



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

DÉBORA CAROLINA LAMPE MENEZES

**ANÁLISE GENÉTICA DO PLANTEL DE PEIXES PARA
REPOVOAMENTO DA ESTAÇÃO DE PISCICULTURA DE
SALTO GRANDE – SP**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE LONDRINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL



Programa de
Pós-graduação em
Genética e Biologia Molecular

DÉBORA CAROLINA LAMPE MENEZES

**Análise genética do plantel de
peixes para repovoamento da
estação de piscicultura de Salto
Grande - SP**

Londrina- Paraná

2017



Universidade Estadual de Londrina



Instituto Agrônomo do Paraná



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

DÉBORA CAROLINA LAMPE MENEZES

**Análise genética do plantel de
peixes para repovoamento da
estação de piscicultura de Salto
Grande - SP**

Londrina

2017

DÉBORA CAROLINA LAMPE MENEZES

**ANÁLISE GENÉTICA DO PLANTEL DE PEIXES PARA
REPOVOAMENTO DA ESTAÇÃO DE PISCICULTURA DE
SALTO GRANDE - SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda
Simões de Almeida

Londrina
2017

Menezes, Débora Carolina Lampe .

Análise genética do plantel de peixes para repovoamento da estação de piscicultura de Salto Grande-SP / Débora Carolina Lampe Menezes. - Londrina, 2017.
86 f. : il.

Orientador: Fernanda Simões de Almeida.

Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Genética de Conservação - Dissertação. I. Almeida, Fernanda Simões de . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. III. Título.

DÉBORA CAROLINA LAMPE MENEZES

**ANÁLISE GENÉTICA DO PLANTEL DE PEIXES PARA
REPOVOAMENTO DA ESTAÇÃO DE PISCICULTURA DE SALTO
GRANDE - SP**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Simões
de Almeida
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Augusto Seawright Zanatta
Universidade Estadual Norte do Paraná -
UENP

Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Bôas
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 16 de março de 2017.

"Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus. Assim eu concluo que nada é melhor para o homem do que alegrar-se e procurar o bem-estar durante a sua vida. E que comer, beber e gozar do fruto do seu trabalho é um dom de Deus"

Ecle 3, 1; 12-13

Dedico este trabalho a Deus e a todos que ajudaram esse sonho a se tornar realidade.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Londrina juntamente com o programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Celular por contribuírem com a minha formação e possibilitarem a concretização deste estudo.

A Capes, pela bolsa concedida durante os 24 meses de trabalho, e a Fundação Araucária, pelo apoio financeiro, que foi de grande auxílio para a realização de experimentos e dedicação exclusiva ao estudo.

A Prof^a Dr^a Fernanda Simões de Almeida, que me cativou ainda na graduação com sua disciplina de Genética Molecular mostrando a beleza e os mistérios desta área, que abriu as portas de seu laboratório ainda na graduação, foi minha orientadora no TCC e deu todo o suporte para a realização desta dissertação. Além de ser uma ótima orientadora, é ainda uma pessoa extremamente querida, carismática, bem humorada, que mesmo quando as coisas não saiam como queríamos, estava sempre com pensamento positivo de que tudo daria certo, e deu. O meu muito obrigado por acreditar em mim.

As professoras Dr^a Ana Lucia Dias e Dr^a Ana Claudia Swarça, minha banca de qualificação, onde suas correções e sugestões foram de grande apoio para o resultado deste trabalho, enriquecendo ainda mais o resultado final deste estudo.

Aos professores Dr. Laurival Vilas Boas e Dr Augusto Seawright Zanatta, por terem se disponibilizado a avaliar e contribuir com este trabalho através de seus conhecimentos, correções e sugestões.

Ao LAGEA, não só pelo espaço físico disponibilizado, mas também por cada uma das pessoas que estão neste laboratório. São pessoas maravilhosas e de grande conhecimento, dispostos sempre a ajudar e sanar dúvidas, com certeza uma família, torcendo sempre pelo sucesso do outro. Em especial, gostaria de agradecer a Karen, que me ajudou muito com os programas, teve o carinho e o zelo de me ensinar e ajudar sempre que podia, sempre preocupada com os resultados e pensando junto comigo em métodos diferentes para obter resultados. Ao Wilson, por me ensinar a rodar os programas de parentesco, no qual sozinha eu não conseguiria. Montou uma aula, explicou passo a passo e esteve sempre disponível para tirar dúvidas. Com certeza ele tem um futuro incrível pela frente, e merece todo o sucesso que alcança. E por último e mais especial, a Camilinha, a pessoa que inicialmente me apresentou ao LAGEA, me ensinou a fazer extração de DNA e PCR ainda na graduação, minha parceira de mestrado. Uma pessoa maravilhosa, com um coração gigante, com um conhecimento enorme, e sempre presente, sempre preocupada, sempre atenciosa e sempre com muito amor. A você Cami, meus sinceros agradecimentos, pois foi graças a você que minha jornada na genética se iniciou.

As amigas que o colégio me trouxe, Bruna e Franciele, que há mais de 10 anos estão ao meu lado. Esta conquista em especial eu divido com elas, por acreditarem em mim até mesmo quando eu não acreditava, por ouvirem falar

de assuntos que elas não entendiam com um sorriso no rosto (afinal, são de humanas), por estarem presentes nas crises e me ajudarem a me livrar delas. Muito obrigada por mesmo eu cantar desafinadamente na ponte, vocês nunca terem desistido de mim e da minha amizade.

Aos amigos que a graduação me trouxe, em especial, Gessica e Rafael, que mesmo sendo de áreas diferentes, nunca me deixaram na mão. Estavam sempre de portas abertas pra ouvir, sempre um ombro amigo pra desabafar e que estão presentes em todas as conquistas ao meu lado. Que essa seja apenas mais uma de outras tantas que virão.

Em especial a um casal de casais de amigos, no qual foi minha base durante todo esse período. Mateus, Barbara, Rayssa e Paulo, muito obrigada por me aturarem no desanimo, no estresse, por me apoiarem nas decisões, nas orações, nas viagens. O carinho e o amor por vocês a cada dia que passa só cresce. E essa vitória não seria alcançada sem a intercessão de vocês.

A minha família, que me apoia nas decisões e me ama, mesmo com meus erros. Sei que eles foram minha base, meu espelho, e graças ao esforço dos meus pais de se preocuparem sempre com a minha vida acadêmica, hoje alcanço mais esse sonho na minha vida.

E por ultimo e não menos importante, ao meu noivo, Weslei. Iniciamos essa jornada do mestrado juntos, cada um em seu departamento, passamos pelas mesmas dificuldades, alegrias, pesadelos, mas essa conquista comemoramos juntos, pois minhas vitórias são suas, do mesmo jeitos que minhas batalhas também são suas. Muito obrigada pela paciência, pelo amor, pelo companheirismo, por ser meu melhor amigo. Muito obrigada por estar na minha vida e mesmo com tanto defeitos, nunca desistir de mim.

E claro, sem Deus, sem a força e a paciência que Ele me da diariamente, esse trabalho não teria se realizado. A Ele sempre toda glória e todo louvor.

MUITO OBRIGADA!

Menezes, D.C.L. **Análise genética do plantel de peixes para repovoamento da estação de piscicultura de Salto Grande - SP.** 2017. 86 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Biologia Molecular) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

Os peixes de água doce são de extrema importância para a economia, sendo utilizados não só para consumo, mas também para pesca esportiva e para turismo. Assim, os interesses por esses recursos vivos são vários, existindo a necessidade de estudos destas espécies, para que ocorra a correta manutenção desses organismos. A piscicultura visa o abastecimento para consumo de peixes, para o repovoamento de habitats alterados e preservação de espécies ameaçadas. Com os marcadores microssatélites podem ser avaliados: sistemas de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética dos estoques de peixes tanto de cativeiros bem como das populações naturais. Neste estudo, foi analisada a variabilidade genética de três espécies: *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Salminus brasiliensis*, cultivadas na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Salto Grande- SP para estocagem no Rio Paranapanema. Foram analisadas para cada espécie três populações distintas: de matriz, de alevinos e um correspondente a população natural. As três populações mostraram alelos privados na População Natural, *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* apresentaram também na Matriz. Dentre as nove populações analisadas, oito delas apresentaram F_S positivo indicando que a maioria está sofrendo endogamia. Quando observado os dados de variância molecular (AMOVA), as três espécies mostraram que a maior variação se encontra entre os indivíduos. Apenas *P. lineatus* apresentou indícios de gargalo genético. As análises de F_{ST} corroboram com os dados encontrados pelo Structure, mostrando que algumas espécies apresentam uma diferenciação genética entre as populações desde baixa (0,002) a alta (0,175), sendo maiores nas comparações entre as populações de cativeiro e a população natural. As análises de irmandade mostram um alto nível de parentesco entre eles, onde o número de famílias encontradas variou de um a quatro dentro das populações, com vários indivíduos pertencendo a uma mesma família. Deste modo, percebe-se que o manejo para cultivo destas espécies está inadequado, com baixo número de parentais para a produção de alevinos, o que tem levado a perda da variabilidade genética e uma maior diferenciação com a população natural (população receptora). Indica-se a necessidade de um manejo genético correto para que ocorra a conservação dessas espécies em seu habitat natural.

Palavras chaves: Piscicultura. Microssatélite. Repovoamento. Rio Paranapanema.

Menezes, D.C.L. **Genetic analysis of fish stock for restocking of Salto Grande - SP fish farming**. 2017. 86 p. Dissertation presented as a partial requirement to obtain the title of master, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Estadual de Londrina, 2017.

ABSTRACT

The fresh water's fishes are extremely important to the economy; they are used for consumption, but also for sport fishing and for tourism. Therefore, the interest for these living resources are plenty, having the need to study these species, so that the correct maintenance of these organisms. The fish farming aims to supply fishes for consumption, for restocking of altered habitats and preservation of endangered species. With the microsatellite markers can be evaluated: breeding systems, gene flow and genetic structure of fish stock from both captive and natural population. In this study, the generic variability of three species was analyzed: *Prochilodus lineatus*, *Piaractus mesopotamicus* e *Salminus brasiliensis*, grown in the Hydrobiology and Aquaculture Station of Salto Grande-SP, for restocking in the Paranapanema river. For each specie, was analyzed three distinct populations: breeding, fingerlings and one relative to a natural population. The three population showed private alleles in the Natural Population, *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* also exhibit in the breeding. Abroad the nine analyzed populations, eight of them presented positive F_{IS} showing that most of them are suffering endogamy. When observed the data of molecular variance (AMOVA), the three species revealed that the biggest variation is among the individuals. Only *P. lineatus* presented evidence of a genetic bottleneck. The F_{ST} analyses corroborate with the data found by structure showing that some species have a genetic differentiation between the populations from low (0,002) to high (0,175) being greater in the comparisons between the captive populations and the natural population. Kinship analysis shows a high level of kinship between them, where the number of families found varied from 1 to 4 among the population, with several individuals included in the same family. Therefore, it is perceived that the management for cultivation of these species is inappropriate, with low number of parents for the production of fingerlings. Which has led to the loss of genetic variability and a bigger differentiation with a natural population (the receiving population). There is a need for a correct genetic management for the conservation of these species in their natural habitat.

Key words: Fish farming. Microsatellite. Restocking. Paranapanema River.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aspectos morfológicos da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	19
Figura 2.	Aspectos morfológicos da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i>	20
Figura 3.	Aspectos morfológicos da espécie <i>Salminus brasiliensis</i>	21
Figura 4.	Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno <i>et al</i> (2005) para a espécie <i>P. lineatus</i>	40
Figura 5.	Representação gráfica a partir de $K = 3$ para a espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	40
Figura 6.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Matriz de <i>Prochilodus lineatus</i>	42
Figura 7.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Matriz da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	44
Figura 8.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Alevinos de <i>Prochilodus lineatus</i>	45
Figura 9.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Alevinos da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	46
Figura 10.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população Natural de <i>Prochilodus lineatus</i>	47
Figura 11.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população Natural da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	48
Figura 12.	Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno <i>et al</i> (2005) para a espécie <i>P. mesopotamicus</i>	54
Figura 13.	Representação gráfica a partir de $K = 2$ para a espécie <i>P. mesopotamicus</i>	54
Figura 14.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Matriz de <i>P. mesopotamicus</i>	56
Figura 15.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Matriz da espécie <i>P. mesopotamicus</i>	57

Figura 16.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Alevinos de <i>P. mesopotamicus</i>	58
Figura 17.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Alevinos da espécie <i>P. mesopotamicus</i>	59
Figura 18.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população Natural de <i>P. mesopotamicus</i>	60
Figura 19.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população Natural da espécie <i>P. mesopotamicus</i>	61
Figura 20.	Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno <i>et al</i> (2005) para a espécie <i>S. brasiliensis</i>	68
Figura 21.	Representação gráfica a partir de $K = 2$ para a espécie <i>S. brasiliensis</i>	68
Figura 22.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Matriz de <i>S. brasiliensis</i>	70
Figura 23.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Matriz de <i>S. brasiliensis</i>	71
Figura 24.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Alevinos de <i>S. brasiliensis</i>	72
Figura 25.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Alevinos de <i>S. brasiliensis</i>	73
Figura 26.	Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população Natural de <i>S. brasiliensis</i>	74
Figura 27.	Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população Natural de <i>S. brasiliensis</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Locos, tamanho do fragmento, temperatura de pareamento e sequência dos <i>primers</i> <i>Foward</i> e <i>Reverse</i> , para cada uma das espécies analisadas.....	33
Tabela 2.	Diversidade genética de <i>P. lineatus</i> encontradas nos locos das três populações analisadas.....	35
Tabela 3.	Alelos privados para a espécie <i>P. lineatus</i>	36
Tabela 4.	Média da diversidade genética para as espécies <i>P. lineatus</i> encontradas nas três populações analisadas	36
Tabela 5.	Testes de gargalos genéticos recentes (Bottleneck) para a espécie <i>P. lineatus</i> nas três populações analisadas	38
Tabela 6.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações analisadas de <i>P. lineatus</i> , mostrando o componente de variação e a porcentagem de variação	38
Tabela 7.	Diferenciação genética (F_{ST} par a par) baseada nas estatísticas F de Wrigth entre as populações de <i>P. lineatus</i>	39
Tabela 8.	Reconstrução de parentesco da população de Matriz da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	43
Tabela 9.	Reconstrução de parentesco da população de alevinos da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	45
Tabela 10.	Reconstrução de parentesco da População Natural da espécie <i>Prochilodus lineatus</i>	47
Tabela 11.	Diversidade genética de <i>P. mesopotamicus</i> encontradas nos locos das três populações analisadas.....	50
Tabela 12.	Alelos privados para a espécie <i>P. mesopotamicus</i>	50
Tabela 13.	Média da diversidade genética de <i>P. mesopotamicus</i> encontradas nas três populações analisadas	51
Tabela 14.	Testes de gargalos genéticos recentes (Bottleneck) para a espécie <i>P. mesopotamicus</i> nas três populações analisadas	52
Tabela 15.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações analisadas de <i>P. mesopotamicus</i> , mostrando o componente de variação e a porcentagem de variação	53
Tabela 16.	Diferenciação genética, F_{ST} par a par, baseado nas estatísticas F de Wrigth obtida para as amostras de <i>P. mesopotamicus</i>	53

Tabela 17.	Reconstrução de parentesco da população de Matriz da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i>	56
Tabela 18.	Reconstrução de parentesco Alevinos da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i>	58
Tabela 19.	Reconstrução de parentesco da População Natural da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i>	60
Tabela 20.	Diversidade genética de <i>S. brasiliensis</i> encontradas nas três populações analisadas.....	63
Tabela 21.	Média da diversidade genética de <i>S. brasiliensis</i> encontradas nas três populações analisadas.....	64
Tabela 22.	Testes de gargalos genéticos recentes (Bottleneck) para as amostras de <i>S. brasiliensis</i> nas três populações analisadas.....	65
Tabela 23.	Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações analisadas de <i>S. brasiliensis</i> , mostrando o componente de variação e a porcentagem de variação.....	66
Tabela 24.	Diferenciação genética, F_{ST} par a par, baseado nas estatísticas F de Wright obtida para a espécie <i>S. brasiliensis</i>	67
Tabela 25.	Reconstrução de parentesco da população de Matriz da espécie <i>Salminus brasiliensis</i>	70
Tabela 26.	Reconstrução de parentesco da população de Alevinos da espécie <i>Salminus brasiliensis</i>	72
Tabela 27.	Reconstrução de parentesco da População Natural da espécie <i>Salminus brasiliensis</i>	74

SUMARIO

1.	Introdução	15
2.	Revisão Bibliografica	18
3.	Objetivos	27
4.	Material e Métodos	28
4.1	Coleta	28
4.2	Extração de DNA.....	28
4.3	Microssatélite.....	29
4.4	Análises dos dados.....	30
5.	Resultados e Discussão	34
5.1	<i>Prochilodus lineatus</i>	34
5.2	<i>Piaractus mesopotamicus</i>	49
5.3	<i>Salminus brasiliensis</i>	62
5.4	Considerações finais	76
6.	Conclusão	79
	Referências	80

1. Introdução

O Brasil está entre os cinco maiores países do mundo e por ter grandes dimensões continentais, apresenta diversas variações climáticas, de relevo e um dos maiores complexos hidrográficos do mundo, abrigando uma biodiversidade complexa de fauna e flora, tanto terrestre quanto aquática e de dossel (Brasil, 2015a).

