 *loci* microssatélites pesquisados produziram 132 alelos. Observou-se alta variabilidade intrapopulacional para os parentais e alevinos de ambos os sistemas reprodutivos. Foi constatado um déficit de homozigotos através do coeficiente de endogamia (*F<sub>is</sub>*). O desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p \leq 0,05$ ) foi identificado para os alevinos de todos os sistemas. De acordo com a AMOVA, houve maior variação genética dentro dos sistemas reprodutivos do que entre eles. Portanto, ambos os sistemas reprodutivos e proporções de acasalamento proporcionam alevinos com alta variabilidade genética.

Palavras-chave: conservação, genética, *Prochilodus lineatus*, peixes migradores, repovoamento, seminatural

## Introdução

O curimba (*Prochilodus lineatus*) é uma espécie de peixe migrador de importância econômica e ecológica, encontrado nas bacias dos rios Paraná e Paraguai. Possui hábito iliógafo e tem como característica formar grandes cardumes na época reprodutiva (Botta et al., 2010; Machado e Foresti, 2012). No entanto, fatores como a construção de usinas hidrelétricas, despejo de contaminantes e sobrepesca vêm exercendo pressão sobre as populações naturais dessa espécie (Agostinho et al., 2007; Reynalte-Tataje et al., 2013).

Como alternativa para mitigar esses efeitos, programas de repovoamento são utilizados nos rios brasileiros como estratégia de conservação (Agostinho et al., 2007; Sirol e Britto, 2006). Nesse sentido, é imprescindível o monitoramento genético dos alevinos que serão liberados nos rios e também dos reprodutores, já que a variabilidade genética é fundamental para a sobrevivência e adaptação dos animais no ambiente natural (Lopera-Barrero et al., 2014).

Diferentes sistemas reprodutivos podem ser utilizados para obtenção de alevinos em programas de repovoamento, podendo inferir diferenças na variabilidade genética da progênie e no estresse causado aos reprodutores (Lopera-Barrero et al., 2014). Entre os principais modelos reprodutivos utilizados, destacam-se o sistema por extrusão e o sistema seminatural. O sistema reprodutivo por extrusão é caracterizado por não possuir tanques de desova e pela maior facilidade no manejo de gametas (Zaniboni-Filho e Nuñez, 2004), entretanto, uma maior mortalidade geralmente é observada quando se utiliza o sistema por extrusão, principalmente devido ao estresse durante o manuseio dos animais (Lopera-Barrero et al., 2014; Reynalte-Tataje et al., 2013). Por outro lado, no sistema seminatural é esperado melhores taxas de fertilização, eclosão, conservação da variabilidade genética e menores taxas

de mortalidade dos reprodutores quando comparado ao sistema por extrusão (Reynalte-Tataje et al., 2013).

Estudos indicam que a reprodução com diferentes proporções de machos em relação a fêmeas pode influenciar na composição genética da progênie, de modo que a utilização de pool de sêmen ou acasalamentos individuais são capazes exercer efeito sobre a variabilidade genética dos alevinos (Riboli e Zaniboni-Filho, 2009). No entanto, não se conhece o efeito de diferentes proporções de sexo e sistemas reprodutivos sobre a progênie de *P. lineatus*.

O objetivo desse estudo foi analisar a variabilidade genética de *P. lineatus* obtidos dos sistemas reprodutivos seminatural e por extrusão na proporção de sexo 1:1 e 2:1.

## **Material e Métodos**

### **Sistemas reprodutivos**

A reprodução dos peixes nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural foi realizada na estação de hidrobiologia (21°19'01.2"S 49°47'22.8"O) localizada na cidade de Promissão, em São Paulo. As análises moleculares foram realizadas nos laboratórios das universidades localizadas nas cidades de Londrina e Maringá, no estado do Paraná. As metodologias empregadas durante esse experimento foram aprovadas pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA\_UEL nº17156.2012.50).

Foram selecionados 35 reprodutores de curimba oriundos da estação de hidrobiologia, dividindo-os de acordo com o sistema de reprodução e proporção de sexo, sendo no sistema por extrusão, utilizado cinco machos e cinco fêmeas (proporção 1:1), e 10 machos e cinco fêmeas (2:1); no sistema seminatural, foi utilizado cinco machos e cinco fêmeas (1:1).

O critério de seleção dos animais foi baseado nas condições físicas como o abaulamento abdominal e hiperemia da papila urogenital. Foi realizada uma biometria de cada reprodutor

para o cálculo da dosagem hormonal a ser aplicada para induzir a reprodução. Para a indução à reprodução, o extrato de hipófise de carpa foi aplicado através de seringa de 1 mL na base da nadadeira dorsal (aplicação intramuscular), para esse procedimento, os animais foram capturados e contidos pela cabeça e base da cauda. As fêmeas receberam  $5.5 \text{ mg kg}^{-1}$ , divididos em duas aplicações,  $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$  na primeira aplicação e  $5 \text{ mg kg}^{-1}$  12h depois, e os machos receberam  $2.5 \text{ mg kg}^{-1}$  em dose única, concomitantemente com a segunda aplicação da fêmea (adaptado de Pereira et al., 2009).

Os reprodutores do sistema reprodutivo por extrusão foram acondicionados separadamente (machos e fêmeas) em tanques de concreto de  $2 \text{ m}^3$ , posteriormente, a temperatura da água foi mensurada a cada hora afim de obter a hora grau<sup>-1</sup> necessária para a realização da desova. Aproximadamente oito horas após a segunda dose ( $220 \text{ horas grau}^{-1}$ , temperatura média de  $27 \text{ }^\circ\text{C}$ ), o procedimento de extrusão foi realizado seguindo a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al., 2014. Foi utilizado pool de sêmen (semên de todos os machos) para a fertilização dos oócitos imediatamente coletados.

Os acasalamentos no sistema reprodutivo seminatural sucederam de maneira idêntica ao sistema por extrusão 1:1, no entanto, logo após o processo de hipofisação, os reprodutores foram acondicionados em tanques circulares ( $4 \text{ m}$  de diâmetro e  $1.5 \text{ m}$  de profundidade) e com sistema de circulação forçada de água com o objetivo de simular condições ambientais encontradas na natureza (correnteza nos rios), ocorrendo assim um acasalamento seminatural entre os diversos casais e viabilizando um processo de fertilização aleatória. Após o processo de acasalamento e fertilização, a qual ocorreu após  $220 \text{ horas grau}^{-1}$ , os ovos foram direcionados para uma estação coletora através de um tubo localizado na região central do tanque, possibilitando a coleta dos mesmos e sua adequação em incubadoras cilíndrico-cônicas (captação de  $200 \text{ litros}$  com fluxo contínuo de água) onde aconteceu a formação e

nascimento das larvas. A mortalidade em ambos os sistemas reprodutivos foi verificada 24h após o procedimento de desova.

### **Coleta de nadadeiras, extração e quantificação do DNA**

Para a extração do DNA foram coletadas um total de 35 amostras de nadadeira caudal dos reprodutores (para os dois sistemas), 69 amostras de nadadeira dos alevinos obtidos pelo sistema por extrusão (1:1), 69 amostras de nadadeira dos alevinos derivados do sistema por extrusão (2:1) e 70 amostras de nadadeira dos alevinos obtidos pelo sistema seminatural. As amostras de nadadeira caudal de alevinos foram coletadas aos 90 dias após a eclosão dos ovos.

O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo de extração contendo NaCl (Lopera-Barrero et al., 2008). Posteriormente, para visualizar a qualidade do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (0.01) corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) conduzida em tampão TBE 1X (500 m mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 60 m mol L<sup>-1</sup> ácido bórico e 83 m mol L<sup>-1</sup> EDTA), por duas horas, a 80 volts. O gel foi visualizado em aparelho transiluminador com luz ultravioleta, sendo que a imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

A quantificação foi realizada através do espectrofotômetro PICODROP® (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom), padronizando-se as amostras através de diluição para uma concentração final de 20 ng µL<sup>-1</sup>.

### **Amplificação do DNA e eletroforese em gel de poliacrilamida**

A amplificação foi realizada para um volume final de reação de 15 µL, utilizando-se 1X do tampão Tris-KCl, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 0.2 mM de cada dNTP, meia unidade de Platinum *Taq* DNA Polimerase e 20 ng de DNA.

Inicialmente o DNA foi desnaturado a 95 °C por cinco minutos e em seguida realizaram-se 35 ciclos de 60 segundos de desnaturação a 94 °C; 60 segundos de anelamento (Tabela 1); e 60 segundos de extensão a 72 °C; por fim realizou-se uma extensão final a 72 °C por 20 minutos. Foram avaliados 10 *loci* microssatélites: Par12, Par14, Par15, Par21, Par43, Par80 (Barbosa et al., 2006; Barbosa et al., 2008), Pl01, Pli30, Pli43 e Pli60 (Yazbeck e Kalapothakis, 2007). As reações foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA).

**Tabela 1** – Caracterização dos dez *loci* microssatélites utilizados.

<i>Locus</i>	Sequência Motif	Sequência 5' – 3'	TA (°C)
Par12	(AAAC) <sub>7</sub>	F: CGAGCTGGTACCGTCACATA R: AGCATGATGCAAAGGATCTG	54
Par14	(TGTC) <sub>5</sub>	F: GTATTAGGGGAGAGAATTTG R: TCTCATCAGTTATCACCAAC	48
Par15	(CT) <sub>19</sub> (GTCT) <sub>10</sub>	F: AGTTGGTTACACCTAACATC R: TCTTAATATGGGTCCACTAC	47
Par21	(ATGA) <sub>6</sub>	F: CAAAAGGATAAGTAGCTCAG R: TAGCTCTGTTTATGATGACC	50
Par43	(GA) <sub>6</sub> (CA) <sub>2</sub> (CAGA) <sub>4</sub> (GA) <sub>21</sub>	F: GGCGTCTGACTCGTTACCTC R: AACCTCATTCCCTCAAGTGC	52
Par80	(CT) <sub>37</sub>	F: CTAACCTACAAACCTCATTC R: CTGTAAGCTCCACTTATC	52
PL1	(AATTT) <sub>10</sub>	F: TGACTGTGAACACGGTCACGC R: ACACAGTAGAACATACCTCTG	52
Pli30	(GTCT) <sub>n</sub>	F: GATGTCGGTTCTTGTACAGTGGTG R: AGCTGCTGAGGATTCTGGGTCAC	66
Pli43	(GT) <sub>13</sub>	F: AGTCCACTCCTTAGGCGAGTGAG R: ATAGACGGGCATGTGTCACAGCT	60
Pli60	(GA) <sub>13</sub>	F: GCTAGGACGGTTAGCGTCCACTG R: CGACACGTACATCATTACCTCGG	67

TA (°C): Temperatura de anelamento

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida – 29 : 1) desnaturante (6 M de uréia), e conduzida em tampão TBE 0.5 X com 180 V e 250 mA por oito horas. Para a visualização dos alelos, o gel foi submetido a uma solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético) por 20 minutos seguido de solução 6 mM de nitrato de prata por 30 minutos e revelado em solução de 0.75 M de NaOH e 0.22% de formol-40% (Bassam et al., 1991). O gel foi fotografado com câmera Nikon CoolPix 5200. O tamanho dos alelos foi calculado pelo utilizando-se DNA *ladder* (Invitrogen) de 100 pb.