Os ambientes aquáticos não possuem uma distribuição uniforme, mas estão presentes em todo território brasileiro, envolvendo assim todos os biomas. A biodiversidade aquática inclui o conjunto dos ecossistemas de âmbito continental, costeiro e marinho e também os organismos vivos que habitam ou passam parte de seu ciclo biológico nesses locais. Dentre eles, encontra-se os rios de água doce, pois são utilizados para consumo e atividades econômicas, bem como para geração de energia. Essas águas provêm de mananciais, tanto subterrâneos e superficiais, sendo uma das principais fontes as bacias hidrográficas (Brasil, 2015a).

Dentre as bacias hidrográficas do Brasil, encontra-se a Bacia do Paraná, com uma área que ultrapassa 890 mil Km², sendo a segunda maior do Brasil (atrás apenas da Bacia do Amazonas, que ultrapassa os 3 milhões de Km²). Essa bacia comporta mais de 10% do território brasileiro, sendo a de maior densidade populacional do país, com a maior industrialização e com grande atividade agrícola. É a mais explorada em recursos energéticos, onde fornece 70% da energia para o Brasil. Os rios Paranaíba, Grande, Tiete, Paranapanema e Iguaçu, são os principais rios dessa bacia, e tiveram seus cursos barrados por reservatórios, diminuindo os trechos lóticos do rio, o que pode diminuir a diversidade genética (Agostinho et al., 2007).

Dentre os grandes afluentes do rio Paraná, encontramos o rio Paranapanema. Sua extensão apresenta um elevado número de reservatórios, onde são poucos os trechos que permanecem com suas características naturais (Agostinho et al., 2007). Nos últimos anos, o rio Paranapanema e seus reservatórios vêm sendo alvo de diversos estudos de conservação devido a destruição do habitat de inúmeras espécies de diferentes organismos que habitam em seu curso, sendo necessário buscar novas formas de manejo, visando a preservação de sua fauna e flora (Neves, 2008).

Peixes e outros organismos aquáticos são grandes fontes de proteínas para a sociedade, de modo que metade da população mundial baseia cerca de 20% da sua dieta nesses indivíduos (Agostinho et al., 2007). Os interesses por esses recursos vivos são muitos, havendo assim a necessidade de estudos para a conservação desses organismos além de um levantamento da fauna e flora de rios e mares, para que ocorra a manutenção correta desses indivíduos (Brasil, 2015b).

Além da exploração de rios em busca desses organismos, a degradação do ambiente ajuda na diminuição de espécies com altos valores econômicos e grande porte, dando abertura para a introdução de novas espécies de peixes com baixos valores econômicos de pequeno porte (Nobile, 2010). Um dos principais motivos de ingresso de novas espécies de peixes em rios acontece por meio de escapes acidentais de pisciculturas, como em período de cheias ou esvaziamento de tanques (Orsi e Agostinho, 1999), dando assim abertura para que estas espécies se adaptem ao local, podendo extinguir espécies locais.

A piscicultura, na década de 90, visava o abastecimento de estabelecimentos para o consumo de peixes, o que trouxe melhorias para a piscicultura nacional através de investimentos externos. Com isso, a exigência de peixes de melhor qualidade foi requerida, sendo assim necessária a aplicação de técnicas genéticas para manter essa qualidade (Embrapa, 2012).

O conhecimento da variabilidade genética em estoques naturais e artificiais de peixes é de extrema importância para seu correto manejo. Os marcadores microssatélites têm sido utilizados com sucesso no monitoramento genético dos peixes; permitindo a avaliação de sistemas de cruzamento; fluxo gênico; estrutura genética de estoques e populações naturais. Eles podem ser aplicados para estimar coeficientes de endocruzamento e parentesco, sendo utilizados para identificar relações genéticas entre parentais e progênes. Com o emprego de microssatélites, é possível indicar o manejo adequado, reduzindo o número de endogâmias, evitando a perda de variabilidade genética (Moreira et al 2007).

Neste trabalho, foram analisados os aspectos genéticos de três espécies cultivadas na piscicultura para estocagem, tais como análise de endogamia e estrutura genética de estoques de matriz e alevinos, e comparar com a população natural encontradas no rio Paranapanema, onde ocorre a estocagem.

2. Revisão Bibliográfica

O rio Paranapanema é um dos rios mais importantes da margem esquerda do rio Paraná, nascendo na vertente ocidental da Serra de Paranapiacaba, no município de Capão Bonito (SP) e desagua no rio Paraná, após percorrer cerca de 500 Km. Ele recebe como principais tributários os rios Itararé, Pardo, Tibagi e Pirapó, fazendo fronteira em sua maior parte entre os estados de São Paulo e Paraná (Castro et al, 2003). Neste rio, foram instaladas onze usinas hidrelétricas no seu curso, sendo a Usina de Capivara a maior delas. Atualmente, cerca de 155 espécies de peixes, pertencentes a nove ordens, já foram identificadas (Duke Energy, 2008).

As barragens no rio Paranapanema trouxeram inúmeras mudanças no seu trecho. As águas do rio passaram de um estado lótico a lântico ou semilântico, houveram mudanças nas condições químicas e físicas da água, e em sua qualidade. Com essas mudanças, foram formados novos habitats e destruídos outros. Espécies generalistas nesses casos conseguem se adaptar aos novos ambientes formados, já que estas têm uma maior flexibilidade em relação às suas necessidades alimentares e de reprodução. No entanto, nesses locais também podem ser encontradas espécies com uma menor flexibilidade, que não conseguem se adaptar ao novo ambiente, podendo levar a extinção local de algumas destas espécies (Agostinho et al., 2007).

De acordo com Castro et al (2003), 36% dos indivíduos encontrados nos 17 pontos coletados ao longo do Paranapanema pertencem a ordem Characiformes. Os peixes presentes nesta ordem são caracterizados

por apresentarem escamas em todo o corpo, com exceção da cabeça, nadadeira adiposa e raios das nadadeiras moles. Essa ordem possui cerca de 16 famílias, 230 gêneros e aproximadamente 1300 espécies descritas. São de hábitos diurnos e estão restritos a águas doces, presentes na África e nas Américas, estendendo-se desde os Estados Unidos até a América do Sul (Oyakawa et al, 2006). Foram analisadas três espécies neste estudo, pertencentes a ordem Characiformes, descritas a seguir.

Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1847) pode ser conhecido popularmente como curimatã, curimba, sabalo, curimbatá ou papa-terra, dependendo da região onde é encontrado (Figura 1) (CEMIG/CETEC, 2000). É uma espécie de água doce com hábito detritívoro e está distribuída em toda a bacia do Paraná (localizada na Argentina, Uruguai, Brasil e Paraguai). Está incluída na família Prochilodontidae, juntamente com mais 12 espécies, que mantêm grandes populações exercendo papéis como ciclagem de nutrientes em rios neotropicais (Rueda et al, 2011b).

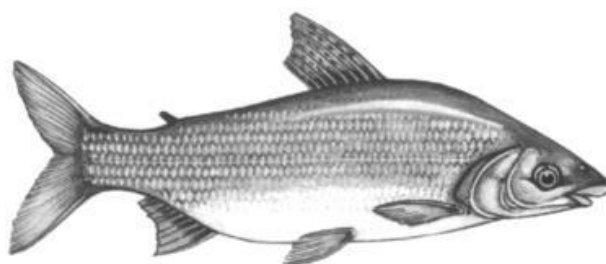


Figura 1. Aspectos morfológicos da espécie *Prochilodus lineatus*. Fonte: agricultura.sp

Esta espécie é uma das que oferecem grandes vantagens à piscicultura devido a sua elevada taxa de crescimento, podendo pesar mais de um quilo em um ano se for bem alimentada (Freitas et al, 2002).

Rueda et al (2011b) sugerem que esta espécie pode ser vulnerável de diversas formas, como a superexploração, degradação do ambiente, poluição ou fragmentação devido a barragens.

Por ser uma espécie de ampla distribuição, *Prochilodus lineatus* apresenta formas variadas do corpo, que dependendo do local onde se encontra, pode apresentar contornos diferentes. Essa diferenciação ocorre devido aos recursos bióticos e abióticos do habitat. Por falta de manejo adequado, essa espécie vem sofrendo uma redução drástica e sua caracterização genética é uma das medidas necessárias para sua conservação (Henriques, 2014).

Piaractus mesopotamicus (Holmberg, 1887), conhecido como pacu, caranha, pacu-caranha ou pacu-guaçu (Urbinati et al., 2005) pertence a família Serrasalminidae e apresentam escamas pequenas (Figura 2).



Figura 2. Aspectos morfológicos da espécie *Piaractus mesopotamicus*. Fonte: clubedapescaria

Os peixes desta família são endêmicos da América do Sul, com 15 gêneros e 80 espécies. Na bacia do Alto Paraná se encontram apenas cinco espécies de pacu (Shibatta e Dias, 2006). Diversas espécies da subfamília Serrasalminae, são economicamente importantes, representando uma

significativa fração da produção pesqueira no Brasil, tanto na captura direta nos rios como nas aquiculturas (Calcagnotto et al, 2001).

É uma espécie de alta preferência de pescadores e sua criação em cativeiro pode ser designada para repovoamento em reservatórios ou para a sua comercialização devido ao seu alto valor comercial, onde sua carne é de alto índice de aceitação pelos consumidores (Silva, 2007).

É utilizada em pisciculturas e programas de estocagem devido a diversos fatores, como facilidade da obtenção de larvas, adaptação à alimentação artificial e elevado valor comercial, além de ser utilizada para programas de repovoamento devido sua alta demanda no mercado (Marques, 2015).

Salminus brasiliensis (Cuvier, 1816), conhecido popularmente como dourado (Figura 3), tem um alto valor econômico, sendo assim visado por pescadores. Além da interferência dos pescadores, as modificações ambientais causadas por barragens, poluições, desmatamento influenciaram na diminuição dessa espécie no Brasil (Viveiros et al, 2009).



Figura 3. Aspectos morfológicos da espécie *Salminus brasiliensis*. Fonte: clubedapescaria

Esta espécie pertence à família Characidae que abrange a maior parte de peixes de escamas de água doce do Brasil. Esta família apresenta cerca de 21 gêneros e 47 espécies identificados no Alto Paraná

(Shibatta e Dias, 2006). Possui ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrada em diversas regiões do Brasil, como a Bacia da Prata, Lagoa dos Patos, na Bacia do rio Amazonas, entre outros. Na bacia do Paraná, devido a sua importância não somente na alimentação, mas também relacionados com concursos de pesca para avaliação de tamanho, tem decaído o número destes indivíduos desde 1940, mesmo ocorrendo regulamentações para a pesca desportiva e comercial (Rueda et al, 2011a).

Atualmente, *Salminus brasiliensis* vem sendo alvo de interesse para centro de criações por dois motivos; apresenta um alto potencial para piscicultura devido ao seu elevado crescimento inicial e preço de mercado; e por ser um animal que se encontra na lista de espécies em extinção em algumas regiões do Brasil, sendo necessária sua reprodução em cativeiro (Flora et al., 2010).

Delgado et al (2003) mostram que até 2020, a procura por peixes deve aumentar substancialmente. Devido a grande demanda por esses organismos, a aquicultura juntamente com os rios fornece boa parte de peixes para consumo e para pesca esportiva, mas não se sabe se serão suficientes para suprir o fornecimento futuro. O estoque para repovoamento tem o potencial de reduzir o tempo necessário para reconstruir locais que foram severamente danificados pelo homem e melhorar a produtividade de peixes. Essas intervenções caracterizadas como repovoamento, têm o intuito de soltar indivíduos juvenis de peixes para restaurar a biomassa da população, suprimindo assim a necessidade local daquela espécie (Bell et al., 2006).

Devido à tamanha importância da aquicultura, a Embrapa lançou um número temático de sua revista, englobando diversos trabalhos que

abrangem diversas áreas, como aspectos nutricionais, desempenhos zootécnicos e manejo, avaliação de sanidade e trabalhos de variabilidade genética. Todo esse trabalho vem auxiliar novos investidores para que haja uma correta manutenção dessas aquiculturas (Rocha et al., 2013).

A aquicultura aumentou no Brasil, superando até mesmo atividades de avicultura e pecuária. Esse crescimento se deve as atividades exercidas pela aquicultura, que engloba o cultivo de diversos organismos aquáticos, como jacarés, rãs, moluscos, camarão e peixes. Dentre todos esses organismos, os peixes merecem um maior destaque, pois correspondem a cerca de 86% da aquicultura nacional (Kubitza, 2015).

A piscicultura no Brasil cresceu a partir do momento que as técnicas de reprodução em cativeiro se consolidaram. Essas técnicas estão em desenvolvimento desde a década de 30 no Brasil, com a criação da desova artificial de peixes. Foi necessário aprender cada método, como o manejo adequado para cada espécie, características ambientais de cada um e a manutenção dos ovos e larvas dos peixes. O Brasil passa por um período de profissionalização, não só voltada para a atividade comercial, mas também para o repovoamento com alevinos criados a partir das espécies de seu habitat natural, sendo necessário então o correto manejo desses peixes nas pisciculturas (Andrade e Yasui, 2003).

Quando o manejo reprodutivo dessas espécies é realizado de forma errônea nessas estações de piscicultura, como o baixo número de reprodutores, condições físico-químicas da água fora dos padrões estabelecidos para as espécies, locais pequenos para estoque, por exemplo, a variabilidade genética da progênie que será liberado posteriormente em rios,

diminuirá, afetando assim a capacidade de adaptação ao novo ambiente. Esse é um dos grandes motivos no qual o monitoramento genético dessas populações deve ser de extrema importância nos programas de repovoamento, para que as populações naturais e de estoque possam ser analisadas geneticamente a fim de conservar a variabilidade das espécies (Lopera-Barrero et al, 2010).

A análise de DNA por meio de marcadores genéticos possibilita a identificação da variabilidade genética de uma espécie, bem como de diversas populações, permite a avaliação das relações de parentesco entre os organismos e sua ancestralidade, estrutura genética, estrutura e dinâmica de uma população entre outros (Oliveira et al, 2009).

Oliveira et al (2005) mostraram a eficiência de análises de variabilidade genética utilizando o marcador de RAPD em *Prochilodus lineatus* e *Astyanax fasciatus* no rio Paranapanema. Nesse estudo os autores concluíram que mesmo sendo peixes migratórios a variabilidade dos indivíduos da mesma população permanece baixa, havendo pouca diferenciação genética entre eles.

Povh et al (2008a) utilizando a técnica de RAPD, mostraram a diferenciação genética entre populações de *Piaractus mesopotamicus* encontrados nos rios e em pisciculturas. Os autores observaram que a variabilidade genética da população natural é moderadamente maior do que as de pisciculturas, evidenciando a diminuição de variabilidade em locais de cultivo. Essa diminuição de diferenciação pode acontecer devido à falta de reprodutores em um número ideal para que haja uma boa variabilidade genética entre os alevinos.

Para auxiliar na análise genética existem diversos marcadores moleculares que podem ser utilizados. Além do RAPD, como já exemplificado, encontramos também marcadores AFLP e RFLP e os marcadores microssatélites (SSR). Powell et al (1996) utilizou esses quatro marcadores para análise de soja, afim de comparar estes marcadores. Em suas análises, os autores definiram um único padrão de análise e concluíram que as estimativas baseadas em AFLP, RFLP e SSR estão altamente correlacionadas.

Os microssatélites vêm sendo utilizados com muita eficiência na detecção de variabilidade genética de populações, sendo de extrema importância na genética de conservação para o manejo correto das espécies (Morelli, 2007).

Como enfatizado por Povh et al (2008b), as características destes marcadores o tornam ideal para identificar locos polimórficos, devido ao seu alto nível de variação, pois como se trata de regiões repetitivas aumenta-se o erro de leitura da DNA polimerase.

Essa classe de marcadores moleculares possui padrão codominante, de 1 a 6 pares de bases repetidas *in tandem* e podem ser encontradas em regiões codificantes e não codificantes do genoma dos eucariotos. Estes marcadores vêm sendo utilizados para resolver questões relacionadas à estrutura genética e a conservação de recursos genéticos de populações (da Silva et al, 2012). A grande aplicabilidade dos microssatélites em estudos com peixes pode ser evidenciada pela quantidade de artigos disponíveis na literatura mostrando o isolamento e caracterização destes marcadores para este grupo (Henriques, 2014).

Moreira et al (2007) avaliaram tilápias (*Oreochromis niloticus*) e sua prole por meio de marcadores microssatélites e, encontraram uma alta variabilidade genética e baixos índices de endogamia, mostrando que o manejo reprodutivo quando correto, pode evitar consequências negativas para a população de estudo.

3. Objetivos

Este estudo teve por objetivo geral, o estudo da estrutura genética das matrizes (estoque reprodutor) e dos lotes de alevinos (estoque repovoador) de três espécies de peixes cultivados na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Salto Grande- SP situado no rio Paranapanema e compará-los com a população natural (estoques receptores) deste mesmo rio. E com os dados obtidos verificar se há um correto manejo na produção destas espécies.

Para tanto, os objetivos específicos desse trabalho foram:

- Estimar a variabilidade genética dos diferentes lotes de alevinos e das matrizes através do marcador microssatélite;
- Estimar a variabilidade genética da população natural;
- Efetuar uma análise comparativa dos perfis entre os lotes de alevinos (estoque repovoador), as matrizes (estoque reprodutor) e a população natural, a fim de se obter dados de diferentes parâmetros de diversidade que possibilitem a determinação da estrutura genética desses estoques;
- Verificar a eficiência no manejo dos estoques reprodutores da piscicultura quanto a endogamia e a variabilidade genética;

4. Material e Métodos

4.1 Coleta

Foram analisados indivíduos de três espécies de peixes pertencentes a ordem Characiformes: *Salminus brasiliensis*, *Prochilodus lineatus* e *Piaractus mesopotamicus*.

De cada uma das espécies foram analisados 30 exemplares do estoque reprodutor (matrizes), 30 exemplares do estoque repovoador (alevinos) obtidos na Estação de Hidrobiologia e Aquicultura de Salto Grande/SP e 30 exemplares da população natural coletados nas escadas para transposição de peixes nas hidroelétricas de Canoas I e Canoas II, situados no rio Paranapanema. Amostras de nadadeiras foram retiradas imediatamente após captura e mantidas em álcool absoluto a -20°C até o uso.

4.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído de acordo com o protocolo de extração Fenol-Clorofórmio descrito por Almeida et al. (2001). O material foi macerado com tesoura pequena em um volume de 600µL de tampão de extração Tris HCl (pH8, 500mM, EDTA a 30mM, NaCl a 10mM, SDS a 1%), e adicionado 5µL de proteinase K em uma concentração de 100µg/µL. Foi mantido em banho-maria a 62°C overnight.

Após a dissolução do tecido foram realizadas três lavagens, a primeira com fenol, utilizando o mesmo volume do tampão (600µL), homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 12000rpm a 4°C. Depois de centrifugado, foi retirado o sobrenadante e transferido para outro microtubo. Foi

feito uma segunda lavagem com clorofane (1fenol:1clorofil) foi utilizado o mesmo volume inicial homogeneizado e centrifugado por 15 minutos a 12000rpm a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo e adicionado o mesmo volume de clorofil (24 Clorofórmio:1 álcool isoamílico) centrifugando por 15 minutos a 12000rpm a 4°C.

A precipitação do DNA foi realizada com dois volumes de etanol absoluto e dez por cento do volume de NaCl 3M. O material permaneceu em freezer por 40 minutos. Após essa etapa, foi centrifugado e o sobrenadante descartado, realizada uma lavagem final com 100µL de álcool 70% seguida de centrifugação e descartado o sobrenadante novamente. O precipitado de DNA foi seco em temperatura ambiente e resuspendido em 200µL de tampão TE (Tris-HCl pH 8,0 10mM e EDTA a 1mM).

A quantificação do DNA das amostras (diluídas 1:10 e sem diluir) foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop, seguindo as especificações dos fabricantes. O valor obtido foi utilizado nos cálculos das diluições para uma concentração final de 5ng/µL de DNA (utilizada nas reações de amplificação).

4.3 Microssatélite

Nas reações de PCR foram utilizados diferentes conjuntos de primers (forward e reverse) previamente isolados das espécies *Salminus brasilienses* (Rueda et al, 2011a), *Prochilodus lineatus* (Rueda et al, 2011b) e *Piaractus mesopotamicus* (Calcagnotto et al., 2001) (Tabela 1).

As reações de PCR foram produzidas em um volume total de 10µL, contendo 4,5µL de Master Mix 2X, 0,2µL Glicerol 50%, 0,25µL de mix de

primer (10 μ L primer R, 1 μ L primer F, 9 μ L de água ultrapura), 0,25 μ L de fluorescência, 2 μ L de DNA a 5ng/ μ L e água ultrapura para completar o volume da reação. As amplificações foram feitas em termociclador (PTC-100, MJ Research, Inc.) e a temperatura de pareamento foi otimizada de acordo com o conjunto de primers utilizados.

As amplificações de PCR foram iniciadas com uma desnaturação de 4 minutos a 94°C, seguida de 10 ciclos: 94°C por 30s de desnaturação, 50° - 64°C por 1min para o pareamento (a temperatura de pareamento varia entre os primers) (Tabela 1) e 72° por 30s de extensão; 25 ciclos, 89°C por 30s de desnaturação, 50° - 64°C por 1min para o pareamento e 72° por 30s para a extensão, terminando com uma extensão final de 30 minutos a 72°C.

A reação para a análise dos fragmentos consistiu em um mix de 8 μ L de formamida:genescan (7,9:0,1) e 2 μ L do mix das fluorescências e primers, onde cada fluorescência esta combinada a um primer, e submetidos a leitura em sequenciador ABI PRISM 3500xL (AppliedBiosystems).

4.4 Análise dos dados

A análise dos fragmentos obtidos e a leitura no programa GeneMarker v2.2.0 (Holland e Parson, 2011) foram realizados manualmente.

Para verificar o nível de diversidade de cada loco, foi utilizado o número de alelos por loco e total, a heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) para cada uma das espécies utilizando o programa Genalex 6.5 (Peakall e Smouse, 2006). Para estimar os desvios do equilíbrio de Hardy-

Weinberg (EHW) pela cadeia de Markov foi utilizado o programa Genepop v4.2 (Rousset, 2008), podendo ser acessado em <<http://genepop.curtin.edu.au/>>.

A partir do programa Arlequim v.3.5.1.3 (Excoffier e Lischer, 2010), foi calculado o índice de variância molecular (AMOVA), o índice de diferenciação genética entre as populações (F_{ST}) e o índice de endogamia das espécies (F_{IS}).

Para estimar a existência de gargalos populacionais foi utilizado o programa Bottleneck v.1.2.02 (Piry e Cornuet, 1999), sendo utilizado o teste de *Wilcoxon sing-rank*, que utiliza três modelos evolutivos (IAM, TPM e SMM).

Para verificar a presença de alelos nulos e *stutters* foi utilizado o programa MICROCHECKER (Oosterhout et al., 2004).

O programa Structure v.2.3.3 (Pritchard *et al*, 2000) foi utilizado para as análises Bayesianas. Nesta análise foi utilizado o modelo *admixture*, onde ele assume que pode haver uma ancestralidade mista com contribuições genótípicas de diferentes populações. O número de agrupamento (K) foi conduzido para simulações de um a dez K's diferentes (K=10). Cada opção foi replicada 20 vezes (Evanno *et al*, 2005), com 10 mil interações no *burn-in* e 100 mil interações na Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC). Para ordenar os dados e obtenção do valor de K, foi utilizado o programa Structure Harvester v.0.6.7 (Earl *et al*, 2012), disponível em <<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>>.

Para análise de parentesco entre os indivíduos de cada população, foram utilizados dois coeficientes: 1) cálculo de estimador de parentesco, através do coeficiente de Lynch & Ritland (1999) obtido pelo

programa KINGROUP (Konovalov et al, 2004); 2) identificação de relação de parentesco e progenitores, através do programa COLONY (Jones e Wang, 2010). Foram utilizados como padrão: $>0,5$ para irmãos completos (FS); $> 0,25$ para meio irmão (HS); $< 0,25$ para não-relacionados (UR).

Tabela 1. Locos, tamanho do fragmento, temperatura de pareamento e sequência dos *primers Forward* e *Reverse*, para cada uma das espécies analisadas.

Locos	Tamanho do fragmento (pb)	Temperatura de Pareamento (°C)	Sequencia do Primer F	Sequencia do Primer R
<i>Salminus brasilienses</i>				
Sm10	196-244	52	TCTGACGCTCTAAAGGTG	TCTGACGCTCTAAAGGTG
Sm16	135-148	50	CCTGGTGTGTAAC TTCAA	AATCTGCCTGTAATTTGT
Sm17	196-234	50	TCAACTGATGAGCATTTTT	GGTCAGTGT TTTCTCTCA
Sm23	109-168	44	GGATCTGCTTTTACTCAC	ACATTCACGACAGACCAC
Sm25	167-215	52	CCTGATTCTGCTTCTCT	AAGTAATGTCATCCACAA
Sm37	168-189	52	GGTCTACTGGTGTGTAAT	GATATGTGGGAGAACTTT
<i>Prochilodus lineatus</i>				
PL3	185–203	50	TCTGAGCTGTGAGGAATGGA	AGAGCGCTCAAGCACAGAT
PL9	196–248	55	CGAACATTCTGCTGGGTGTA	TCTCCAACCACTGGGAGAAC
PL14	104-134	61	TGCCCAACACTGAAACTGAG	CTCATCAACCTGCCTGGAAT
PL34	178-212	56	GAGCGGATTCTCCACATGAT	TAATGTGCTCCCTCCACAG
PL35	116-164	52	TCTGAGTCCCTCCATGACAA	TGTGTGTGTGTGTGTGGTTTG
PL119	161-207	58	GAAAAGGCTAGGGGACTGG	GAGGAAAATTGCCTTTTGTAGG
<i>Piaractus mesopotamicus</i>				
Pme4	191-213	59	CATGCTGCTGCAGATTAGAC	CGCTTGCAATTTAACGCAGT
Pme5	182-200	59	CAGAGCATCTGGAGGGACAT	TCTGAGACACTGATATCTAAACACACA
Pme14	195-208	59	ACCGTTATGCCCTACCCTTC	GCGTTCTAGACAGAACTCATGG
Pme20	213-215	57	CAGAGCTTTGAGGAACACGA	CCCATCAGTTACGGGTCATT
Pme21	260-268	57	ATAATGCTGGCGTCAGTGGT	GGACAGCTGGTCTCAAGCTC
Pme28	209-227	57	CCCAGAAGAGTGGAAGCTGT	TGGTGGGAATTGACAAGAAA
Pme32	242-247	57	GCGAGAAATCTGCCTGTGAC	AGGAGGGCATCATGGAGAA

5. Resultados e discussão

5.1 *Prochilodus lineatus*

Dentre as 90 amostras das três populações de *Prochilodus lineatus*, foram obtidos 40 alelos, com o número de alelos variando de 2 a 9 por loco distribuídos em seis locos. Dentre as amostras das populações, alguns locos não amplificaram, fazendo com que o número de indivíduos analisados para alguns locos seja inferiores a 30.

Os maiores números de alelos foram encontrados na População Natural, com 36 alelos distribuídos nos seis locos. Os números de alelos encontrados na população da Matriz e de Alevinos foram iguais (34 alelos) diferenciando no número de alelos por locos (Tabela 2).

O número de alelos observado para as diferentes populações de *Prochilodus lineatus* se mostra inferior ao encontrado no trabalho de Rueda et al (2011b). No entanto no referido trabalho, na descrição dos 13 primers para *P. lineatus*, obtiveram 55 alelos com o número de alelos por loco variando de 2 a 22, em 57 indivíduos da bacia do rio Paraná. Esse maior número de locos analisados pode ter levado a essa diferença de número de alelos entre o presente estudo e o referido trabalho.

Iwersen (2010) analisando a diversidade genética de *Prochilodus lineatus* em pontos no rio Uruguai observou uma variação de 2 a 25 alelos por locos em um total de 153 indivíduos. Em sua grande maioria os locos apresentaram uma diversidade de alelos inferiores a 10, podendo ser comparados com os resultados obtidos neste estudo.

Na análise dos desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), dois locos da população de Matrizes, dois da população de Alevinos e três da População Natural não apresentaram desvios significativos ($p < 0,05$) (Tabela 2).

Os resultados obtidos através do programa MICRO-CHECKER não mostrou indicativo da presença de alelos nulos.

Tabela 2. Diversidade genética de *P. lineatus* encontradas nos locos das três populações analisadas. N – Número de indivíduos analisados; Na – número de alelos; Ne – número de alelos efetivos; Ho – heterozigotidade observada; He – heterozigotidade esperada; EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} – coeficiente de endogamia

População	Locus	N	Na	Ne	Ho	He	EHW	F_{IS}
Matriz	PL3	30	4	3,922	0,233	0,745	0,000*	0,687
	PL9	30	3	2,151	0,900	0,535	0,000*	-0,682
	PL14	28	8	5,192	0,929	0,807	0,570	-0,150
	PL34	28	9	6,788	0,821	0,853	0,011*	0,037
	PL35	29	4	2,817	0,414	0,645	0,002*	0,359
	PL119	30	6	3,087	0,667	0,676	0,144	0,014
Alevinos	PL3	26	4	3,181	0,115	0,686	0,000*	0,832
	PL9	30	3	2,228	0,933	0,551	0,000*	-0,694
	PL14	26	7	4,109	0,654	0,757	0,009*	0,136
	PL34	30	9	5,373	0,800	0,814	0,131	0,017
	PL35	30	2	1,342	0,167	0,255	0,099	0,346
	PL119	30	9	6,667	0,533	0,850	0,000*	0,373
População natural	PL3	30	5	2,390	0,367	0,582	0,007*	0,370
	PL9	30	2	2,000	1,000	0,500	0,000*	-1,000
	PL14	30	7	4,000	0,700	0,750	0,546	0,067
	PL34	30	9	6,000	0,900	0,833	0,944	-0,080
	PL35	29	4	2,620	0,828	0,618	0,181	-0,338
	PL119	30	9	6,000	0,633	0,833	0,004*	0,240

*- significativo ao nível de 5%.

No loco PL35 foi encontrado um alelo presente somente na população de Matriz (alelo privado), com uma frequência de 6,9% e na

População Natural foi encontrado dois alelos privados, no loco PL3 e PL119, tendo uma frequência de 6,7% e 13,3% respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Alelos privados para a espécie *P. lineatus*.