### **Análises Estatísticas**

A heterozigose observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ), o equilíbrio de Hardy Weinberg ( $H_w$ ) foram calculados para cada *locus* utilizando-se o programa POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1999). A AMOVA (Análise de variância molecular), a diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) entre os parentais e a progênie (Weir e Cockerham, 1984) e o desequilíbrio de ligação ( $p < 0.05$ ) foram obtidos com o programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005). A frequência alélica, riqueza alélica ( $R_a$ ) e índice de fixação ( $F_{is}$ ) foram calculados utilizando o programa FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2005). O nível de significância adotado para o  $F_{ST}$  e  $F_{is}$  foi  $p < 0.05$ . Foi utilizada a definição de Wright (1978), onde 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. A presença de alelos nulos foi testada pelo programa Micro-Checker (Van Oosterhout et al., 2004).

## **Resultados**

Foi verificado um total de 132 alelos nos 10 *loci* amplificados. O número total de alelos por *locus* variou de sete (Pli60) a 20 (Pli30), os tamanhos (pb) variam de 115 bp (Par15) a 390 bp (Par30).

Os valores médios de Heterozigose Observada (Ho) e Heterozigose Esperada (He) foram maiores na progênie em relação aos parentais (reprodutores) nos dois sistemas reprodutivos e mostraram uma alta variabilidade genética nas progênies obtidas através dos acasalamentos (Tabela 2). O maior e o menor valor médio de Ho foram encontrados nos alevinos provenientes do sistema seminatural 1:1 (0.720) e nos reprodutores do sistema extrusão 1:1 (0.575), respectivamente. Os valores de índice de Shannon (I) também mostraram alta variabilidade genética para todos os grupos (Tabela 2).

A riqueza alélica (Ra) mostrou resultados mais elevados nos alevinos e reprodutores do sistema por extrusão 2:1 (8.432 e 7.568, respectivamente) e menores nos alevinos e reprodutores do sistema extrusão 1:1 (6.252 e 5.978). O índice de fixação (Fis) ( $p < 0.05$ ) indicou um déficit de heterozigotos, principalmente nos alevinos do sistema de extrusão 1:1 e 2:1, entretanto, esse excesso não influenciou as progênies, pois as mesmas apresentaram alta variabilidade genética. Houve desvio de Hardy-Weinberg ( $p \leq 0.05$ ) para os alevinos de todos os sistemas e proporções (Tabela 2).

**Tabela 2** – Médias da Heterozigose observada (Ho), heterozigose esperada (He), índice de Shannon (I), riqueza alélica (Ra), índice de fixação (Fis) e teste de probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_w$ ) para os reprodutores e alevinos de *Prochilodus lineatus*.

<i>Locus</i>	Extrusão 1:1		Extrusão 2:1		Seminatural 1:1	
	Repr.	Alev.	Repr.	Alev.	Repr.	Alev.

Par12	Ho	1	0.666	0.800	0.785	0.600	0.666
	He	0.892	0.836	0.855	0.895	0.755	0.784
n=11	I	1.559	1.644	1.837	2.186	1.359	1.620
	Ra	5.596	5.898	6.92	8.766	6.695	6.672
	<i>Fis</i>	0.154*	0.319*	0.067*	0.243*	0.100*	0.133*
	H <sub>w</sub>	0.942	0.000*	0.501	0.000*	0.337	0.000*
Par14	Ho	0.250	0.555	0.600	0.6071	0.600	0.666
	He	0.250	0.483	0.806	0.861	0.511	0.712
n=13	I	0.376	0.960	1.739	2.084	0.801	1.329
	Ra	4.368	2.4	7.361	7.941	5.789	7.768
	<i>Fis</i>	-0.139*	-0.165*	0.263*	0.216*	0.031	0.359*
	H <sub>w</sub>	1.000	0.035*	0.005*	0.000*	0.308	0.000*
Par15	Ho	0	0.285	0.333	0.440	1.000	0.7778
	He	0.666	0.824	0.7536	0.827	0.733	0.843
n=13	I	0.693	1.512	1.515	1.734	1.193	1.673
	Ra	5.000	6.238	6.000	9.022	5.889	7.244
	<i>Fis</i>	0.717*	0.761*	0.569*	0.416*	0.034	0.451*
	H <sub>w</sub>	0.002*	0.000*	0.009*	0.000*	0.004*	0.000*
Par21	Ho	0.500	0.666	0.666	0.750	0.600	0.777
	He	0.821	0.869	0.800	0.892	0.844	0.908
n=14	I	1.320	1.810	1.751	2.285	1.504	2.003
	Ra	6.730	6.303	7.526	8.274	7.795	7.518
	<i>Fis</i>	0.208*	-0.015	0.172*	0.303*	0.232*	0.191*
	H <sub>w</sub>	0.057	0.009*	0.245	0.000*	0.080	0.000*

Par43	Ho	1.000	0.875	0.600	0.678	0.60	0.777
	He	0.800	0.691	0.793	0.872	0.800	0.771
n=16	I	1.242	1.450	1.856	2.176	1.418	1.581
	Ra	6.542	7.060	9.091	9.421	6.595	7.521
	<i>Fis</i>	-0.306*	0.174*	0.250*	0.148*	-0.067*	0.219*
	H <sub>w</sub>	1.000	0.000*	0.055	0.000*	0.598	0.003*
Par80	Ho	0.250	0.666	0.600	0.592	0.800	0.666
	He	0.678	0.784	0.878	0.865	0.866	0.823
n=15	I	0.974	1.532	2.006	2.037	1.748	1.692
	Ra	6.337	8.214	8.390	10.718	6.695	6.953
	<i>Fis</i>	0.119*	0.417*	0.324*	0.291*	0.154*	0.248*
	H <sub>w</sub>	0.762	0.000*	0.001*	0.000*	0.267	0.000*
Pl1	Ho	0.500	0.666	0.600	0.535	0.600	0.666
	He	0.750	0.869	0.864	0.875	0.888	0.869
n=12	I	1.213	1.875	1.927	2.057	1.695	1.875
	Ra	7.168	6.581	7.75	7.223	7.695	6.688
	<i>Fis</i>	0.312*	0.293*	0.313*	0.310*	0.329*	0.387*
	H <sub>w</sub>	0.019*	0.000*	0.004*	0.000*	0.130	0.000*
Pl30	Ho	1.000	0.888	0.666	0.678	1.000	0.777
	He	0.892	0.928	0.926	0.891	0.933	0.875
n=20	I	1.559	2.197	2.358	2.303	1.973	1.952
	Ra	9.042	8.936	11.251	8.182	8.000	10.088
	<i>Fis</i>	0.111*	0.379*	0.288*	0.048	0.187*	0.282*
	H <sub>w</sub>	0.482	0.000*	0.008*	0.000*	0.080	0.000*

Pli43	Ho	1.000	0.714	0.866	0.928	0.750	0.875
	He	0.666	0.824	0.862	0.87	0.857	0.866
n=11	I	0.693	1.593	1.903	2.075	1.494	1.786
	Ra	6.000	6.983	7.589	8.799	7.000	6.84
	<i>Fis</i>	0.239*	-0.037	-0.006	-0.007	-0.049	-0.163*
	H <sub>w</sub>	0.104	0.000*	0.885	0,004*	0.024*	0.000*
	<hr/>						
Pli60	Ho	0.250	0.111	0.266	0.148	0.400	0.555
	He	0.750	0.647	0.705	0.741	0.622	0.699
n=17	I	1.082	1.011	1.199	1.403	0.95	1.089
	Ra	3.000	3.900	3.800	5.977	3.000	4.557
	<i>Fis</i>	0.859*	0.799*	0.630*	0.886*	0.136*	0.338*
	H <sub>w</sub>	0.003*	0.000*	0.000*	0.000*	0.442	0.000*
	<hr/>						
Média	Ho	0.575	0.6097	0.600	0.6145	0.695	0.720
	He	0.716	0.775	0.824	0.859	0.7813	0.815
	I	1.071	1.559	1.809	1.770	1.413	1.660
	Ra	5.978	6.252	7.568	8.432	6.555	7.185
	<i>Fis</i>	0.250*	0.310*	0.280*	0.281*	0.114*	0.245*
	H <sub>w</sub>	NS	*	NS	*	NS	*

Reprod.: Reprodutores; NS: Não significafivo; \*Significativo ( $p \leq 0.05$ )

O desequilíbrio de ligação ( $p < 0.05$ ) foi identificado para 7 *loci* nos reprodutores do grupo extrusão 1:1 (Par12, Par15, Par43, Par80, Pl1, Pli30 e Pli43), para 6 *locus* nos reprodutores do grupo extrusão 2:1 (Par14, Par15, Par43, Par80, Pli30 e Pli43) e para para 9 *locus* nos reprodutores do sistema seminatural 1:1 (Par12, Par15, Par21, Par43, Par80, Pl1, Pli30, Pli43 e Pli60). Os alevinos oriundos de ambos os sistemas reprodutivos apresentaram desequilíbrio de ligação para todos os *locus*.