População	Locos	Alelo	Frequência
Matriz	PL35	120	0,069
População natural	PL3	220	0,067
População natural	PL119	197	0,133

A média da heterozigotidade observada (H_o) variou de 0,534 a 0,738 e se apresentou maior na População Natural, com a H_o maior que a heterozigotidade esperada (H_e). Na população da Matriz e de Alevinos, a heterozigotidade esperada foi maior que a observada. A população de Matriz e de Alevinos apresentaram índices significativos de endogamia (F_{IS}) (Tabela 4).

Tabela 4. Média da diversidade genética para as espécies *P. lineatus* encontradas nas três populações analisadas. N_a – número de alelos; N_e – número de alelos efetivos; H_o – heterozigotidade observada; H_e – heterozigotidade esperada; F_{IS} – coeficiente de endogamia

População	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{IS}
Matriz	5,667	3,993	0,661	0,710	0,11821
Alevinos	5,667	3,817	0,534	0,652	0,16783
População natural	6,000	3,835	0,738	0,686	-0,09564

Os valores de heterozigotidade encontrados para *Prochilodus lineatus* são semelhantes aos apresentados em outros trabalhos. Henriques (2014) teve como objetivo principal de seu estudo verificar a diversidade genética de *P. lineatus* da bacia da Prata, e observou um valor de heterozigotidade média esperada de 0,691 e observada 0,514. Mendonça (2015) avaliando a estrutura genética de algumas populações naturais de *P.*

lineatus no rio Sapucaí-Mirim (SP), observou uma heterozigozidade média observada e esperada superior a 0,7.

Índices de endogamia são esperados dentro das estações de pisciculturas por se tratar de um local isolado, com acasalamentos controlados, onde muitas vezes não há correta manutenção e ausência de fluxo gênico, fazendo com que os indivíduos cruzem entre si (Lopes *et al*, 2008). Nesta espécie, podemos observar o ocorrido quando verificamos o F_{IS} positivo tanto nas populações de matriz como na de alevinos, identificando assim, endogamia dentro das população de cativeiro. No entanto na análise da população natural não se evidenciou a presença de endogamia

A análise dos dados pelo programa BOTTLENECK identifica o excesso de heterozigozidade esperada e baixa heterozigozidade observada em três dos modelos rodados pelo programa no teste de *Wilcoxon sign-rank*, no Modelo de Alelos Infinitos (IAM) Modelo de Duas Fases (TPM) e Modelo Passo a Passo (SMM), indicando gargalo genético recente para a população de Matriz e de alevinos nos três modelos, e na População Natural no modelo IAM e TPM (Tabela 5). O modelo de IAM assume que um alelo se converte a outro pela ganha ou perda instantânea de qualquer número de repetições *in tandem* de cada mutação. Já o modelo SMM assume essa conversão de alelos através do ganho ou perda de apenas uma unidade de repetição, fazendo assim com que a variação seja de forma gradual. Já o modelo TPM assume que a instabilidade dos alelos é devido ao aumento ou diminuição de uma unidade repetitiva (Ferreira, 2016).

Tabela 5. Testes de gargalos genéticos recentes (Bottleneck) para a espécie *P. lineatus* nas três populações analisadas. Teste de *Wilcoxon sign-rank* para excesso de heterozigotos. He – número de locos exibindo excesso de heterozigozidade; Hd – número de locos exibindo déficit de heterozigozidade.

	IAM			TPM			SMM		
	He	Hd	P	He	Hd	P	He	Hd	P
Matriz	6	0	0,008	6	0	0,008	5	1	0,008
Alevinos	6	0	0,008	6	0	0,008	4	2	0,008
População natural	6	0	0,008	5	1	0,015	4	2	0,420

Os resultados obtidos para o Bottleneck sugerem que as populações analisadas passaram por um recente gargalo genético. Vemos um resultado semelhante quando analisamos o estudo de Nunes et al (2015), onde avaliaram a estruturação genética de *Salminus hilarii* em vários rios da bacia do Paraná, e observaram valores significativos para grande parte da população, indicando assim o gargalo gênico.

A maior variação encontrada quando se observa os dados obtidos pela AMOVA é entre os indivíduos analisados, com uma variação de 84,8%, enquanto a variação entre as populações foi de 9,79%. A menor variação encontrada foi entre os indivíduos da mesma população, apresentando 5,4% de variação molecular (Tabela 6).

Tabela 6. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações analisadas de *P. lineatus*, mostrando o componente de variação e a porcentagem de variação.

Tipos de Variação	Componentes de variação	Porcentagem da variação(%)
Entre populações	0,17702	9,79
Entre indivíduos dentro da população	0,09761	5,4
Entre indivíduos	1,53333	84,81

Wright (1978) sugeriu que os valores de F_{ST} (índice de diferenciação genética) podem ser interpretados qualitativamente em termos de diferenciação genética como: valores de 0 a 0,05 indicando baixa diferenciação genética, 0,05 a 0,15 moderada, 0,15 a 0,25 alta e acima de 0,25 diferenciação genética muito alta. O menor valor de F_{ST} encontrado foi entre a população de Matriz e a de Alevinos, e a maior encontrada entre a população de Matriz e a População Natural (Tabela 7).

Todos os valores de diferenciação observada entre as populações foi moderada, no entanto, o valor obtido entre as populações de matriz com a população natural está bem próximo de uma alta diferenciação genética.

Tabela 7. Diferenciação genética (F_{ST} par a par) baseada nas estatísticas F de Wright entre as populações de *P. lineatus*.

	Matriz	Alevinos	População natural
Matriz	0,000		
Alevinos	0,080	0,000	
População natural	0,114	0,101	0,000

Ferreira (2016), em seu trabalho com diversidade e estrutura genética de *P. lineatus* em uma bacia fragmentada por hidrelétricas, encontrou um baixo nível de diferenciação populacional através dos índices de F_{ST} e uma baixa variação molecular (AMOVA) entre as populações, onde a maior variação foi entre os indivíduos (98%).

As análises bayesianas obtidas através do programa Structure, indicam que o número de agrupamentos (K) que deram origem a essas populações foram três (Figura 4). Como se observa, a população de Matriz e a

População Natural apresentam características bem divergentes, e os Alevinos carregam uma caracterização de ambas às populações (Figura 5).

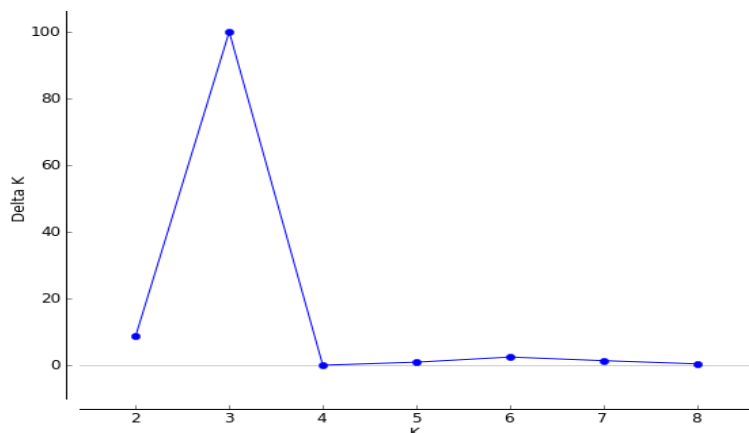


Figura 4. Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno *et al* (2005) para a espécie *P. lineatus*.

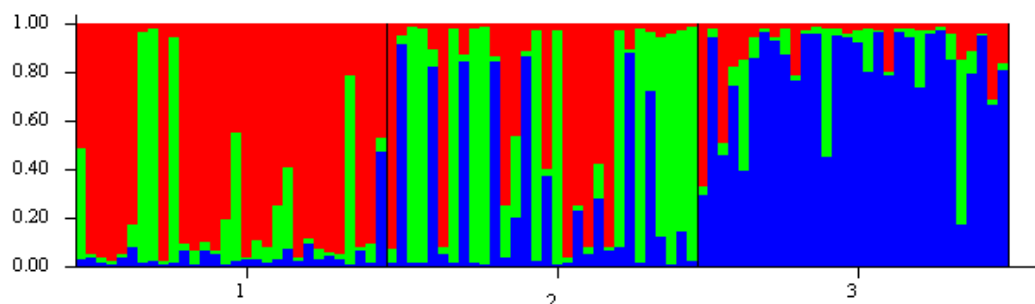


Figura 5. Representação gráfica a partir de $K = 3$ para a espécie *Prochilodus lineatus*. Cada grupo apresenta uma população diferente e as cores representam a probabilidade do coeficiente de ancestralidade da população em cada agrupamento genético. 1 – Matriz; 2 – Alevinos; 3 – População Natural;

Observamos na Figura 5 três agrupamentos demonstrados em três cores no gráfico: azul, verde e vermelho. Na População Natural, observamos principalmente a presença do agrupamento azul; diferente do resultado encontrado na população da Matriz, onde conseguimos perceber a presença principalmente do agrupamento vermelho. E na população de Alevinos percebemos uma mistura das três.

Para a formação do plantel da população de Matrizes deve-se sempre obter indivíduos o mais próximo ou até mesmo da mesma população onde eles serão posteriormente estocados, no entanto no presente estudo não temos a informação da origem deste estoque de matrizes mantida na Estação de Piscicultura e Aquicultura de Salto Grande. Pode não ter sido originalmente adquirido somente indivíduos do rio Paranapanema, demonstrando esta diferença entre as duas populações (Matriz e Natural), e ao gerar essa população de Alevinos e esses serem liberados no rio Paranapanema, poderão por propagar essas diferenças genéticas observadas.

Ferreira (2016) mostra que a espécie *P. lineatus* exibe uma alta variabilidade genética, e por ser um peixe migrador, exibe baixa estruturação. Mesmo com a construção de barragens ao longo do rio Paranapanema, essa espécie consegue manter a sua diversidade genética e uma baixa diferenciação genética. Mesmo com as solturas dos estoques que estão em endogamia, essa espécie na população natural tem conseguido manter a variabilidade genética. No entanto, não sabemos a consequência que os repovoamentos realizados sem o manejo adequado poderão acarretar a longo prazo.

Os dados obtidos através do Structure corroboram com os dados sobre os alelos privados. Por ter sido encontrado alelos privados para esta espécie, mostra-se que alguns indivíduos da Matriz não foram retirados inicialmente do local de soltura, já que apresenta um alelo que não se encontra na População Natural. Outro indicio de que a Matriz não se origina do mesmo local da População Natural é a alta diferenciação encontrada entre essas duas populações através dos índices de F_{ST} .

Rodriguez-Rodriguez et al (2013) mostram que introduções de estoques que são geneticamente diferentes da população selvagem podem causar uma perda na integridade genética da população, podendo aumentar a suscetibilidade a doenças e diminuir a resposta do indivíduo as mudanças de habitat.

Com relação às análises de parentesco de *P. lineatus*, para a população de Matriz, 7% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 15% como meio irmãos e 78% não estão relacionados (Figura 6). Foi encontrada apenas uma família para a Matriz, englobando os 30 indivíduos dessa população (Tabela 8). Dentre esses indivíduos, 7 foram identificados como irmãos completos e 77 como meio irmão (Figura 7) em uma análise feita par-a-par, onde todos os indivíduos são comparados entre si.

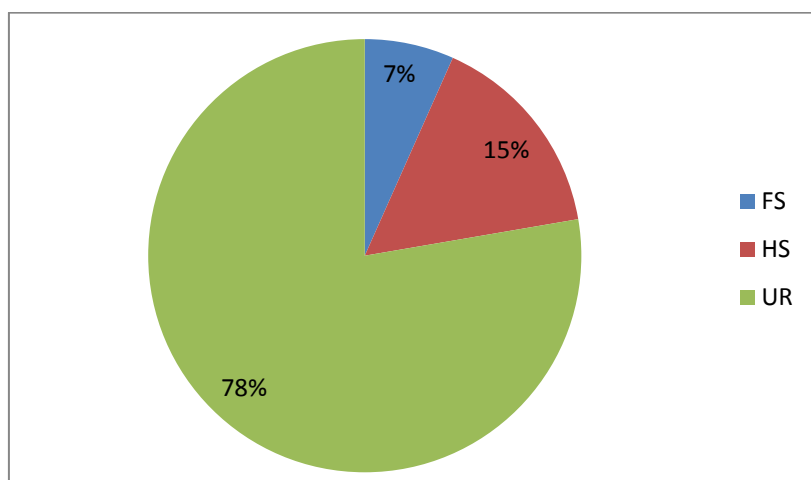


Figura 6. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Matriz de *Prochilodus lineatus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 8. Reconstrução de parentesco da população de Matriz da espécie *Prochilodus lineatus*.

Amostra	Pai	Mãe	Família
M1	*1	#1	1
M2	*2	#2	1
M3	*2	#3	1
M4	*3	#4	1
M5	*3	#4	1
M6	*4	#2	1
M7	*5	#5	1
M8	*6	#5	1
M9	*2	#4	1
M10	*7	#1	1
M11	*8	#2	1
M12	*9	#6	1
M13	*10	#3	1
M14	*8	#2	1
M15	*11	#6	1
M16	*1	#5	1
M17	*2	#7	1
M18	*7	#2	1
M19	*9	#1	1
M20	*3	#5	1
M21	*10	#3	1
M22	*9	#2	1
M23	*10	#6	1
M24	*3	#3	1
M25	*12	#6	1
M26	*9	#2	1
M27	*7	#1	1
M28	*3	#7	1
M29	*7	#1	1
M30	*3	#8	1

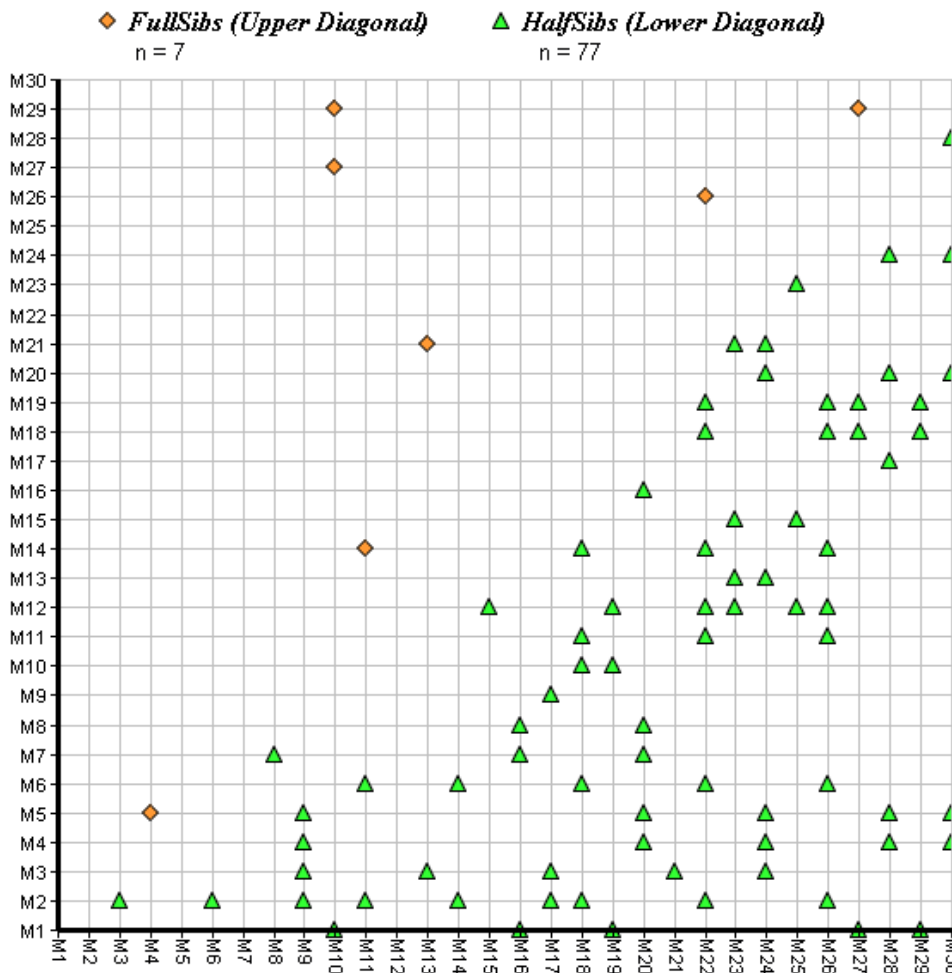


Figura 7. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Matrizes da espécie *Prochilodus lineatus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Para a população de Alevinos, 11% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 16% como meio irmãos e 73% não estão relacionados (Figura 8). Foram encontradas três famílias para os Alevinos, onde na família 1 observamos 6 indivíduos, 22 indivíduos na família 2 e dois indivíduos na família três (Tabela 9). Dentre esses indivíduos, 8 foram identificados como irmãos completos e 69 como meio irmão (Figura 9).