Os resultados da AMOVA mostraram que essa variação genética ( $p \leq 0.05$ ) foi maior dentro dos grupos do que entre os grupos, principalmente no sistema seminatural 1:1 (0.963) (Tabela 3). A diferenciação genética entre os estoques segundo a classificação de Wright (1978) foi moderada para os indivíduos da extrusão 1:1 (0.137) e baixa para os indivíduos dos grupos extrusão 1:2 e seminatural 1:1 (0.040 e 0.038, respectivamente) (Tabela 3).

**Tabela 3** – AMOVA e diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) calculados para os seis grupos de reprodutores e alevinos de *Prochilodus lineatus*.

<b>Fator de variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes da Variância</b>	<b>% de Variação</b>	<b><math>F_{ST}</math></b>
<b>Extrusão 1:1</b>				
Entre os grupos	25.943	0.611	13.729*	0.137
Dentro dos grupos	570.599	3.845	86.270	
Total	596.542	4.457	100	
<b>Extrusão 2:1</b>				
Entre os grupos	14.200	0.182	4.053*	0.040
Dentro dos grupos	693.797	4.307	95.946	
Total	707.967	4.489	100	
<b>Seminatural 1:1</b>				
Entre os grupos	10.593	3.684	3.684*	0.038
Dentro dos grupos	636.797	4.216	96.315	
Total	647.390	4.377	100	

\*  $p \leq 0.05$  (nível de significância dada por 1023 permutações).

Nos reprodutores do sistema por extrusão 1:1 foi verificada a presença de alelos nulos nos *loci* Par15 e Pli60, enquanto nos alevinos foi verificado no Par12, Par15, Par43, Par80,

PL01, Pli30 e Pli60. Nos reprodutores do sistema extrusão 1:2 os alelos nulos estavam presentes no Par15, Par80, PL01, Pli30 e Pli60, enquanto que nos alevinos foram detectados na maioria dos *loci*, com exceção do Pli30 e Pli43. Nos reprodutores do sistema seminatural 1:1 foi verificado alelos nulos apenas no PL01, entretanto, nos alevinos desse sistema houve a presença de alelos nulos na maioria dos *loci*, com exceção do Pli43.

No sistema por extrusão houve mortalidade de três reprodutores, sendo dois do sistema por extrusão 1:1 e um do sistema por extrusão 2:1. No sistema seminatural não houve mortalidade.

### Discussão

O tamanho alelos e número de alelos por *locus* foi semelhante ao encontrado por outros trabalhos com *P. lineatus* (Yazbeck e Kalapothakis, 2007; Lopera-Barrero et al., 2015). A heterozigiosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) caracterizaram elevada variabilidade genética, corroborando ao encontrado por estudos com populações naturais desse gênero (Hatanaka et al., 2006; Lopera-Barrero et al., 2016). A variabilidade indicou que o plantel de reprodutores foi formado através de indivíduos que possuíam elevada diversidade genética (ausência de efeito fundador), o que permitiu a formação de progênes com alta variação gênica através dos acasalamentos e em todos os sistemas reprodutivos. Assim, pode-se inferir que ambos os sistemas reprodutivos proporcionaram adequadas taxas de variabilidade genética na progênie, sendo adequados para utilização em programas de repovoamento.

Dentro desse contexto, deve destaca-se que o sistema reprodutivo seminatural produziu a progênie com maior variabilidade genética. Lopera-Barrero et al. (2014), ao comparar os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural em acasalamentos de 20 reprodutores (10♂ e 10♀) de *Brycon orbignyanus*, encontraram maior variabilidade genética na progênie obtida

pelo sistema seminatural do que com o sistema por extrusão ( $H_o = 0.945$  e Índice de Shannon -  $I = 0.924$ ;  $H_o = 0.823$  e  $I = 0.886$ , respectivamente). Da mesma forma, em uma pesquisa realizada com *Piaractus mesopotamicus*, Povh (2007) encontrou maior variabilidade genética na progênie do sistema seminatural ( $I = 0.365$  e percentagem de polimorfismo de 0.605) quando comparada com o sistema por extrusão ( $I = 0.298$  e percentagem de polimorfismo de 0.534), sendo constatada maior similaridade genética dos reprodutores e alevinos no sistema por extrusão. Rodriguez-Rodriguez et al. (2010) também encontraram alta variabilidade genética ( $H_o = 0.864$  e 0.635 para alevinos e larvas, respectivamente) na progênie de *B. orbignyanus* oriundos do sistema de reprodução seminatural. As proporções de acasalamento dos reprodutores (1:1 e 1:2) pouco diferiram sobre a variabilidade genética das progênies, tendo em vista que em todos os grupos houve um incremento dessa variabilidade.

Os valores médios da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foram maiores que a média da heterozigosidade observada ( $H_o$ ) em todos os grupos, o que possivelmente inferiu o desvio significativo no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_w$ ) para os alevinos, indicando déficit de heterozigotos através do coeficiente  $F_{is}$ . Em populações grandes com acasalamentos ao acaso, é esperado que a segregação dos alelos nos *locus* seja realizada de maneira independente, ou seja, em equilíbrio de ligação (Caujapé-Castells, 2006). No entanto, o elevado número de *locus* em desequilíbrio de ligação ( $p < 0.05$ ) (alelos associados em dois ou mais *locus*) (Caujapé-Castells, 2006), reflete a acentuada deriva genética existente, principalmente nos alevinos de ambos os sistemas. De acordo com Romana-Eguia et al, (2004), a deriva genética pode provocar desvios significativos no  $H_w$ , principalmente em estoques mantidos em pisciculturas, já que o número de reprodutores é limitado, o que pode acentuar as mudanças ao acaso das frequências alélicas ao longo das gerações.

A presença de alelos nulos (provocados por erros nas regiões flanqueadoras que impedem a correta ligação do *primer* no DNA) também pode influenciar o déficit de

heterozigotos, visto que a presença desses alelos aumenta de forma errônea a detecção de genótipos homozigotos (Aung et al., 2010; Chapuis e Estoup, 2007). No entanto, a presença de alelos nulos não deve ter afetado a variabilidade genética, já que mesmo que eles possam superestimar os valores de homozigose, a heterozigosidade observada foi elevada para os alevinos e reprodutores dos dois sistemas reprodutivos.

Em programas de repovoamento apenas alguns casais podem produzir milhares de descendentes que compõem uma progênie. Frente a isto, fica evidente a possibilidade de surgimento de gargalos genéticos (Machado-Schiaffino et al., 2007), ainda mais quando se considera que apenas uma parte dos reprodutores é substituída por animais oriundos de outros rios ou bacias, acarretando em um possível afinamento genético provocado ao longo das gerações. Nesse contexto é importante ressaltar que a variabilidade genética intrapopulacional foi alta em todos os grupos, indicando que, apesar do déficit de heterozigotos observado, a variabilidade foi mantida. Também se deve destacar a importância do constante monitoramento genético desses estoques em cativeiro, tendo em vista que os valores positivos do coeficiente  $F_{is}$  atenta a possibilidade de diminuição da variabilidade genética dos reprodutores e conseqüentemente dos alevinos nos próximos acasalamentos, acarretando em diminuição da adaptabilidade da progênie no ambiente natural. Antes que isso ocorra, sugere-se a reposição dos reprodutores (sempre baseada em análises genéticas), agregando assim um novo pool genético à composição das próximas progênies.

A diferenciação genética ( $F_{ST}$ ) no sistema por extrusão 1:1 foi moderada em relação aos outros sistemas (pequena diferenciação genética). Esse fato pode ser justificado por uma maior dominância reprodutiva nesse sistema, o que ocasionou uma contribuição desigual dos reprodutores na composição genética dos alevinos. Por outro lado, a pequena diferenciação genética nos grupos de extrusão 2:1 e seminatural 1:1, pode presumir uma contribuição mais homogênea dos parentais, principalmente no sistema seminatural. O sistema seminatural

reduz a seleção não intencional dos gametas, o que dificilmente ocorre no sistema por extrusão, visto que, nesse sistema há maior chance de direcionamento reprodutivo, além de promover maior estresse ao animal (Lopera-Barrero et al., 2014; Reynalte-Tataje et al., 2013). Esses resultados são fortalecidos por outras pesquisas realizadas com o sistema reprodutivo seminatural, que observaram paternidade múltipla e contribuição de diversos reprodutores na constituição da progênie com este tipo de sistema (Lopera-Barrero et al., 2014; Povh et al., 2010).

A maior mortalidade encontrada no sistema por extrusão evidencia o maior estresse causado ao peixe nesse sistema. Zanoni et al. (2015) ao estudar reprodutores de *Brycon orbignyianus* submetidos a reprodução nos sistemas reprodutivos seminatural e por extrusão observaram que o sistema por extrusão pode promover alterações metabólicas (elevação do nível de cortisol e glicose) e hematológicas não evidenciadas no sistema seminatural. Esses resultados apontam que o sistema seminatural permite preservar de forma mais eficaz as características naturais da espécie, gerando menos estresse reprodutivo e contribuindo paralelamente com a diminuição da mortalidade e com a preservação da variabilidade genética da progênie (Lopera-Barrero et al., 2014; Rodriguez-Rogriguez et al., 2010). Apesar disso, ressalta-se novamente que para *P. lineatus* ambos os sistemas reprodutivos proporcionaram adequadas taxas de variabilidade genética na progênie, sendo adequados para utilização em programas de repovoamento. Entretanto, devido ao número limitado de reprodutores, é fundamental a manutenção de um alto número de animais que produzam descendentes e o constante controle da variabilidade genética existente, principalmente para identificar e evitar quadros endogâmicos. Nesse sentido, será possível a continuidade do programa de repovoamento através da manutenção da alta variabilidade genética dos alevinos que serão soltos.

Concluindo, as progênies de *Prochilodus lineatus* obtidas em ambos os sistemas reprodutivos e proporções de acasalamento apresentaram alta variabilidade genética, caracterizando tais metodologias reprodutivas aptas para utilização em programas de repovoamento dessa espécie. No entanto, fica evidente a necessidade do monitoramento genético dos alevinos que serão obtidos nas próximas gerações, tendo em vista a possibilidade de diminuição da variabilidade genética em virtude dos elevados valores de *F<sub>is</sub>*.

### **Conflito de interesse**

Os autores declaram que não há conflito de interesse relacionado ao presente trabalho. Os autores garantem que o manuscrito não foi publicado ou está em prelo em algum outro periódico.

### **Agradecimentos**

Nós agradecemos a AES Tiête pela disponibilização da estrutura física e pelos animais envolvidos no presente trabalho, à ANNEL pelo financiamento do projeto e a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão de bolsa de estudo.

### **Referências**

Agostinho, A.A.; Gomes, L.C.; Pelicice, F.M. 2007. Ecology and management of fishing resources in Brazil reservoirs. 1ed. Eduem, Maringá, PR, Brazil. (in Portuguese).

- 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.
- Barbosa, A.C.D.R.; Corrêa, T.C.; Galzerani, F.; Galetti, P.M.; Hatanaka, T. 2006. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Resources* 6: 936-938.
- Barbosa, A.C.D.R.; Galzerani, F.; Corrêa, T.C.; Galetti, P.M.; Hatanaka, T. 2008. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics Molecular Biology* 31: 357-360.
- Bassam, B.J.; Caetano-Anollés, G.; Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- Botta, P.; Sciara, A. 2010. Study of the embryonic development in sabalo (*Prochilodus lineatus*). *Archivos de Medicina Veterinaria* 114: 109-114.
- Caujapé-Castells, J. 2006. Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. Las Palmas de Gran Canaria: Exegen. 133p.
- Chapuis, M.P.; Estoup, A. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology Evolution* 24: 621-631.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Goudet, J. 2005. FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3.2). <http://www.unil.ch/izea/software/FSTat.html> (accessed 05.05.2016)

- Hatanaka, T.; Henrique-Silva, F.; Galetti, P.M. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica* 126: 153-159.
- Lopera-Barrero, N.M.; Povh, J.A.; Ribeiro, R.P.; Gomes, P.C.; Jacometo, C.B.; Silva, T.L. 2008. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: Modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e Investigación Agraria* 35: 65-74.
- Lopera-Barrero, N.M.; Alvarez, C.A.R.; Rodriguez-Rodriguez, M.D.P.; Povh, J.A.; Vargas, L.; Streit Júnior, D.P.; Sirol, R.N.; Ribeiro, R.P. 2014. Genetic diversity and paternity of *Brycon orbignyanus* offspring obtained for different reproductive systems. *Semina: Ciências Agrárias* 35: 541-554.
- Lopera-Barrero, N.M.; Santos, S.C.A.; Rodriguez-Rodriguez, M.P.; Fornari, D.C.; Zancheta, C.; Poveda-Parra, A.R.; Oliveira, C.A.L.; Ribeiro, R.P. 2015. Genetic diversity of wild populations and broodstocks of curimba for restocking programs in the Tietê, Grande, Pardo and Mogi-Guaçu rivers (Brazil). *Boletim do Instituto de Pesca* 41: 287-304.
- Lopera-Barrero, N. M.; Santos, S. C. A.; Goes, E. S. R.; Castro, P. L.; Souza, F. P.; Poveda-Parra, A. R.; Casseta, J.; Pontillo, B.G.; Ribeiro, R.P. 2016. Monitoramento e conservação genética de populações naturais de *Prochilodus lineatus* dos rios Pardo, Mogi-Guaçu e Tietê, São Paulo. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, Belo Horizonte 68:1621-1628.
- Machado, M.R.F.; Foresti, F. 2012. Morphometric characteristics of *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1847), of the migratory and resident stocks of the river Mogí-Guaçu, São Paulo State, Brazil. *Acta Scientiarum. Animal Sciences* 34: 341-346.
- Machado-Schiaffino, G.; Dopico, E.; Garcia-Vazquez, E. 2007. Genetic variation losses in Atlantic salmon stocks created for supportive breeding. *Aquaculture* 264: 59-65.

- Pereira, G. J. M.; Murgas, L. D. S.; Silva, J. M. A.; Miliorini, A. B.; Logato, P. V. R.; Lima, D. 2009. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG E EBHC. Revista Ceres 56:156-160.
- Povh, J.A. 2007. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. Thesis. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá. Print.
- Povh, J.A.; Ribeiro, R.P.; Sirol, R.N.; Streit, D.P.; Moreira, H.L.M.; Siewerdt, F.; Lopera-Barrero, N.M.; Mangolin, C.A.; Vargas, L. 2010. Microsatellite analysis of the parental contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the production of offspring in the semi-natural system of reproduction. Brazilian Archives of Biology Technology 53: 389-396.
- Reynalte-Tataje, D.; Lopes, C.; Ávila-Simas, S.; Garcia, J.; Zaniboni-Filho, E. 2013. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning? Natural Science 5: 1-6.
- Riboli, J.; Zaniboni-Filho, E. 2009. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. Neotropical Ichthyology 7: 629-634.
- Rodriguez-Rodriguez, M.P.; Lopera-Barrero, N.M.; Ribeiro, R.P.; Povh, J.A.; Vargas, L.; Sirol, R.N.; Jacometo, C.B. 2010. Genetic diversity of piracanjuba used in stock enhancement programs with microsatellite markers. Pesquisa Agropecuária Brasileira 45: 56-63.
- Romana-Eguia, M.R.R.; Ikeda, M.; Basiao, Z.U.; Taniguchi, N. 2004. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. Aquaculture 236: 131-150.
- Sirol, R.N.; Britto, S.G. 2006. Conservation and management of fish populations: restocking. p. 275-284. In: Nogueira, M.G.; Henry, R.; Jorcin, A., eds. Reservoirs ecology: potential impacts, management actions and systems waterfalls. Rima, São Carlos, SP, Brazil. (in Portuguese).

- 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. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wright, S. 1978. *Evolution and genetics of population*, 1ed. University of Chicago Press, Chicago, IL, EUA.
- Yazbeck, G.M.; Kalapothakis, E. 2007. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). *Genetics and Molecular Research* 6: 1026-1034.
- Yeh, F. C.; Boyle, T. Y. Z.; Xiyan, J. M., 1999. PopGene Version 131: Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 29 p.
- Zaniboni-Filho, E.; Nuñez, A.P.O. 2004. Physiology of reproduction and artificial propagation of fish, p. 45-73. In: Cyrino, J.E.P.; Urbinati, E.C.; Fracalossi, D.M.; Castagnolli, N., eds. *Special topics in pisciculture intensive tropical freshwater*. TecArt, SP, Brazil.
- Zanoni, M.A.; Costa, F.G.; Carvalho, S.; Seiva, F.R.F. 2015. Physiological and biochemical changes of females of Piracanjuba, subjected to induced reproduction. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 100: 673-679.

## 5 ARTIGO B – NORMAS DO PERIÓDICO CIÊNCIA RURAL

### Contribuição parental na progênie de curimba em diferentes sistemas reprodutivos

#### Parental contribution of curimba offspring in different reproductive systems

#### RESUMO

O conhecimento da biologia reprodutiva de peixes nativos e a aplicação de metodologias apropriadas para a reprodução em programas de repovoamento é fundamental para minimizar os impactos antrópicos sobre as populações naturais de peixes. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a contribuição parental de *Prochilodus linetaus* obtidos por dois sistemas reprodutivos, por extrusão e seminatural. Foram coletadas amostras de nadadeira caudal de 25 reprodutores submetidos ao sistema reprodutivo por extrusão em diferentes proporções de sexo (1♂:1♀ e 2♂:1♀) e de 138 alevinos oriundos desses acasalamentos. De maneira similar, foram coletadas amostras de nadadeira de 10 reprodutores (1♂:1♀) submetidos ao sistema reprodutivo seminatural. Para a análise de paternidade, foram amplificados 10 *loci* microssatélites. Os dados foram submetidos ao software PAPA versão 2.0 para análise da contribuição genética dos reprodutores. Paralelamente, foram coletadas amostras de semen para avaliação seminal dos animais submetidos ao sistema de extrusão. No sistema por extrusão 1:1 observou-se que um macho (M4) obteve maior contribuição na formação progênie (41,8%) enquanto que na proporção 2:1, quatro machos contribuíram entre 14,5 a 21,7%. A menor dominância reprodutiva foi identificada no sistema seminatural, com valores variando de 22,86% a 25,71% para quatro machos. As fêmeas do sistema seminatural também demonstraram maior homogeneidade na contribuição para a progênie (12,85 a 25,71%). A análise seminal demonstrou alterações na motilidade, concentração, volume e índice de normalidade para alguns machos, o que influenciou na contribuição destes para a

progênie. Conclui-se que o sistema seminatural proporcionou maior homogeneidade na contribuição para a progênie de *P. lineatus*. Houve participação mais efetiva dos machos no sistema por extrusão 2:1, influenciada pelo número de indivíduos e características seminais de cada macho.

**Palavras-chave:** conservação, genética, microsatélites, *Prochilodus lineatus*, peixes reofílicos, programas de repovoamento

## ABSTRACT

Knowledge of the reproductive biology of native fish and the application of appropriate methodologies for reproduction in restocking programs is fundamental to minimize human impacts on natural fish populations. The objective of the present study was to evaluate the parental contribution of *Prochilodus lineatus* obtained by extrusion and seminatural reproductive systems. Samples of caudal fin of 25 breeders subjected by extrusion reproduction system were collected at different sex ratios (1♂: 1♀ and 2♂: 1♀) and 138 fingerlings originating from these matings. Similarly, samples were collected from 10 breeders fin (1♂: 1♀) submitted to semi-natural reproductive system and 70 fingerlings generated this mating. For paternity analysis, 10 microsatellite loci was amplified. The data were submitted to PAPA software version 2.0 for analysis of the genetic contribution of the breeders. At the same time, semen samples were collected for seminal evaluation of the animals submitted to the extrusion system. In 1:1 extrusion system was observed that a male (M4) had a higher contribution in the progeny formation (41.8%) whereas the 2: 1 ratio, four males contributed from 14.5 to 21.7 %. The lower reproductive dominance was identified in the semi-natural system, with values ranging from 22.86 % to 25.71 % for four males. The females in semi-natural system also showed greater homogeneity in contributing to the

progeny (12.85 to 25.71%). The seminal analysis showed changes in motility, concentration, volume and normality index for some males, which influenced the contribution of these to the progeny. It is concluded that the semi-natural system provided greater homogeneity in contributing to the *P. lineatus* progeny. There were more effective participation of males in the 2:1 extrusion system, influenced by the number of individuals and seminal characteristics of each male.