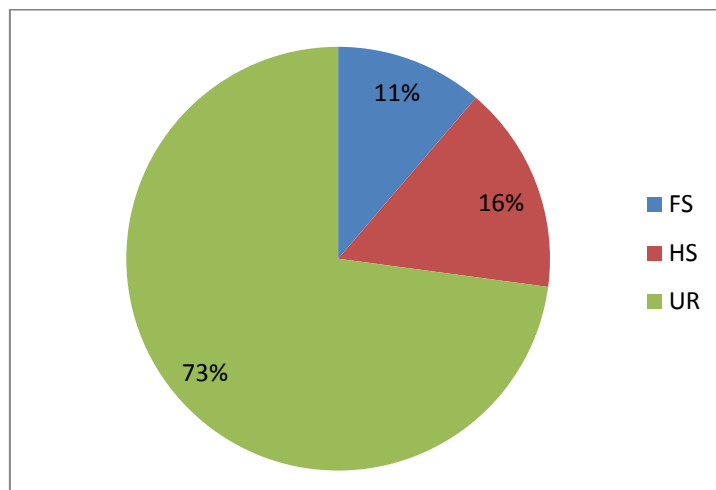


Figura 8. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Alevinos de *Prochilodus lineatus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 9. Reconstrução de parentesco da população de alevinos da espécie *Prochilodus lineatus*.

Amostra	Pai	Mãe	Família
A1	*1	#1	1
A6	*1	#1	1
A14	*8	#1	1
A18	*1	#1	1
A21	*10	#1	1
A22	*11	#1	1
A2	*2	#2	2
A3	*3	#3	2
A4	*3	#4	2
A7	*3	#6	2
A8	*5	#2	2
A9	*3	#3	2
A10	*3	#4	2
A12	*6	#2	2
A13	*7	#2	2
A15	*3	#7	2
A16	*2	#2	2
A17	*7	#7	2
A19	*5	#2	2
A20	*9	#8	2
A23	*7	#9	2
A24	*12	#2	2
A25	*7	#10	2
A26	*7	#11	2
A27	*9	#10	2
A28	*3	#12	2
A29	*9	#4	2
A30	*13	#3	2
A5	*4	#5	3
A11	*4	#5	3

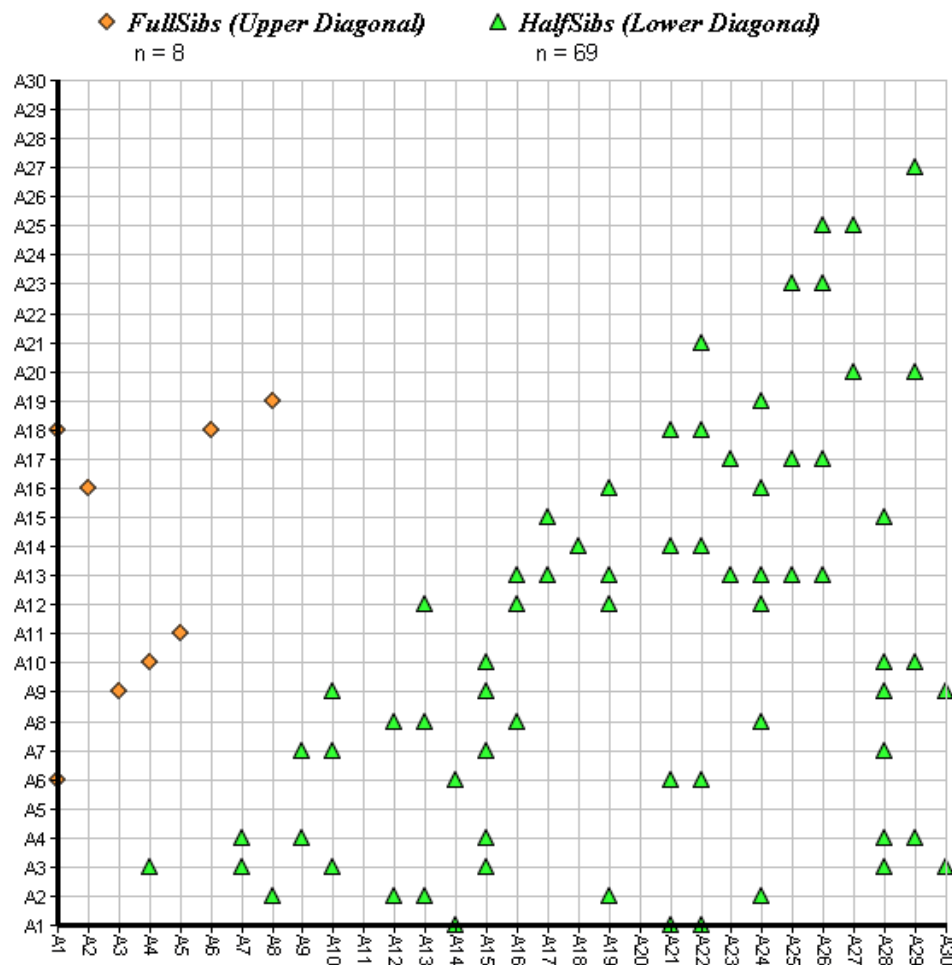


Figura 9. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Alevinos da espécie *Prochilodus lineatus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Para a População Natural, 8% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 18% como meio irmãos e 74% não estão relacionados (Figura 10). Foram encontradas três famílias para a População Natural, onde na família um e três encontramos apenas 1 indivíduo e 28 indivíduos na família dois (Tabela 10). Dentre esses indivíduos, 3 foram identificados como irmãos completos e 67 como meio irmãos (Figura 11).

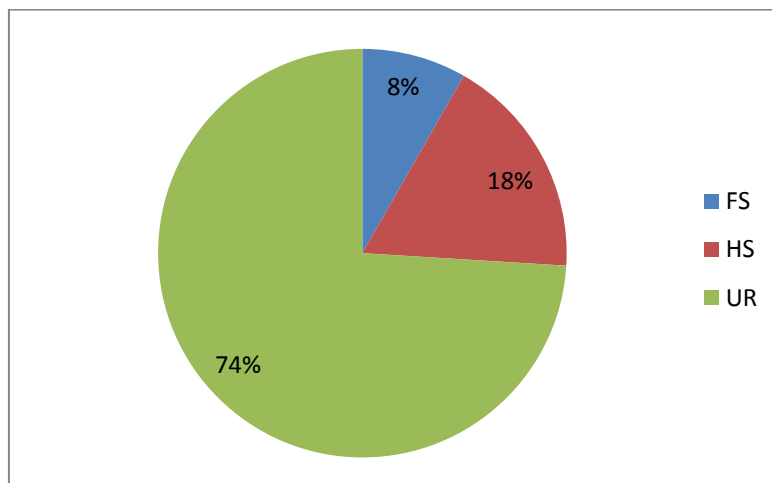


Figura 10. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população Natural de *Prochilodus lineatus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 10. Reconstrução de parentesco da População Natural da espécie *Prochilodus lineatus*

Amostra	Pai	Mãe	Família
N1	*1	#1	1
N2	*2	#2	2
N3	*3	#3	2
N4	*2	#4	2
N6	*5	#6	2
N7	*6	#7	2
N8	*7	#8	2
N9	*8	#6	2
N10	*7	#9	2
N11	*2	#6	2
N12	*6	#2	2
N13	*8	#10	2
N14	*2	#2	2
N15	*5	#7	2
N16	*7	#2	2
N17	*8	#7	2
N18	*6	#10	2
N19	*5	#11	2
N20	*9	#6	2
N21	*10	#7	2
N22	*8	#10	2
N23	*7	#9	2
N24	*11	#6	2
N25	*10	#12	2
N26	*8	#13	2
N27	*10	#13	2
N28	*5	#9	2
N29	*7	#3	2
N30	*2	#12	2
N5	*4	#5	3

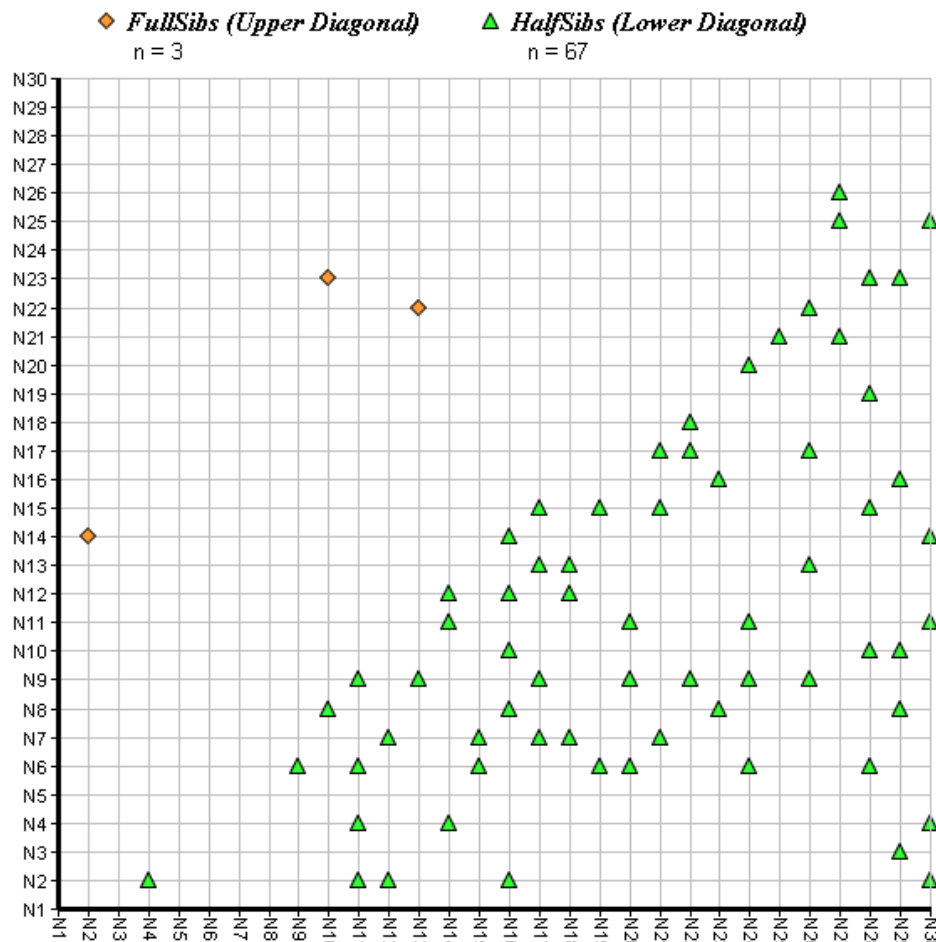


Figura 11. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população Natural da espécie *Prochilodus lineatus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Nas três populações se encontra uma maior proporção de indivíduos não relacionados. Os números de famílias variaram de um a três, e foram encontrados até 13 progenitores para as populações. Esse número de progenitores não é o ideal para ser encontrado em práticas de repovoamento, pois ela infere que: i) o número de parentais é baixo, fazendo com que todos acabem pertencendo à mesma família – conforme observado na população de Matriz; ii) apenas alguns indivíduos estão se reproduzindo.

Mendonça (2014) mostra que é necessário uma maior quantidade de indivíduos não relacionados para a montagem de estoques,

minimizando assim a perda de variabilidade genética dos estoques, que podem acabar garantindo seu maior potencial adaptativo.

5.2 *Piaractus mesopotamicus*

Na espécie *Piaractus mesopotamicus*, dentre as 83 amostras distribuídas nas três populações, encontrou-se 29 alelos no total em 7 locos analisados. Tanto na população de Matriz quanto na População Natural, foram encontrados 27 alelos, e na população de Alevinos, 26 alelos (Tabela 11).

Nesta espécie encontrou-se um número de alelos abaixo do que encontrado na descrição dos oito locos de primers por Calcagnotto et al (2001), onde os autores descrevem para os mesmos locos que utilizados no presente trabalho mais de 40 alelos.

Na população de Matriz e na de Alevinos, o loco que apresentou um maior número de alelos foi o Pme4 (6 alelos), e na População Natural, o loco Pme28 (6 alelos) (Tabela 11). Suganuma (2008), em um estudo sobre a diversidade genética de *P. mesopotamicus* na região do Pantanal, obteve um número de alelos variando de 5 a 10 para Pme4 e de 4 a 12 para Pme28. Os resultados encontrados neste estudo (5 e 6 alelos), se mostra próximo do número mínimo de alelos observado pelo referido autor.

Dois locos apresentaram desvios significativos no Equilíbrio de Hardy-Weinberg na população de Matriz, um na população de Alevinos e na População Natural (Tabela 11).

Os resultados obtidos através do programa MICRO-CHECKER não mostrou indicativo de alelos nulos.

Tabela 11. Diversidade genética de *P. mesopotamicus* encontradas nos locos das três populações analisadas. N – número de indivíduos analisados; Na – número de alelos; Ne – número de alelos efetivos; Ho – heterozigotidade observada; He – heterozigotidade esperada; EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} – coeficiente de endogamia

	Locus	N	Na	Ne	Ho	He	EHW	F_{IS}
Matriz	Pme4	21	6	3,500	0,667	0,714	0,210	0,067
	Pme5	22	3	2,527	0,636	0,604	0,226	-0,053
	Pme14	23	4	2,310	0,565	0,567	0,159	0,003
	Pme20	23	2	1,734	0,522	0,423	0,621	-0,232
	Pme21	23	3	1,715	0,043	0,417	0,000*	0,896
	Pme28	16	5	2,798	0,688	0,643	0,629	-0,070
	Pme32	22	4	2,652	0,455	0,623	0,046*	0,270
Alevinos	Pme4	30	6	4,639	0,233	0,784	0,000*	0,703
	Pme5	30	3	2,995	0,533	0,666	0,070	0,199
	Pme14	30	4	1,827	0,400	0,453	0,468	0,117
	Pme20	30	3	1,861	0,600	0,463	0,181	-0,297
	Pme21	30	2	1,069	0,067	0,064	1,000	-0,034
	Pme28	29	5	2,822	0,655	0,646	0,487	-0,015
	Pme32	30	3	2,062	0,600	0,515	0,751	-0,165
População natural	Pme4	29	5	3,482	0,379	0,713	0,000*	0,468
	Pme5	30	3	2,715	0,500	0,632	0,159	0,208
	Pme14	30	4	2,267	0,533	0,559	0,858	0,046
	Pme20	30	3	2,062	0,533	0,515	0,748	-0,036
	Pme21	29	3	1,324	0,276	0,245	1,000	-0,126
	Pme28	29	6	3,885	0,828	0,743	0,158	-0,114
	Pme32	30	3	1,411	0,333	0,291	1,000	-0,145

*- significativo ao nível de 5%.

Foram observados dois alelos privados, uma para a população de Matriz (Pm32) e outro para a População Natural (Pm28), com uma frequência de 18,2% e 6,95, respectivamente (Tabela 12).

Tabela 12. Alelos privados para a espécie *P. mesopotamicus*.

População	Locos	Alelo	Frequência
Matriz	Pme32	262	0,182
População natural	Pme28	225	0,069

Teoricamente, os indivíduos da Matriz deveriam ser retirados originalmente do mesmo local onde os alevinos serão introduzidos posteriormente. *P. lineatus* e *P. mesopotamicus* apresentaram alelos privados em sua Matriz, alelos que não foram encontrados na População Natural pertencente ao rio Paranapanema. Este pode ser um indício que os indivíduos que compõem a população de Matriz podem ter sido retirados de outras bacias hidrográficas e/ou de outras populações de cativeiros, mostrando assim a falta de um manejo e cuidado genético correto com essas espécies.

A heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,441 a 0,511 e se apresentou maior na população de Matriz. A heterozigosidade esperada (H_e) variou de 0,513 a 0,570 sendo maior que a heterozigosidade observada nas três populações. Pode-se observar também que as três populações apresentaram índices significativos de endogamia (F_{IS}) (Tabela 13).

Tabela 13. Média da diversidade genética de *P. mesopotamicus* encontradas nas três populações analisadas. N_a – número de alelos; N_e – número de alelos efetivos; H_o – heterozigosidade observada; H_e – heterozigosidade esperada; F_{IS} – coeficiente de endogamia

População	N	N_a	N_e	H_o	H_e	F_{IS}
Matriz	21,429	3,857	2,462	0,511	0,570	0,13167
Alevinos	29,857	3,714	2,468	0,441	0,513	0,19028
População natural	29,571	3,857	2,449	0,483	0,528	0,14057

Os valores de H_o se mostram mais baixo quando comparado a outros estudos com populações naturais e populações de programas de repovoamento, tal como observado por Lopera-Barrero et al (2010), onde obtiveram para a espécie *P. mesopotamicus* um valor de heterozigosidade média observada e esperada acima de 0,7 tanto para a População Natural, estoque e progênie.

Nas populações de cativeiro, um dos indícios da diminuição de variabilidade genética é o aparecimento de endogamia pela falta de manejo reprodutivo adequado, sendo muitas vezes selecionados indivíduos grandes e de boa aparência, sem preocupação com a sua variabilidade genética (Lopera-Barrero et al., 2008). Nos nossos dados observamos valores significativos de endogamia (F_S) não só para as populações de cativeiro, mas também, para a População Natural.

Através do programa Bottleneck, se observa que nos três modelos, IAM, TPM e SMM não houve valores significativos para excesso de heterozigotidade esperada e todas as populações mostraram a ausência de gargalo genético recente para essa espécie (Tabela 14).

Tabela 14. Testes de gargalos genéticos recentes (Bottleneck) para a espécie *P. mesopotamicus* nas três populações analisadas. Teste de *Wilcoxon sign-rank* para excesso de heterozigotos. He – número de loco exibindo excesso de heterozigotidade; Hd – número de loco exibindo déficit de heterozigotidade.

	IAM			TPM			SMM		
	He	Hd	P	He	Hd	P	He	Hd	P
Matriz	5	2	0,054	4	3	0,765	6	1	0,992
Alevino	3	4	0,593	4	3	0,851	5	2	0,988
População natural	3	4	0,289	4	3	0,945	6	1	0,992

Povh et al (2011) analisaram uma população de reprodutores de *P. mesopotamicus* do rio Paranapanema utilizando microssatélites e observaram um índice significativo mostrando que ocorreu um gargalo genético recente nos reprodutores, diminuindo o número de heterozigotos, sofrendo uma redução no número de alelos. Neste trabalho, no entanto, não foi observado um número significativo para P, mostrando a ausência de gargalo genético para essa espécie.

A maior variação encontrada quando se observa os dados obtidos pela AMOVA é entre os indivíduos analisados, com valores de 81,44%, enquanto a variação entre as populações foi de 3,54%, sendo essa a menor variação encontrada. A variação encontrada entre os indivíduos da mesma população foi de 15,02% (Tabela 15).

Tabela 15. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações analisadas de *P. mesopotamicus*, mostrando o componente de variação e a porcentagem de variação entre as populações, entre indivíduos dentro da população e entre os indivíduos.

Tipos de Variação	Componentes de variação	Porcentagem da variação(%)
Entre populações	0,05584	3,54
Entre indivíduos dentro da população	0,23661	15,02
Entre indivíduos	1,28313	81,44

O menor valor de F_{ST} par a par encontrado foi entre a população de Matriz e a população de Alevinos e entre a população de Alevinos e a População Natural, sendo classificado como uma pequena diferenciação genética. Entre a Matriz e a População Natural houve uma variação um pouco maior, sendo classificada como uma diferenciação genética moderada (Tabela 16).

Tabela 16. Diferenciação genética, F_{ST} par a par, baseado nas estatísticas F de Wright obtida para as amostras de *P. mesopotamicus*.

	Matriz	Alevinos	População natural
Matriz	0,000		
Alevinos	0,036	0,000	
População natural	0,052	0,028	0,000

Suganuma (2008) ao analisar a diversidade genética de *P. mesopotamicus* também observou uma baixa diferenciação genética para as populações analisadas. Para esta espécie, os dados encontrados no presente trabalho correspondem ao encontrados na literatura, visto que houve uma baixa diferenciação genética.

A partir das Análises Bayesianas obtidas pelo programa Structure, o número de agrupamentos (K) que deram origem as populações foram duas (Figura 12). Como se observa, as três populações apresentam características semelhantes entre elas, não havendo discrepância entre os indivíduos (Figura 13).

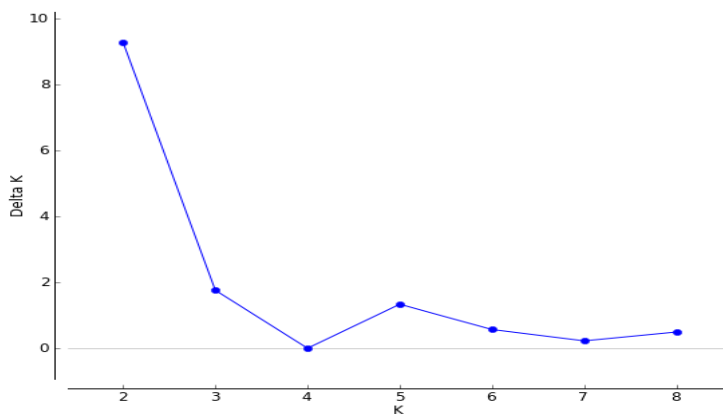


Figura 12. Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno *et al* (2005) para a espécie *P. mesopotamicus*.

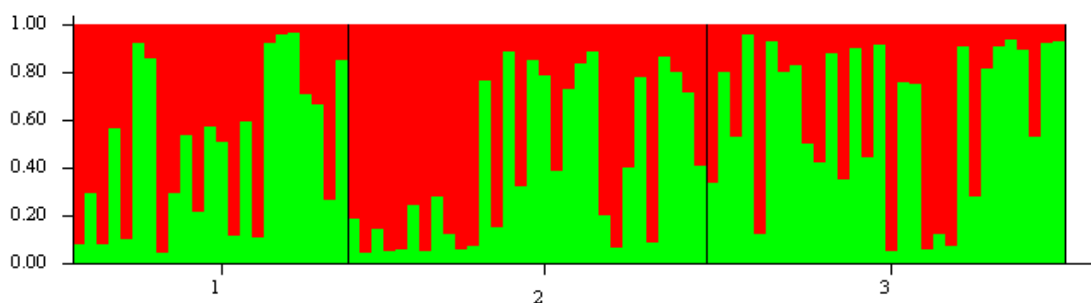


Figura 13. Representação gráfica a partir de $K = 2$ para a espécie *P. mesopotamicus*. Cada grupo apresenta uma população diferente e as cores representam a probabilidade do coeficiente de ancestralidade da população em cada agrupamento genético. 1 – Matriz; 2 – Alevinos; 3 – População Natural.

A maior diferença encontrada em *P. mesopotamicus* foi também entre a população da Matriz e a População Natural. No entanto, quando analisado o gráfico demonstrado no Structure, não vemos diferenciação estrutural visível, diferente do observado em *P. lineatus*.

Esses peixes são migradores, mas apresentam uma baixa variabilidade genética, podendo estar mais sensíveis a mudanças climáticas, de habitat e modificações causadas pelo homem. Essa baixa variabilidade genética também foi observada no trabalho de Lopera-Barrero et al (2007). Com a introdução na população natural de indivíduos endogâmicos provenientes das pisciculturas, essa variação pode decair ainda mais, podendo levar a uma diminuição de adaptação ao ambiente em longo prazo, perda de resistência a doenças, prejudicando no crescimento e reprodução dessa espécie em seu habitat natural (Povh et al., 2007).

Na análise de parentesco entre os indivíduos de cada população a da Matriz apresentou 17% dos indivíduos identificados como irmãos completos, 9% como meio irmãos e 74% não estão relacionados (Figura 14). Foram encontradas três famílias para a Matriz, 16 indivíduos para a família um, 6 para a família dois e 1 indivíduo para a família três (Tabela 17). Dentre esses indivíduos, 12 foram identificados como irmãos completos e 47 como meio irmãos (Figura 15).

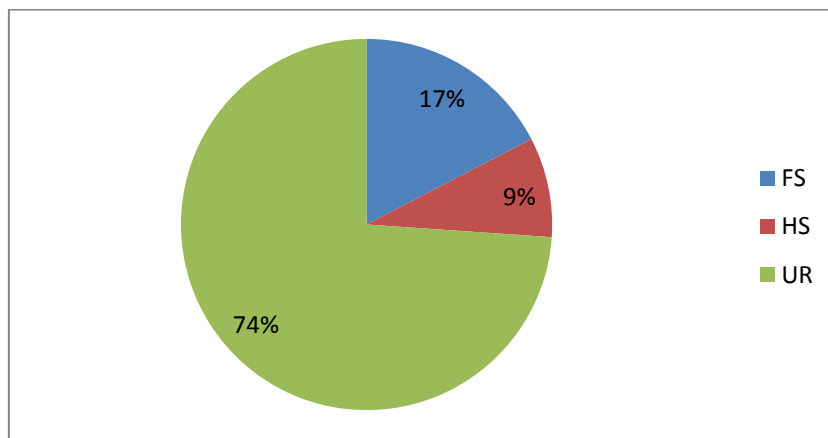


Figura 14. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Matriz de *P. mesopotamicus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 17. Reconstrução de parentesco da população de Matriz da espécie *Piaractus mesopotamicus*

Amostra	Pai	Mãe	Família
M1	*1	#1	1
M2	*2	#2	1
M4	*1	#2	1
M5	*2	#2	1
M6	*3	#2	1
M9	*3	#1	1
M10	*2	#2	1
M13	*5	#5	1
M14	*2	#2	1
M15	*2	#2	1
M17	*3	#6	1
M18	*3	#7	1
M19	*1	#5	1
M20	*3	#5	1
M26	*8	#5	1
M28	*2	#1	1
M7	*4	#3	2
M8	*4	#4	2
M21	*6	#3	2
M22	*4	#3	2
M23	*7	#3	2
M27	*4	#4	2
M29	*9	#8	3

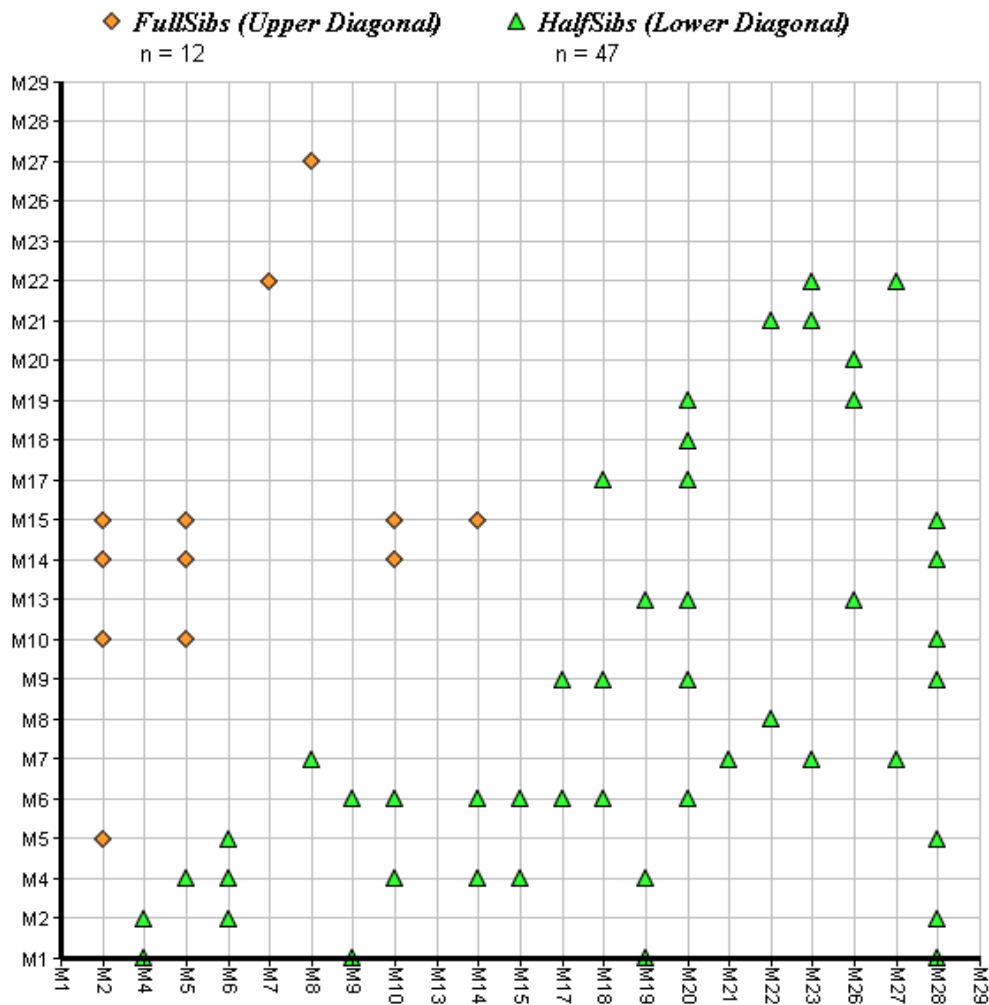


Figura 15. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Matriz da espécie *P. mesopotamicus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Para os Alevinos, 10% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 11% como meio irmãos e 79% não estão relacionados (Figura 16). Foi encontrada uma família para essa população, agrupando os 30 indivíduos (Tabela 18). Dentre esses indivíduos, 6 foram identificados como irmãos completos e 97 como meio irmão (Figura 17).

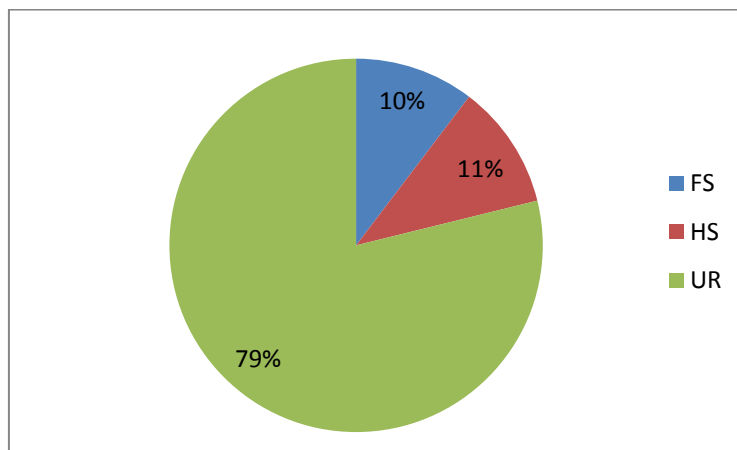


Figura 16. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Alevinos de *P. mesopotamicus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 18. Reconstrução de parentesco da população de Alevinos da espécie *Piaractus mesopotamicus*.