**Key words:** conservation, genetic, microsatellites, *Prochilodus lineatus*, rheophilic fishes, restocking programs

## INTRODUÇÃO

Devido à redução dos estoques naturais de peixes nas bacias brasileiras, provocadas principalmente pela poluição, sobrepesca e construção de usinas hidrelétricas, ações que visem a recomposição populacional de peixes ameaçados, estão sendo cada vez mais necessárias para a conservação dessas espécies no ambiente natural (AGOSTINHO, 2007). Nesse contexto, o manejo reprodutivo adotado pelas programas de repovoamento é um elemento chave para a produção de alevinos, tendo em vista que diferentes metodologias reprodutivas podem proporcionar variações quantitativas e qualitativas (diversidade genética) na formação da progênie, bem como inferir sobre a saúde dos reprodutores (REYNALTE-TATAJE et al., 2013).

O curimba (*Prochilodus lineatus*), é uma espécie de grande importância econômica (BOTTA et al., 2010), principalmente para populações ribeirinhas. De acordo com dados da FAO (2016), o gênero *Prochilodus* engloba as principais espécies alvo da pesca extrativa,

tornado necessário medidas conservacionistas para preservação das populações naturais dessas espécies.

Por ser uma espécie reolífica, o curimba não consegue se reproduzir naturalmente em pisciculturas, sendo necessárias técnicas de indução à desova (hipofização, por exemplo) para a liberação dos gametas (SANTOS et al., 2013). Em programas de repovoamento, é comum a utilização de dois sistemas reprodutivos para a obtenção da desova: o sistema por extrusão e seminatural. De acordo com ZANIBONI-FILHO & WEINGARTHER (2004), o sistema reprodutivo por extrusão é um dos métodos mais utilizados na reprodução de peixes, devido a facilidade na manipulação dos gametas, além de demandar menos infraestrutura (sem tanques de desova). No entanto, essa técnica pode causar mortalidade aos reprodutores devido ao estresse causado na manipulação dos animais e diminuir a variabilidade genética em algumas espécies (LOPERA-BARRERO et al., 2014; REYNALTE-TATAJE et al., 2013). O sistema reprodutivo seminatural, por outro lado, consiste na circulação forçada de água no interior de um tanque de desova, o que a simula as condições do ambiente natural, promovendo a maturação dos gametas. Essa metodologia permite uma menor mortalidade de reprodutores, menor estresse físico e manutenção da variabilidade genética dos alevinos (POVH, 2007; STREIT JÚNIOR et al., 2012).

Pesquisas tem demonstrado que a utilização de diferentes proporções de sexo (pool de sêmen ou acasalamentos individuais) na reprodução de algumas espécies de peixes pode influenciar sobre a contribuição parental sobre a progênie, de modo a exercer dominância reprodutiva de alguns machos (CASTRO, 2015; RIBOLI & ZANIBONI-FILHO, 2009). No entanto, nenhum estudo demonstrou a influência da proporção de sexo e do sistema reprodutivo sobre contribuição parental em *P. lineatus*.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural e da proporção de sexo na contribuição parental de progênes de *P. lineatus* obtidas no programa de repovoamento do rio Tietê.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

A reprodução dos peixes nos sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural foi realizada na estação de hidrobiologia (21°19'01.2"S 49°47'22.8"O) localizada na cidade de Promissão, em São Paulo. As análises moleculares foram realizadas nos laboratórios das universidades localizadas nas cidades de Londrina e Maringá, no estado do Paraná. As metodologias empregadas durante esse experimento foram aprovadas pela Comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA\_UEL nº17156.2012.50).

Foram selecionados 35 reprodutores de curimba oriundos da estação de hidrobiologia, dividindo-os de acordo com o sistema de reprodução e proporção de sexo, sendo no sistema por extrusão, utilizado cinco machos e cinco fêmeas (proporção 1:1), e 10 machos e cinco fêmeas (2:1); no sistema seminatural, foi utilizado cinco machos e cinco fêmeas (1:1).

O critério de seleção dos animais foi baseado nas condições físicas como o abaulamento abdominal e hiperemia da papila urogenital. Foi realizada uma biometria de cada reprodutor para o cálculo da dosagem hormonal a ser aplicada para induzir a reprodução. Para a indução à reprodução, o extrato de hipófise de carpa foi aplicado através de seringa de 1 mL na base da nadadeira dorsal (aplicação intramuscular), para esse procedimento, os animais foram capturados e contidos pela cabeça e base da cauda. As fêmeas receberam 5.5 mg kg<sup>-1</sup>, divididos em duas aplicações, 0,5 mg kg<sup>-1</sup> na primeira aplicação e 5 mg kg<sup>-1</sup> 12h depois, e os machos receberam 2.5 mg kg<sup>-1</sup> em dose única, concomitantemente com a segunda aplicação da fêmea (adaptado de PEREIRA et al., 2009).

Os reprodutores do sistema reprodutivo por extrusão foram acondicionados separadamente (machos e fêmeas) em tanques de concreto de 2 m<sup>3</sup>, posteriormente, a temperatura da água foi mensurada a cada hora afim de obter a hora grau<sup>-1</sup> necessária para a realização da desova. Aproximadamente oito horas após a segunda dose (220 horas grau<sup>-1</sup>, temperatura média de 27°C), o procedimento de extrusão foi realizado seguindo a metodologia descrita por LOPERA-BARRERO et al., 2014. Foi utilizado pool de sêmen (semên de todos os machos) para a fertilização dos oócitos imediatamente coletados.

Os acasalamentos no sistema reprodutivo seminatural sucederam de maneira idêntica ao sistema por extrusão 1:1, no entanto, logo após o processo de hipofisação, os reprodutores foram acondicionados em tanques circulares (4 m de diâmetro e 1.5 m de profundidade) e com sistema de circulação forçada de água com o objetivo de simular condições ambientais encontradas na natureza (correnteza nos rios), ocorrendo assim um acasalamento seminatural entre os diversos casais e viabilizando um processo de fertilização aleatória. Após o processo de acasalamento e fertilização, a qual ocorreu após 220 horas grau<sup>-1</sup>, os ovos foram direcionados para uma estação coletora através de um tubo localizado na região central do tanque, possibilitando a coleta dos mesmos e sua adequação em incubadoras cilíndrico-cônicas (captação de 200 litros com fluxo contínuo de água) onde aconteceu a formação e nascimento das larvas. A mortalidade em ambos os sistemas reprodutivos foi verificada 24h após o procedimento de desova.

Para a extração do DNA foram coletadas um total de 35 amostras de nadadeira caudal dos reprodutores (para os dois sistemas), 69 amostras de nadadeira dos alevinos obtidos pelo sistema por extrusão (1:1), 69 amostras de nadadeira dos alevinos derivados do sistema por extrusão (2:1) e 70 amostras de nadadeira dos alevinos obtidos pelo sistema seminatural. As amostras de nadadeira caudal de alevinos foram coletadas aos 90 dias após a eclosão dos ovos.

O DNA foi extraído utilizando-se o protocolo de extração contendo NaCl (LOPERA-BARRERO et al., 2008). Posteriormente, para visualizar a qualidade do DNA foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1%) corado com SYBR Safe™ DNA Gel Stain (Invitrogen, Carlsbad CA, USA) conduzida em tampão TBE 1X (500 m mol L<sup>-1</sup> Tris-HCl, 60 m mol L<sup>-1</sup> ácido bórico e 83 m mol L<sup>-1</sup> EDTA), por duas horas, a 80 volts. O gel foi visualizado em aparelho transiluminador com luz ultravioleta, sendo que a imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

A quantificação foi realizada através do espectrofotômetro PICODROP® (Picodrop Limited, Hinxton, United Kingdom), padronizando-se as amostras através de diluição para uma concentração final de 20 ng µL<sup>-1</sup>.

A amplificação foi realizada para um volume final de reação de 15 µL, utilizando-se 1X do tampão Tris-KCl, 2.0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.8 µM de cada *primer* (*Forward* e *Reverse*), 0.2 mM de cada dNTP, meia unidade de Platinum *Taq* DNA Polimerase e 20 ng de DNA. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 95 °C por cinco minutos e em seguida realizaram-se 35 ciclos de 60 segundos de desnaturação a 94 °C; 60 segundos de anelamento (Tabela 1); e 60 segundos de extensão a 72 °C; por fim realizou-se uma extensão final a 72 °C por 20 minutos. Foram avaliados 10 *loci* microssatélites: Par12, Par14, Par15, Par21, Par43, Par80 (BARBOSA et al., 2006; BARBOSA et al., 2008), Pl01, Pl30, Pl43 e Pl60 (YAZBECK & KALAPOTHAKIS, 2007). As reações foram realizadas em termociclador Veriti® (Applied Biosystems®, Austin, TX, USA).

As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida : bisacrilamida – 29 : 1) desnaturante (6 M de uréia), e conduzida em tampão TBE 0,5X com 180 V e 250 mA por oito horas. Para a visualização dos alelos, o gel foi submetido a uma solução de fixação (10% de etanol e 0,5% de ácido acético) por 20 minutos seguido de solução 6mM de nitrato de prata por 30 minutos e revelado em solução de 0,75M

de NaOH e 0,22% de formol-40% (BASSAM et al., 1991). O gel foi fotografado com câmera Nikon CoolPix 5200. O tamanho dos alelos foi calculado pelo utilizando-se DNA *ladder* (Invitrogen) de 100 pb. Os dados foram submetidos ao software PAPA versão 2.0 (DUCHESNE et al., 2002) para o cálculo dos valores de paternidade, permitindo a elaboração das análises da contribuição reprodutiva. Paralelamente, foi realizado uma análise de diferenciação genética ( $F_{st}$ ) par a par dos agrupamentos de reprodutores (ambos os sistemas e proporção de sexo) pelo software GenAlex 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012), foi utilizada a definição de Wright (1978), onde valores entre 0,00 a 0,05; 0,051 a 0,15; 0,151 a 0,25 e  $> 0,25$  indicam baixa, moderada, alta e elevada diferenciação genética, respectivamente.

Os procedimentos para análises seminais foram realizados de acordo com SÖRENSEN (1979), adaptados para peixes. Não é possível realizar a análise seminal dos animais submetidos ao sistema seminatural, já que os mesmos liberaram os gametas nos tanques de circulação forçada. Sendo assim, a coleta de sêmen foi realizada nos reprodutores de curimba submetidos ao sistema de reprodução por extrusão nas duas proporções de sexo (1:1 e 2:1).

O sêmen foi coletado em seringas plásticas de 3 mL devidamente identificadas, avaliando-se imediatamente volume (mL) de sêmen e a motilidade espermática progressiva (MEP%) (escore de 0 a 100%). Consecutivamente, realizou-se uma diluição em formol salina tamponada de 1:500 para análises de concentração espermática em câmara de Neubauer por meio de microscopia ótica (400x), e dois esfregaços para análises de morfologia espermática. A dose total de sêmen foi calculada multiplicando o volume de semên (mL) e a concentração espermática. A morfologia espermática consistiu na observação de anormalidades espermáticas para o cálculo do índice de normalidade (IN%) ( $IN\% = \% \text{ anormalidades de cabeça} + \% \text{ anormalidades de cauda}$ ). Para isso, de lâminas contendo esfregaço de sêmen foram previamente imergidas em álcool por 10 minutos, lavadas e coradas com corante Rosa

de Bengala por 10 minutos. Em microscópio óptico, foram contabilizados 100 espermatozoides por lâmina e duas lâminas por animal.

## RESULTADOS

Após a desova, não foi observada mortalidade nos reprodutores de *Prochilodus lineatus* no sistema seminatural. No sistema por extrusão houve mortalidade de três reprodutores (dois do sistema por extrusão 1:1 e um do sistema por extrusão 2:1).

De maneira geral, o sistema seminatural permitiu uma melhor homogeneidade da contribuição dos machos na formação da progênie (todos os machos contribuíram com a progênie) sendo o macho 2 (M2) quem teve a menor contribuição (5,71%) (Figura 1). Dessa forma, pode-se inferir que esse sistema não proporcionou drástica dominância reprodutiva entre os machos. No sistema por extrusão 1:1 foi observado que o macho 4 (M4) teve maior contribuição reprodutiva na formação da progênie (41,8%), enquanto que no sistema por extrusão 2:1 essa contribuição foi 71% dominada por quatro machos (M4: 21,7%, M7: 20,3%, M5: 14,5%, M9: 14,5%) (Figura 1).

Em relação às fêmeas, também houve melhor equilíbrio na contribuição no sistema seminatural (todas as fêmeas participaram na progênie). Somente a fêmea 4 (F4) apresentou um valor contribuição baixo (12,85%) (Figura 1). No sistema por extrusão 1:1 foi observada uma maior contribuição da F4 (31,34%) em comparação com as outras fêmeas. Já no sistema de extrusão 2:1, houve maior contribuição de F2 e F4 em relação às demais (72,47%), caracterizando dominância reprodutiva dessas fêmeas (Figura 1).

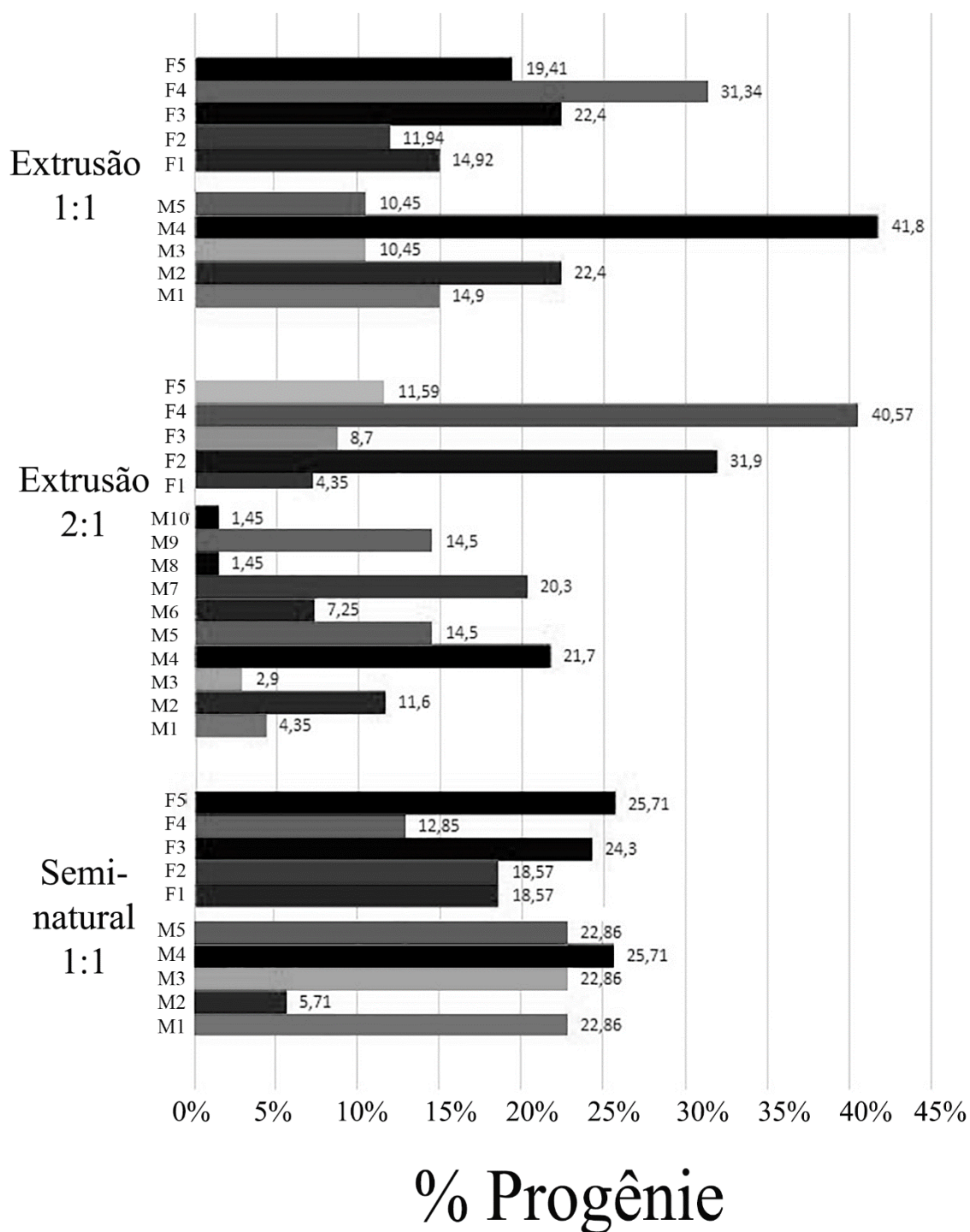


Figura 1 – Contribuição reprodutiva de machos e fêmeas na progênie de *Prochilodus lineatus* nos sistemas reprodutivos por extrusão 1:1, extrusão 2:1 e seminatural 1:1. M: machos; F: fêmeas.

A composição das famílias, nos dois sistemas reprodutivos, foi influenciada pela participação maior de alguns casais (Tabela 1). No sistema de extrusão 1:1, todos os machos

foram capazes de fertilizar os oócitos de todas as fêmeas e gerar descendentes viáveis, com exceção do macho M3 com a fêmea F3, sendo que os cruzamentos M4 x F4 obteve maior contribuição para a progênie (17,91%). Por outro lado, no sistema de extrusão 2:1, alguns machos não foram capazes de formar prole com determinadas fêmeas. Já no sistema seminatural, de maneira similar ao extrusão 1:1, apenas uma fêmea (F2) não produziu descendentes com o macho M2, os outros machos foram capazes de fertilizar os oócitos de todas as fêmeas, sendo que o cruzamento M1 x F1 obteve maior contribuição para a progênie (10%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Composição das famílias (%) na progênie de *P. lineatus*, utilizando os sistemas reprodutivos extrusão (1:1 e 2:1) e seminatural (1:1)

		M1	M2	M3	M4	M5	-	-	-	-	-
Extrusão 1:1	F1	2,99	2,99	2,99	4,48	1,49	-	-	-	-	-
	F2	1,49	4,48	1,49	2,99	1,49	-	-	-	-	-
	F3	1,49	5,97	0	10,45	4,48	-	-	-	-	-
	F4	4,48	5,97	1,49	17,91	1,49	-	-	-	-	-
	F5	4,48	2,99	4,48	5,97	1,49	-	-	-	-	-
		M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10
Extrusão 2:1	F1	0	0	0	2,90	2,90	1,45	0	0	0	0
	F2	1,45	1,45	1,45	10,14	2,90	1,45	7,25	0	5,80	0
	F3	0	0	0	0	5,80	4,35	4,35	0	0	0
	F4	0	8,70	0	7,25	1,45	4,35	5,80	1,45	4,35	1,45
	F5	1,45	1,45	1,45	1,45	2,90	0	2,90	0	0	0
		M1	M2	M3	M4	M5	-	-	-	-	-

Seminatural 1:1	F1	10	1,43	2,86	1,43	2,86	-	-	-	-	-
	F2	1,43	0	7,14	5,71	4,29	-	-	-	-	-
	F3	2,86	1,43	4,29	7,14	8,57	-	-	-	-	-
	F4	4,29	1,43	1,43	2,86	2,86	-	-	-	-	-
	F5	4,29	1,43	7,14	8,57	4,29	-	-	-	-	-