Amostra	Pai	Mãe	Família
A1	*1	#1	1
A2	*2	#2	1
A3	*2	#3	1
A4	*3	#2	1
A5	*4	#2	1
A6	*4	#4	1
A7	*2	#2	1
A8	*5	#2	1
A9	*3	#5	1
A10	*4	#4	1
A11	*4	#6	1
A12	*1	#6	1
A13	*5	#5	1
A14	*1	#7	1
A15	*5	#5	1
A16	*4	#8	1
A17	*6	#6	1
A18	*4	#8	1
A19	*3	#7	1
A20	*4	#9	1
A21	*4	#8	1
A22	*7	#5	1
A23	*4	#5	1
A24	*1	#10	1
A25	*1	#11	1
A26	*8	#2	1
A27	*9	#9	1
A28	*8	#6	1
A29	*3	#6	1
A30	*4	#12	1

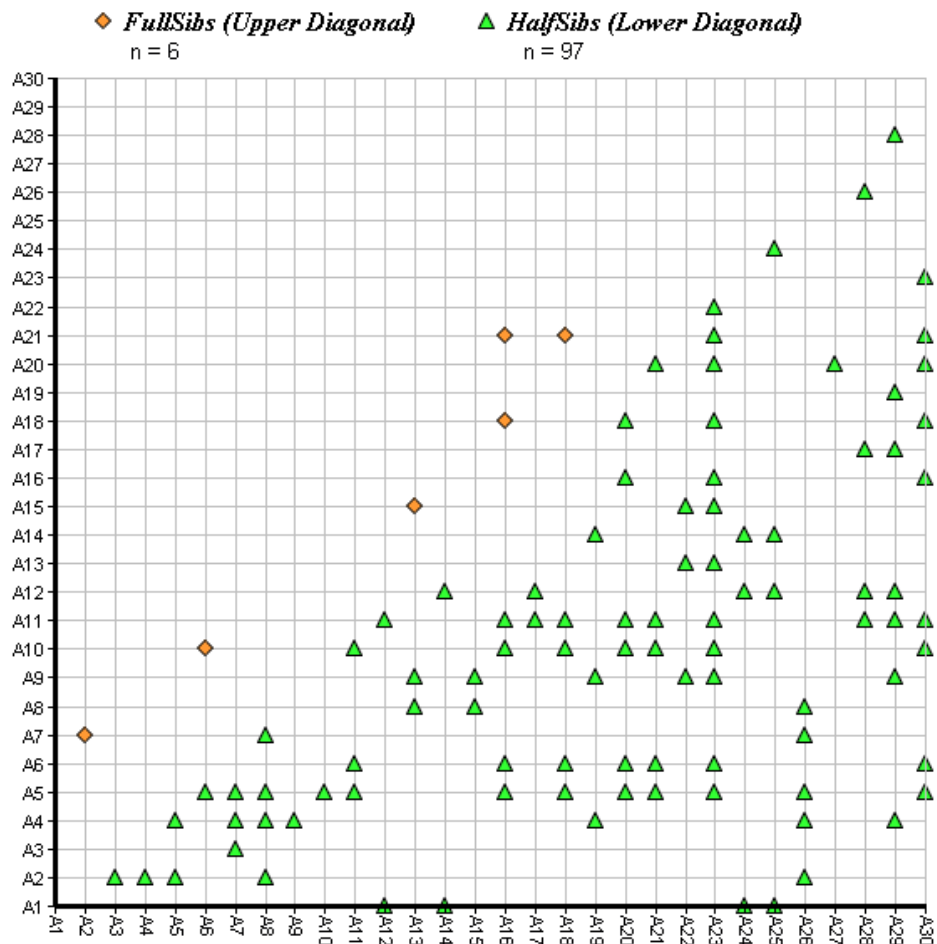


Figura 17. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Alevinos da espécie *P. mesopotamicus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Para a População Natural, 12% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 11% como meio irmãos e 77% não estão relacionados (Figura 18). Foram encontradas duas famílias para essa população, onde 29 indivíduos pertencem a família um e apenas 1 indivíduo na família dois (Tabela 19). Dentre esses indivíduos 5 foram identificados como irmãos completos e 76 como meio irmão (Figura 19).

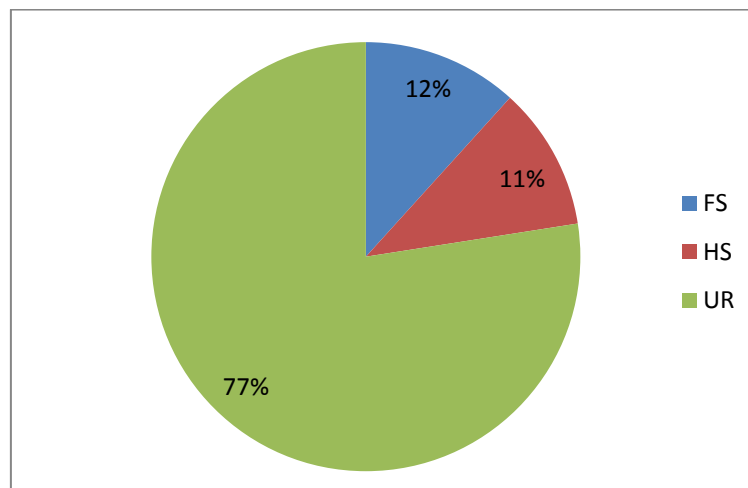


Figura 18. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população Natural de *P. mesopotamicus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 19. Reconstrução de parentesco da População Natural da espécie *Piaractus mesopotamicus*.

Amostra	Pai	Mãe	Família
N1	*1	#1	1
N2	*2	#2	1
N3	*3	#3	1
N4	*4	#4	1
N5	*3	#5	1
N6	*5	#2	1
N7	*1	#6	1
N8	*6	#5	1
N9	*3	#2	1
N10	*3	#3	1
N11	*5	#4	1
N12	*1	#7	1
N13	*7	#8	1
N14	*5	#9	1
N15	*7	#1	1
N16	*3	#7	1
N17	*6	#10	1
N18	*5	#11	1
N19	*3	#10	1
N20	*1	#9	1
N21	*3	#9	1
N22	*2	#3	1
N23	*7	#7	1
N24	*5	#2	1
N26	*2	#4	1
N27	*2	#4	1
N28	*1	#7	1
N29	*6	#8	1
N30	*6	#8	1
N25	*8	#12	2

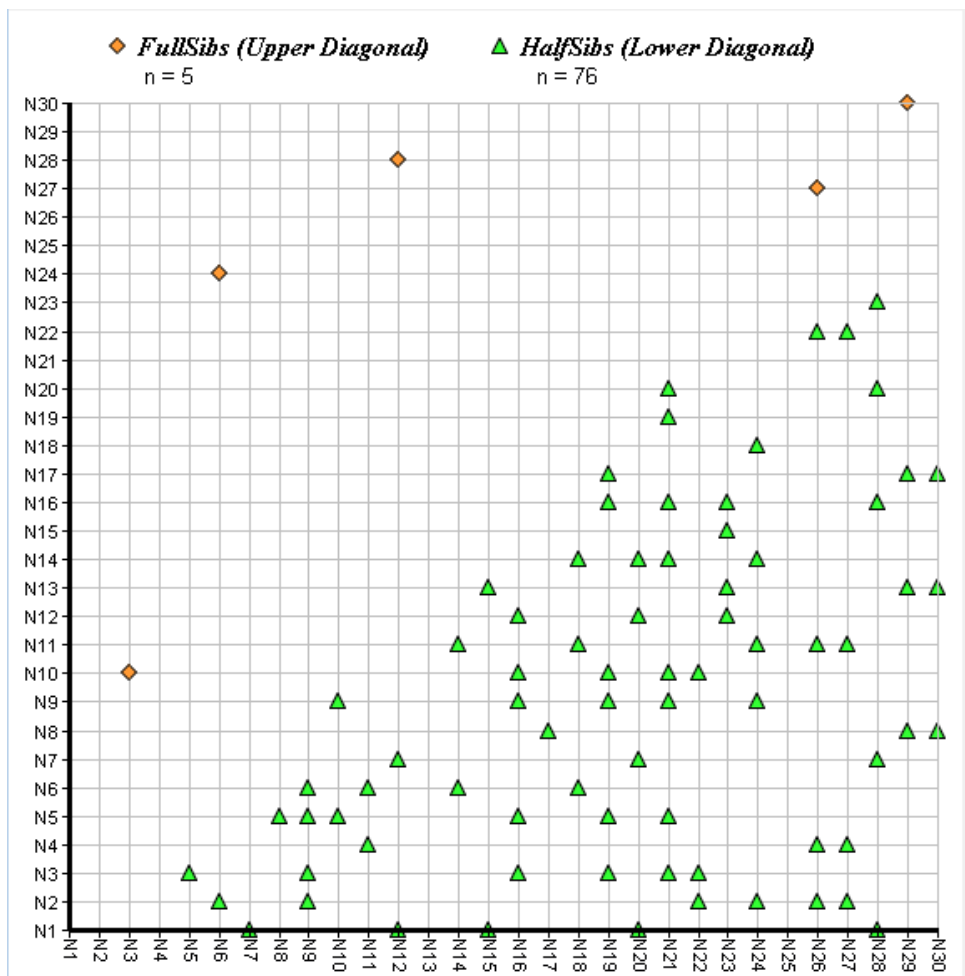


Figura 19. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população Natural da espécie *P. mesopotamicus*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

O número de famílias variaram de um a três para *P. mesopotamicus*, no entanto poucos os indivíduos que pertenciam a cada uma das famílias distintas. Em análises de parentesco da espécie *Piaractus brachypomus* feito por Jorge (2016) em quatro pisciculturas (duas em Tocantins e duas em São Paulo) observaram que os estoques da região sudeste apresentaram um maior nível de parentesco entre os indivíduos, sugerindo um manejo melhor nas pisciculturas de Tocantins.

Indivíduos com alto grau de parentesco não são viáveis para conservação, pois podem apresentar proles com baixa variabilidade genética, depressão endogâmica (Lopera-Barrero, 2008) e deformidades na progênie

(Lopes, 2014). Podemos observar no presente estudo que dentre os 30 indivíduos da população de alevinos desta espécie, foram encontrados apenas 7 mães diferentes e todos pertencentes a mesma família, mostrando que na Matriz poucos indivíduos estão sendo utilizados para a reprodução.

5.3 *Salminus brasiliensis*

Entre os 90 indivíduos analisados da espécie *Salminus brasiliensis*, foram obtidos 19 alelos. Na População Natural foram encontrados 18 alelos, na população de Matriz 17 alelos e na de Alevinos 16. Tanto na População Natural quanto na população de Matriz, o loco que apresentou o maior número de alelos foi o Sm25, sendo observados 7 e 6 alelos respectivamente. Na população de alevinos, tanto no loco Sm25 quanto no Sm37 foram encontrados 4 alelos (Tabela 20). Nessa espécie foi observado apenas um alelo privado encontrado na População Natural, no loco Sm25 com uma frequência de 15%.

Segundo Rueda et al. (2011a), o loco Sm25 foi um dos locos mais polimórficos, assim como no presente estudo, onde o número de alelos encontrados pelo autor variou de 2 a 9, dependendo do local da coleta.

Salminus brasiliensis foi à espécie que apresentou o menor número de alelos dentre as três espécies estudadas (apenas 19), um valor extremamente baixo se comparado ao estudo da descrição de primer para esta espécie realizado por Rueda et al. (2011a), que descreve oito locos, e obteve mais de 50 alelos para os locos. Esse baixo valor é um indicativo da perda de variabilidade genética observada para estas populações, podendo levar essa espécie a homozigose e prejuízos futuros.

Na população de Matriz e na população de Alevinos, dois locos não apresentaram desvios significativos no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 20). Na População Natural, nenhum loco apresentou desvios significativos. Os resultados obtidos através do programa MICRO-CHECKER não mostrou indicativo de alelos nulos.

Tabela 20. Diversidade genética de *S. brasiliensis* encontradas nas três populações analisadas. N – número de indivíduos analisados; Na – número de alelos; Ne – número de alelos efetivos; Ho – heterozigotidade observada; He – heterozigotidade esperada; EHW – Equilíbrio de Hardy-Weinberg; F_{IS} – coeficiente de endogamia.

Pop	Locus	N	Na	Ne	Ho	He	EHW	F_{IS}
Matriz	Sm10	26	1	1,000	0,000	0,000	----	----
	Sm16	30	3	2,643	0,600	0,622	0,242	0,035
	Sm17	29	2	1,991	0,586	0,498	0,464	-0,178
	Sm23	27	2	2,000	1,000	0,500	0,000*	-1,000
	Sm25	28	6	3,853	0,643	0,740	0,019*	0,132
	Sm37	27	3	2,418	0,407	0,586	0,019*	0,305
Alevinos	Sm10	30	1	1,000	0,000	0,000	----	----
	Sm16	30	3	2,103	0,667	0,524	0,012*	-0,271
	Sm17	28	2	1,690	0,357	0,408	0,643	0,125
	Sm23	30	2	1,069	0,067	0,064	1,000	-0,034
	Sm25	18	4	3,834	0,667	0,739	0,034*	0,098
	Sm37	29	4	2,282	0,414	0,562	0,049*	0,263
População natural	Sm10	30	1	1,000	0,000	0,000	----	----
	Sm16	29	3	2,910	0,724	0,656	0,926	-0,103
	Sm17	30	2	1,965	0,333	0,491	0,132	0,321
	Sm23	28	1	1,000	0,000	0,000	----	----
	Sm25	30	7	5,158	0,767	0,806	0,217	0,049
	Sm37	30	4	2,317	0,500	0,568	0,705	0,120

*Significativo ao nível de 5%

A heterozigotidade observada média (Ho) variou de 0,362 a 0,539 e se apresentou maior na população da Matriz, onde a heterozigotidade observada apresentou-se maior que a esperada. A heterozigotidade esperada média (He) variou entre 0,383 a 0,4921, e foi maior que a observada na

população de Alevinos e na População Natural. Pode-se observar que as três populações apresentaram índices significativos de endogamia (F_{IS}) (Tabela 21).

Quando observado os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), vários locos analisados nas três espécies não apresentam desvios significativos. Esses locos estão seguindo a frequência esperada e provavelmente se encontram livre de processos evolutivos. Já os desvios significativos, que ocorreram nos demais locos observados, são comuns em análises de microssatélites. Eles podem ser resultados de diversos fatores, como erros de duplicação da DNA polimerase, presença de alelos nulos, excesso de heterozigotos e endogamia (Perini, 2013).

Os valores de F_{IS} podem estar correlacionados com os desvios significativos do EHW, pois ambos levam em consideração o número de heterozigotos na população. Quando uma população sofre o processo de endogamia, o número de heterozigotos tende a aumentar, saindo do EHW (Calcagnotto e Desalle, 2009).

Tabela 21. Média da diversidade genética de *S. brasiliensis* encontradas nas três populações analisadas. Na – número de alelos; Ne – número de alelos efetivos; Ho – heterozigotidade observada; He – heterozigotidade esperada; F_{IS} – coeficiente de endogamia

População	N	Na	Ne	Ho	He	F_{IS}
Matriz	27,833	2,833	2,317	0,539	0,491	0,03508
Alevinos	27,500	2,667	1,996	0,362	0,383	0,02051
População natural	29,500	3,000	2,392	0,387	0,420	0,10017

Em *P. mesopotamicus* e *S. brasiliensis* foram encontrados valores positivos para F_{IS} não somente nas espécies em cativeiro, mas também na População Natural. A redução de homozigotos, causando a endogamia, tem sido observada em populações naturais e diversos fatores podem explicar esse

déficit, como o efeito de Wahlund (Henriques, 2014), alelos nulos, erros de genotipagem, acasalamento não aleatório, quebra do fluxo gênico e a introdução de alevinos endogâmicos, diminuindo assim o número de alelos da População Natural (Lopes, 2008).

Utilizando os três modelos de análise de gargalo genético, IAM, TPM e SMM, observa-se que os valores encontrados para a População Natural no modelo IAM e TPM estão bem próximos ao gargalo (Tabela 22).

Tabela 22. Testes de gargalos genéticos recentes (Bottleneck) para as amostras de *S. brasiliensis* nas três populações analisadas. Teste de *Wilcoxon sign-rank* para excesso de heterozigotos. He – número de loco exibindo excesso de heterozigozidade; Hd – número de loco exibindo déficit de heterozigozidade.

	IAM			TPM			SMM		
	He	Hd	P	He	Hd	P	He	Hd	P
Matriz*	1	5	0,078	3	3	0,421	3	3	0,781
Alevinos*	1	4	0,078	1	4	0,109	3	2	0,5
População natural**	0	4	0,051	0	4	0,051	2	2	0,156

*um loco monomórfico; **dois locos monomórficos

Os dados do Bottleneck mostram índices significativos de deficiência de heterozigozidade, sugerindo que esta espécie passou por uma redução do seu tamanho original, podendo assim ter perdido uma quantidade considerável de alelos (Nunes, 2015). O excesso de homozigozidade causa perda de alelos e diminuição da variabilidade genética, como amostrado por Lopera-Barrero et al (2015) em seu estudo, e confirmado no presente trabalho. Nunes (2015) também observa em seu estudo que em ambientes naturais degradados existe uma perda de diversidade genética, mesmo se tratando de uma espécie migradora de longas distancias, explicando assim o baixo valor de P encontrado para a População Natural.