A análise seminal dos machos submetidos ao sistema por extrusão estão presentes na Tabela 2. No sistema por extrusão 1:1, o M3 apresentou os menores valores de índice de normalidade (IN=56,0%) e o M5 apresentou baixa concentração espermática ( $3,15 \times 10^9$  Sptz  $\text{ml}^{-1}$ ). Alguns machos da extrusão 2:1 apresentaram baixo índice de normalidade (M2, 51,3%), baixa concentração espermática (M3,  $3,75 \times 10^9$  Sptz  $\text{ml}^{-1}$ ), baixa motilidade progressiva (M6 e M8, 20%) e volume espermático (M10, 0,4mL) (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise dos parâmetros seminais de machos de Curimba (*Prochilodus linetaus*) submetidos ao sistema reprodutivo por extrusão

Tratamento	Macho	Volume (mL)	MEP (%)	Conc ( $\times 10^9$ ) (Sptz $\text{mL}^{-1}$ )	Dose ( $\times 10^9$ )	IN (%)
Extrusão (1:1)	1	1,6	80	7,55	12,08	71,3
Extrusão (1:1)	2	1,4	70	5,55	7,77	69,3
Extrusão (1:1)	3	1,4	90	7,85	10,99	56,0
Extrusão (1:1)	4	1,3	60	7,70	10,01	74,7
Extrusão (1:1)	5	1,7	60	3,15	5,36	70,7
Média±Desvio Padrão	-	1,48±0,16	72±13,03	6,36±2,02	9,24±2,68	68,4±7,21
Extrusão (2:1)	1	1,3	70	6,15	8,00	60,0

Extrusão (2:1)	2	1,2	80	8,65	10,38	51,3
Extrusão (2:1)	3	2,2	50	3,75	8,25	68,7
Extrusão (2:1)	4	2,6	100	4,90	12,74	68,0
Extrusão (2:1)	5	1,6	60	9,60	15,36	57,3
Extrusão (2:1)	6	1,0	20	9,90	9,90	62,7
Extrusão (2:1)	7	1,3	80	9,75	12,68	67,3
Extrusão (2:1)	8	1,6	20	5,00	8,00	56,7
Extrusão (2:1)	9	2,15	80	5,45	11,72	56,0
Extrusão (2:1)	10	0,4	100	3,40	1,36	68,0
Média±Desvio Padrão	-	1,53±0,64	66±28,75	6,65±2,56	9,83±3,82	61±6,22

MEP: Motilidade espermática progressiva; Conc: Concentração espermática; IN: Índice de normalidade. Sptz: Espermatozóides

A diferenciação genética ( $F_{st}$ ) variou de 0,130 (fêmeas do sistema por extrusão 1:1 e fêmeas do sistema por extrusão 2:1) a 0,050 (machos e fêmeas do sistema por extrusão 2:1). O  $F_{st}$  foi moderado (0,051 a 0,150) em todos os agrupamentos formados, com exceção do agrupamento dos machos e fêmeas sistema por extrusão 2:1, que indicou baixa diferenciação genética (0,050) (Tabela 3).

Tabela 3 –  $F_{st}$  par a par dos reprodutores de *P. linetaus* nos sistemas reprodutivos por extrusão 1:1, 2:1 e seminatural 1:1

Sistema	Sexo	Extrusão 1:1		Extrusão 2:1		Seminatural 1:1	
		F	M	F	M	F	M
<b>Extrusão 1:1</b>	<b>F</b>	0,000	-	-	-	-	-

	<b>M</b>	0,098	0,000	-	-	-	-
<b>Extrusão 2:1</b>	<b>F</b>	0,130	0,103	0,000	-	-	-
	<b>M</b>	0,100	0,067	0,050	0,000	-	-
<b>Seminatural 1:1</b>	<b>F</b>	0,129	0,089	0,103	0,059	0,000	-
	<b>M</b>	0,121	0,098	0,095	0,064	0,093	0,000

---

F: Fêmeas; M: Machos

## DISCUSSÃO

Outros estudos relataram aumento da mortalidade em peixes submetidos ao método por extrusão (REYNALTE-TATAJE et al., 2013; CASTRO, 2015). Esse achado se deve ao maior estresse infringido pelo manuseio dos animais (REYNALTE-TATAJE et al., 2013; POVH, 2007), sendo, portanto, um dos principais limitantes da técnica. Por outro lado, ao permitir que a desova ocorra em tanques de circulação forçada (menos interferência de manuseio), o sistema seminatural garante maior sobrevivência dos reprodutores, além de permitir que maior número de indivíduos contribuam para a formação da progênie (LOPERA-BARRERO et al., 2010), o que possibilita maior heterogeneidade dos alevinos.

Os dois sistemas reprodutivos demonstraram que cada macho foi capaz de fecundar mais de uma fêmea. Esses resultados caracterizam paternidade múltipla para a progênie de *P. linetaus*, corroborando ao observado em outras espécies de peixes, como o *Brycon orbignyanus* (LOPERA-BARRERO et al., 2014), *Piaractus mesopotanicus* (POVH et al., 2010) e *Rhamdia quelen* (RIBOLI, J. & ZANIBONI-FILHO, 2009). Entretanto, é necessário ressaltar que a contribuição de cada reprodutor foi diferenciada, já que é essa característica é dependente da qualidade intrínseca de cada macho (hipótese do bom esperma) (SIVINSKI, 1984) que pode promover a dominância de alguns indivíduos. De acordo com REYNALTE-

TATAJE et al. (2013), o sistema por extrusão aumenta a chance de erros ao selecionar os reprodutores para a desova, devido ao intervalo de tempo exato de maturação gamética. Em nossa pesquisa ficou evidenciado que alguns reprodutores (machos e fêmeas) contribuíram de maneira mais acentuada, principalmente no sistema de extrusão, na formação da progênie.

A participação desigual dos machos na geração da progênie também é observada em outras espécies de peixes. Em trabalho desenvolvido por RIBOLI & ZANIBONI-FILHO (2009), no sistema de extrusão, os autores identificaram contribuição desigual dos machos de *R. quelen* quando utilizado *pool* de sêmen para fertilização dos oócitos, o que não ocorreu quando a fertilização foi realizada de maneira individualizada, demonstrando que todos os machos possuíam alta capacidade de fertilização, os autores atribuíram a dominância de alguns machos em detrimento das melhores características seminais de determinados indivíduos. LOPERA-BARRERO et al. (2014), ao analisar o efeito do sistema por extrusão e o sistema seminatural na progênie de *Brycon orbignyanus*, identificaram contribuição mais homogênea dos machos no sistema seminatural (15 a 21,7%) em comparação ao sistema por extrusão (5 a 25%). Esse achado corrobora com os resultados do presente trabalho, tendo em vista que no sistema seminatural, tanto os machos quanto as fêmeas contribuíram de maneira muito similar para a formação da progênie. Isso pode ser justificado devido a sincronização natural dos gametas promovida pelo sistema seminatural, o que permite uma maior participação dos reprodutores (SIROL & BRITTO, 2006; POVH, 2007).

A maior contribuição de alguns casais demonstra que ambos os sistemas estão sujeitos a dominância reprodutiva, seja pelas características intrínsecas dos animais (SIVINSKI, 1984; POVH 2007) ou mesmo comportamento de dominância (ALONSO et al., 2012). No sistema por extrusão 1:1, foi observado a maior dominância na contribuição de cruzamento (17,91%, para M4 x F4) em relação ao sistema extrusão 2:1 (10,14%, M4 x F2) e seminatural (10%, M1 x F1), possivelmente devido ao menor número de machos em relação ao extrusão 2:1, o

que favorece de maneira mais contundente aqueles com melhores características seminais. Por esse motivo, a dominância reprodutiva na proporção 2:1 foi mais amena, a ponto de os mais dominantes representarem uma contribuição em torno de 20% contra mais de 40% (M4) no sistema extrusão 1:1.

Já no sistema seminatural, de maneira geral, foi observado contribuição mais homogênea dos casais, no entanto, esses resultados não excluem a dominância reprodutiva, visto que cruzamentos como M1 x F1 e M5 x F3 contribuíram mais efetivamente em relação a outros casais. Fatores comportamentais como agressividade e hierarquia social (ALONSO et al., 2012), além da qualidade seminal dos machos, podem estar envolvidos na maior contribuição desses indivíduos. Assim, a menor contribuição e/ou a ausência de formação de determinados casais está relacionada ao mesmos fatores, ainda mais quando considera-se a qualidade seminal inferior de alguns machos.

Os parâmetros seminais peixes nativos podem ser influenciados por uma série de fatores, como a idade do peixe, tamanho, época do ano, clima e frequência de coleta (SILVA et al., 2009). Esses fatores podem justificar a elevada variação nos índices encontrados na literatura. No presente estudo, a análise seminal demonstrou que os machos submetidos ao sistema por extrusão estavam aptos produzir gametas férteis, no entanto, foram observadas variações qualitativas e quantitativas individuais no sêmen avaliado. Os resultados encontrados para concentração espermática concordaram com as pesquisas realizadas por PAULINO et al. (2011) ( $9,89 \pm 0,91 \times 10^9$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ ) e ALLAMAN et al. 2012 ( $5,392 \pm 0,387$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ ) em sêmen de *P. lineatus*. Os valores médios do volume e da motilidade espermática progressiva (MEP%) estão de acordo com o encontrado por ALLAMAN et al. (2012), CARVALHO (2012) e SILVA et al. (2009) em peixes do gênero *Prochilodus*. Da mesma forma, o índice de normalidade (IN%) foi semelhante ao encontrado

por MORAES et al. (2004), cujos valores ficaram próximos da 60% de espermatozoides normais.

Ao relacionar a contribuição reprodutiva dos machos com a análise seminal, no sistema de extrusão 1:1, foi observado que os machos M3 (IN=56%) e M5 (baixa concentração espermática) contribuíram pouco para formação da progênie (10,45% cada). Da mesma forma, no sistema de extrusão 2:1, a baixa concentração espermática ( $3,75 \times 10^9$  Sptz mL<sup>-1</sup>), o baixo volume de sêmen (0,4 mL) e baixa MEP (20%), no M3, M8 e M10, respectivamente, colaboraram para a menor contribuição na formação da progênie (2,9% no M3 e 1,45% no M8 e M10). Dessa maneira, pode-se inferir que aqueles machos que apresentaram boas características seminais (M1, M2 e M4, na extrusão 1:1 e M4 e M7, no extrusão 2:1) obtiveram maior contribuição na formação da progênie, o que corrobora com a hipótese do bom esperma (SIVINSKI, 1984) em relação a dominância reprodutiva desses animais.

A diferenciação genética (Fst) moderada na maioria dos agrupamentos indica que a formação do plantel de reprodutores incorporou indivíduos de diferentes grupos genéticos. A existência de variação genética dentro dos estoques é importante no direcionamento das atividades reprodutivas (RIBEIRO et al., 2016), principalmente em programas com cunho conservacionista, já que a diversidade no repasse genético é fundamental para a produção de alevinos com alta adaptabilidade no ambiente natural.

Além disso, é importante ressaltar que a produção de alevinos tenha como princípio a utilização de elevado número de reprodutores a fim de garantir maior homogeneidade na contribuição parental, de maneira que minimize os efeitos de dominância reprodutiva e mortalidade, bem como preserve as características genéticas que garantirão a sobrevivência dos alevinos na natureza. Nesse sentido, o sistema seminatural permitiu maior eficiência na contribuição dos reprodutores na formação da progênie de *P. lineatus*. Mais estudos serão

necessários para averiguar a influência da proporção de sexo no sistema seminatural, tendo em vista que o comportamento hierárquico dos reprodutores pode exercer influência sobre a contribuição na progênie.

## **CONCLUSÃO**

O sistema seminatural permitiu contribuição parental mais homogênea na progênie de *P. lineatus*. A utilização do dobro de machos (extrusão 2:1) contribuiu para minimizar o efeito de dominância de alguns reprodutores.

**COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA:** Aprovado pela comissão de ética no uso de animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA\_UEL nº17156.2012.50).

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados de variabilidade genética demonstraram que ambos os sistemas reprodutivos e proporção de sexo no sistema por extrusão foram capazes gerar alevinos com adequada variabilidade genética. A maior diferenciação genética entre os reprodutores e alevinos no sistema extrusão 1:1 foi corroborada com as análises de contribuição parental, que demonstraram maior dominância de alguns machos para esse sistema.

Os acasalamentos pelo sistema seminatural demonstraram maior homogeneidade na formação da progênie, possivelmente devido a sincronização natural da liberação dos gametas, permitindo que os machos contribuíssem de maneira mais igualitária. As análises seminais demonstraram variações individuais que afetaram a formação da progênie no sistema por extrusão, favorecendo os machos com os melhores parâmetros.

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A. et al. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007, 501p.

ALLAMAN et al. Efeito materno e paterno sobre as taxas de fertilização e eclosão em curimba (*Prochilodus lineatus*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64 p. 1584–1590, 2012. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352012000600026&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352012000600026&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 25 abr. 2016. doi: 10.1590/S0102-.1590/S0102-09352012000600026

ALONSO, F. et al. Dominance hierarchies and social status ascent opportunity: Anticipatory behavioral and physiological adjustments in a Neotropical cichlid fish. **Physiology & Behavior**, v. 106, p. 612- 618, 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22521514>> Acesso em: 09 jul. 2016. doi: 10.1016/j.physbeh.2012.04.003.

BARBOSA, A. C. R et al. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 936–938. 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-8286.2006.01406.x/full> > Acesso em: 01 jun. 2016. doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01406.x.

BARBOSA, A. C. D. R et al. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*, **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 357-360. 2008. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572008000200032&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572008000200032&lng=en&nrm=iso) > Acesso em: 01 jun. 2016. doi: 10.1590/S1415-47572008000200032.

BASSAM, B.J. et al. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 196, p. 80-83. 1991. Disponível em: <

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000326979190120I> > Acesso em: 01 jun. 2016. doi: 10.1016/0003-2697(91)90120-I.

BOTTA, P. et al. Estudio del desarrollo embrionario del sábalo (*Prochilodus lineatus*).

**Archivos de Medicina Veterinaria**, Valdivia , v. 42, p. 109-114, 2010. Disponível em: < [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2010000200014](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2010000200014)>

Acesso em: 05 jun. 2016. doi: 10.4067/S0301-732X2010000200014.

CARVALHO, A. F. S. **Criopreservação de sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamichus*) e curimba (*Prochilodus lineatus*): predição do potencial de congelabilidade e uso da cafeína na solução ativadora**. 2013. 97 p. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias Universidade Federal de Lavras.

CASTRO, P. L. **Contribuição genética e reprodutiva de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão**. 2015. 42 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

DUCHESNE, P. et al. PAPA (Package for the analysis of parental allocation): a computer program for simulated and real parental allocation. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, p. 191-193, 2002. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1471-8286.2002.00164.x/full> > Acesso em: 01 jun. 2016. doi: 10.1046/j.1471-8286.2002.00164.x

FAO. **Fisheries and aquaculture software. FishStatJ** - software for fishery statistical time series. In: FAO Fisheries and Aquaculture Department (online). Roma, 2016. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/software/fishstatj/en> Acesso em: 07 mar. 2017

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, p. 65-74, 2008. Disponível em: < [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0718-16202008000100008&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0718-16202008000100008&lng=es&nrm=iso) > Acesso em: 05 jun. 2016. doi: 10.4067/S0718-16202008000100008.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Reproductive contribution of a *Brycon orbignyanus* (Cuvier and Valenciennes, 1850) offspring in the semi-natural reproductive system using microsatellite markers. **Zootecnia Tropical**, v. 28, p. 403-411, 2010. Disponível em: < [http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-72692010000300011&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://www.scielo.org/ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-72692010000300011&lng=es&nrm=iso&tlng=es) > Acesso em: 08 jul. 2016.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Diversidade genética e paternidade de progênes de *Brycon orbignyanus* obtidas por diferentes sistemas reprodutivos. **Semina: Ciências agrárias**, v.35, p.541-554, 2014. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/13892>> Acesso em: 08 jun. 2016. doi: 10.5433/1679-0359.2014v35n1p541.

MORAES, G. V. et al. Ação de diferentes indutores reprodutivos hormonais no aparecimento de anormalidades morfológicas em espermatozóides de piavuçu (*Leporinus macrocephalus*), curimatá (*Prochilodus lineatus*) e carpa comum (*Cyprinus carpio*). **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 30, p. 109-116, 2004. Disponível em: < [ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/Moraes30\\_2.pdf](ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/Moraes30_2.pdf)> Acesso em: 08 jun. 2016.

PAULINO, M. S. et al. Desempenho reprodutivo do pacu, piracanjuba e curimba induzidos com extrato de busserelina. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 37, n. 1, p. 39-45, 2011. Disponível em: < [ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/37\\_p1\\_39-45.pdf](ftp://ftp.sp.gov.br/ftppesca/37_p1_39-45.pdf) > Acesso em: 11 jun. 2016.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. **Bioinformatics**, v. 28, p. 2537-2539, 2012. Disponível em: < <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/28/19/2537/288671/GenAlEx-6-5-genetic-analysis-in-Excel-Population>> Acesso em: 14 mar. 2017. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460

PEREIRA, G. J. M. et al. Indução da desova de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizando eCG E EBHC. Revista Ceres, v. 56, p.156-160, 2009. Disponível em: < <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=305226730007> > Acesso em: 29 jun. 2016.

POVH, J. A. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2007. 72f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

POVH, J. A. et al. Microsatellite Analysis of the Parental Contribution of *Piaractus mesopotamicus* to the Production of Offspring in the Semi-natural System of Reproduction. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.53, p.389-396, 2010. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-89132010000200018&lng=pt&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132010000200018&lng=pt&nrm=iso) > Acesso em: 13 jun. 2016. doi: 10.1590/S1516-89132010000200018.

REYNALTE-TATAJE, D. A. et al. Artificial reproduction of neotropical fish: Extrusion or natural spawning?. **Natural Science**, v.5, p.1-6, 2013. Disponível em: < [http://file.scirp.org/pdf/NS\\_2013071011472979.pdf](http://file.scirp.org/pdf/NS_2013071011472979.pdf)> Acesso em: 12 jun. 2016. doi: 10.4236/ns.2013.57A001.

RIBEIRO, R. P. et al. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 37, p. 2375-2386, 2016. Disponível em: < <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/view/22718>> Acesso em: 13 mar. 2017. doi: 10.5433/1679-0359.2016v37n4Supl1p2375.

RIBOLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p.629-634, 2009. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-62252009000400011&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-62252009000400011&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 08 jun. 2016. doi: 10.1590/S1679-62252009000400011.

SANTOS, J. C. E. et al. Desova induzida de curimatã-pacu submetido a dois protocolos de hipofiseação. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 48, p. 1132-1135, 2013. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2013000800050&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2013000800050&lng=en&nrm=iso)> Acesso em: 08 jun. 2016. doi: 10.1590/S0100-204X2013000800047

SILVA, J. M. A. et al. Características seminais e índices reprodutivos de curimba ("*Prochilodus lineatus*") em diferentes períodos reprodutivos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 10, p. 668-677, 2009. Disponível em: < <http://revistas.ufba.br/index.php/rbspa/article/view/1428/857>> Acesso em: 09 jun. 2016.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M. G. et al. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RiMA, 2006. p. 275-284.

SIVINSKI, J. Sperm in competition. In: SMITH, R.L. (Ed.) **Sperm Competition and the Evolution of Animal Mating Systems**. London: Academic Press, 1984. p. 86-115.

SORENSEN, A. M. **Animal reproduction; principles and practices**. New York: McGraw Hill, 1979. 496p.

STREIT JÚNIOR, D. P. et al. **Recomendações técnicas para a reprodução do tambaqui**. Teresina: Embrapa Meio-Norte-Documents (INFOTECA-E), 2012. 29p.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of population**, 1 ed. Chicago: University of Chicago Press, EUA. 1978.

YAZBECK, G. A.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes), **Genetics and Molecular Research**, v. 6, p. 1026-1034, 2007. Disponível em: < [http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2007/vol4-6/GMR339\\_full\\_text.htm](http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2007/vol4-6/GMR339_full_text.htm)> Acesso em: 09 jun. 2016.

ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A. P. O. Reprodução de peixes migradores de água doce. In: CYRINO, J. E. P. et al. (Ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical**

São Paulo: TecArt, 2004. p. 63-64.