A maior variação encontrada quando se observa os dados obtidos pela AMOVA é entre os indivíduos analisados (83,35%), enquanto a variação entre as populações foi de 11,87%. A variação encontrada entre os indivíduos da mesma população foi de 4,77%, sendo essa a menor variação encontrada (Tabela 23).

Tabela 23. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as populações analisadas de *S. brasiliensis*, mostrando o componente de variação e a porcentagem de variação entre as populações, entre indivíduos dentro da população e entre os indivíduos.

Tipos de Variação	Componentes de variação	Porcentagem da variação(%)
Entre populações	0,10603	11,87
Entre indivíduos dentro da população	0,04262	4,77
Entre indivíduos	0,74444	83,35

O menor valor de F_{ST} par a par foi entre a população de Matriz e a População Natural, classificado como uma pequena diferenciação genética. Já os valores encontrados entre a população de Matriz e a população de Alevinos e entre a população de Alevinos e a População Natural indicou uma grande diferenciação genética (Tabela 24).

Tabela 24. Diferenciação genética, F_{ST} par a par, baseado nas estatísticas F de Wrigth obtida para a espécie *S. brasiliensis*.

	Matriz	Alevinos	População natural3
Matriz	0,000		
Alevinos	0,167	0,000	
População natural	0,002	0,175	0,000

Lopes et al (2007) aborda a estruturação genética desta espécie nas escadas de transposição de peixes de Canoas I e II através de marcadores RAPD. Em um período de dois anos de coletas, o valor de F_{ST} encontrado foi baixo e não mostrou diferenciação populacional. O maior valor de AMOVA também foi encontrado entre indivíduos. Os valores encontrados no presente trabalho discordam da literatura quando se trata de nível de diferenciação populacional, visto que esta espécie apresenta uma alta diferenciação, mostrando a perda de variabilidade genética, no entanto os trabalhos de literatura são de espécimes da população natural e no presente estudo a comparação dos lotes de alevinos e matriz com a população natural.

O resultado obtido no presente estudo é preocupante uma vez que este lote de alevinos que apresentou uma grande diferenciação genética com a população natural será solto no rio e poderá se reproduzir com indivíduos dessa população natural, podendo levar a longo prazo na perda da variabilidade genética e/ou perda da capacidade adaptativa.

A partir das Análises Bayesianas obtidas no Structure, o número de agrupamentos (k) que deram origem a essa população foram duas (Figura 20). Como se observa, a população de Matriz e a População Natural apresentam características semelhantes, onde a população de Alevinos apresenta um grupamento diferente do observado nas outras duas populações (Figura 21).

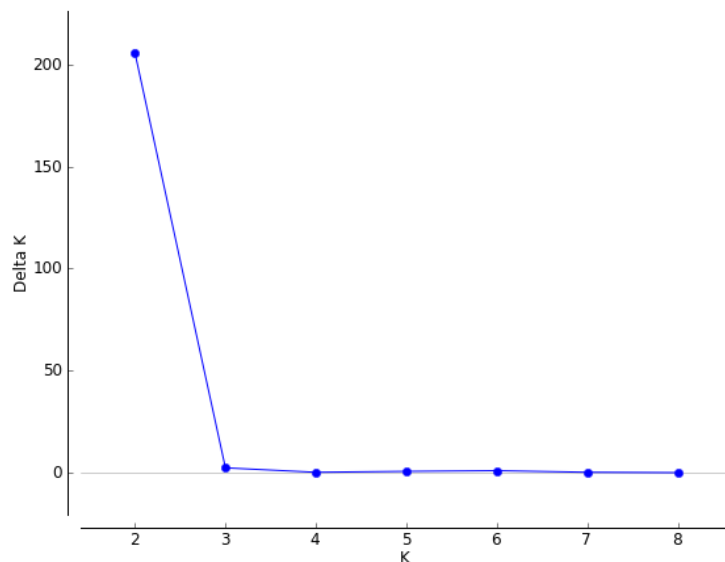


Figura 20. Estimativa do número de agrupamentos (K) a partir da estatística ΔK de Evanno *et al* (2005) para a espécie *S. brasiliensis*.

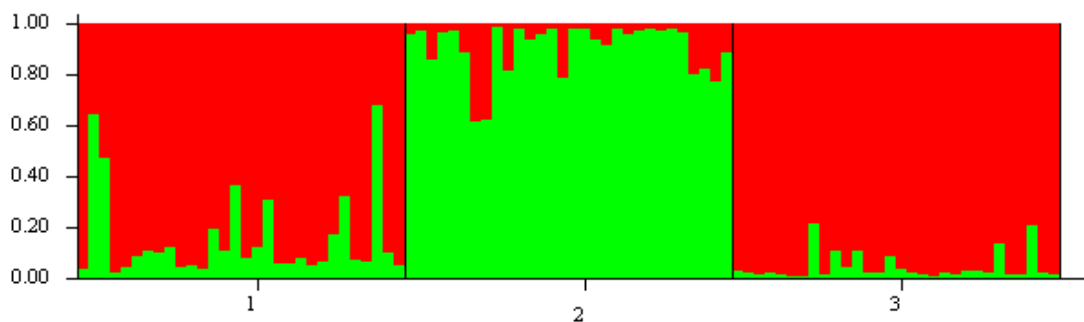


Figura 21. Representação gráfica a partir de $K = 2$ para a espécie *S. brasiliensis*. Cada grupo apresenta uma população diferente e as cores representam a probabilidade do coeficiente de ancestralidade da população em cada agrupamento genético. 1 – Matriz; 2 – Alevinos; 3 – População Natural.

Em *S. brasiliensis* a população com maior diferenciação foi a de Alevinos, onde entre a população da Matriz e a População Natural não foi observada uma diferença significativa. Mai *et al* (2004) mostram que existem diversos fatores que dificultam a produção em larga escala dessa espécie, como: baixa taxa de fertilização, hábito alimentar carnívoro desde suas primeiras horas de vida, canibalismo, rejeição de rações artificiais, obrigando-os assim a um consumo de alimento natural.

Com essas informações, podemos propor algumas hipóteses para os resultados obtidos dos Alevinos neste estudo: 1. Acasalamento não aleatório. Fracalossi et al. (2004) em um estudo sobre ganho de peso de dourado em piscicultura observaram que machos pertencentes a cativeiros tendem a ganhar peso, e devido aos componentes abióticos da água (temperatura, pH, densidade), ocorre uma maior frequência de machos, podendo assim haver uma preferência entre as fêmeas na hora de acasalar; 2. Número reduzido de parentais. Segundo Lopera-Barrero et al (2008) para manter um manejo adequado com variabilidade genética suficiente nos estoques, é necessário a introdução de uma grande quantidade de indivíduos reprodutores e geneticamente diferentes, mantendo assim um pool gênico e a variabilidade genética nos alevinos.

Na análise de parentesco entre os indivíduos de cada população de *S. brasiliensis* foram observados para a Matriz 16% dos indivíduos identificados como irmãos completos, 15% como meio irmãos e 69% não estão relacionados (Figura 22). Foram encontradas quatro famílias para a Matriz, 27 indivíduos para a família um, e apenas 1 indivíduo para as famílias dois, três e quatro (Tabela 25). Dentre esses indivíduos, 4 foram identificados como irmãos completos e 72 como meio irmão (Figura 23).

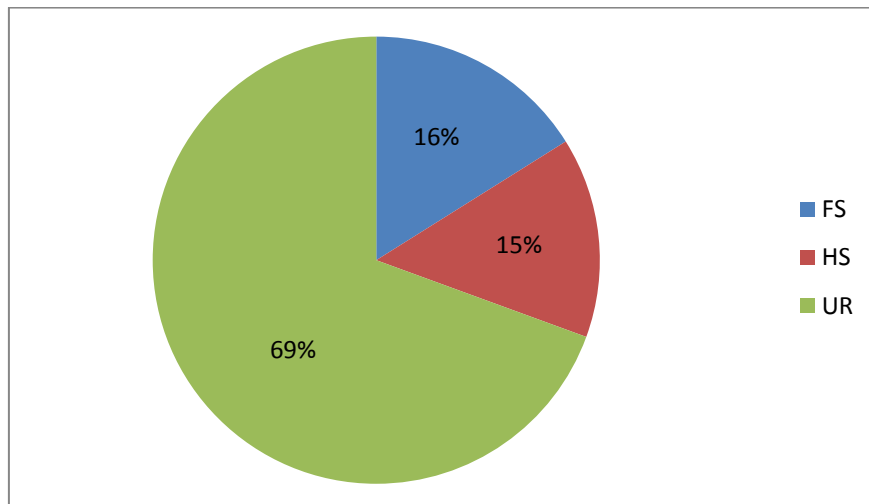


Figura 22. Representação gráfica da percentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Matriz de *S. brasiliensis*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 25. Reconstrução de parentesco da população de Matriz da espécie *Salminus brasiliensis*

Amostra	Pai	Mãe	Família
M1	*1	#1	1
M2	*2	#2	1
M4	*1	#4	1
M5	*1	#4	1
M6	*4	#5	1
M7	*5	#5	1
M8	*6	#6	1
M9	*7	#7	1
M10	*8	#4	1
M11	*9	#8	1
M12	*7	#4	1
M13	*7	#2	1
M14	*1	#2	1
M15	*2	#2	1
M17	*6	#4	1
M18	*9	#10	1
M19	*5	#8	1
M20	*6	#8	1
M22	*5	#4	1
M23	*12	#8	1
M24	*2	#12	1
M25	*2	#1	1
M26	*5	#8	1
M27	*6	#12	1
M28	*4	#13	1
M29	*6	#4	1
M30	*6	#5	1
M3	*3	#3	2
M16	*10	#9	3
M21	*11	#11	4

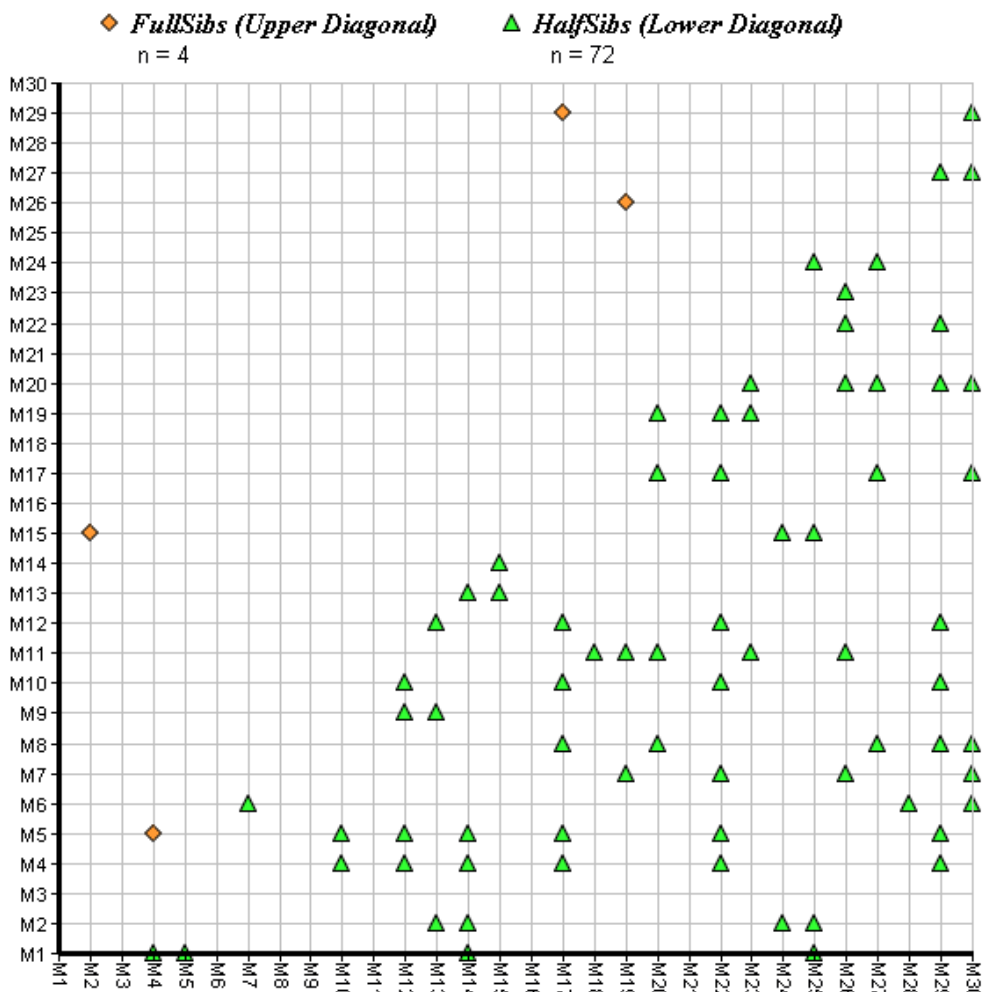


Figura 23. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Matrizes de *S. brasiliensis*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Para os Alevinos, 33% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 17% como meio irmãos e 50% não estão relacionados (Figura 24). Esse resultado pode ser comparado com os dados obtidos através das Análises Bayesianas, onde os alevinos apresentam características semelhantes nos alevinos, encontrando assim um alto grau de parentesco entre eles. Foram encontradas duas famílias para a população de alevinos, 28 indivíduos para a família um e 2 indivíduos para a família dois (Tabela 26). Dentre esses indivíduos, 10 foram identificados como irmãos completos e 102 como meio irmãos (Figura 25).

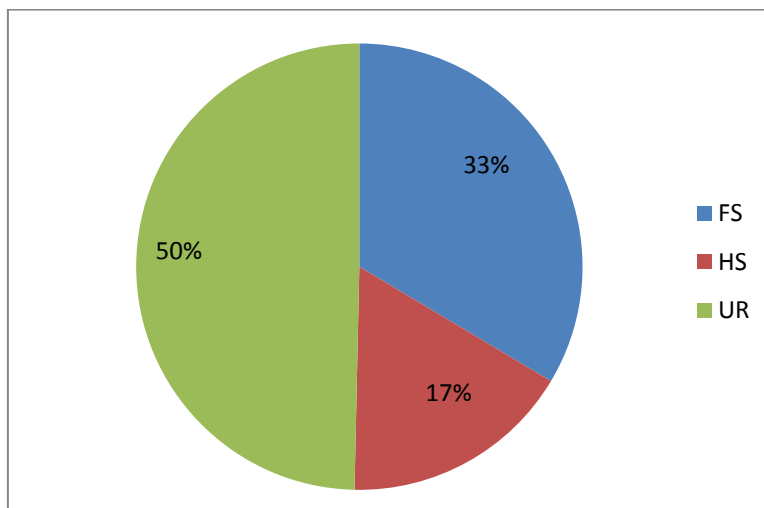


Figura 24. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população de Alevinos de *S. brasiliensis*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 26. Reconstrução de parentesco da população de Alevinos da espécie *Salminus brasiliensis*.

Amostra	Pai	Mãe	Família
A1	*1	#1	1
A2	*2	#1	1
A3	*3	#2	1
A4	*4	#3	1
A5	*4	#4	1
A8	*1	#6	1
A9	*7	#7	1
A10	*2	#8	1
A11	*4	#1	1
A12	*1	#4	1
A13	*7	#1	1
A14	*8	#1	1
A15	*2	#9	1
A16	*4	#1	1
A17	*8	#1	1
A18	*1	#4	1
A19	*4	#4	1
A20	*9	#1	1
A21	*2	#10	1
A22	*2	#7	1
A23	*8	#1	1
A24	*2	#4	1
A25	*8	#1	1
A26	*3	#7	1
A27	*1	#2	1
A28	*2	#2	1
A29	*2	#9	1
A30	*10	#7	1
A6	*5	#5	2
A7	*6	#5	2

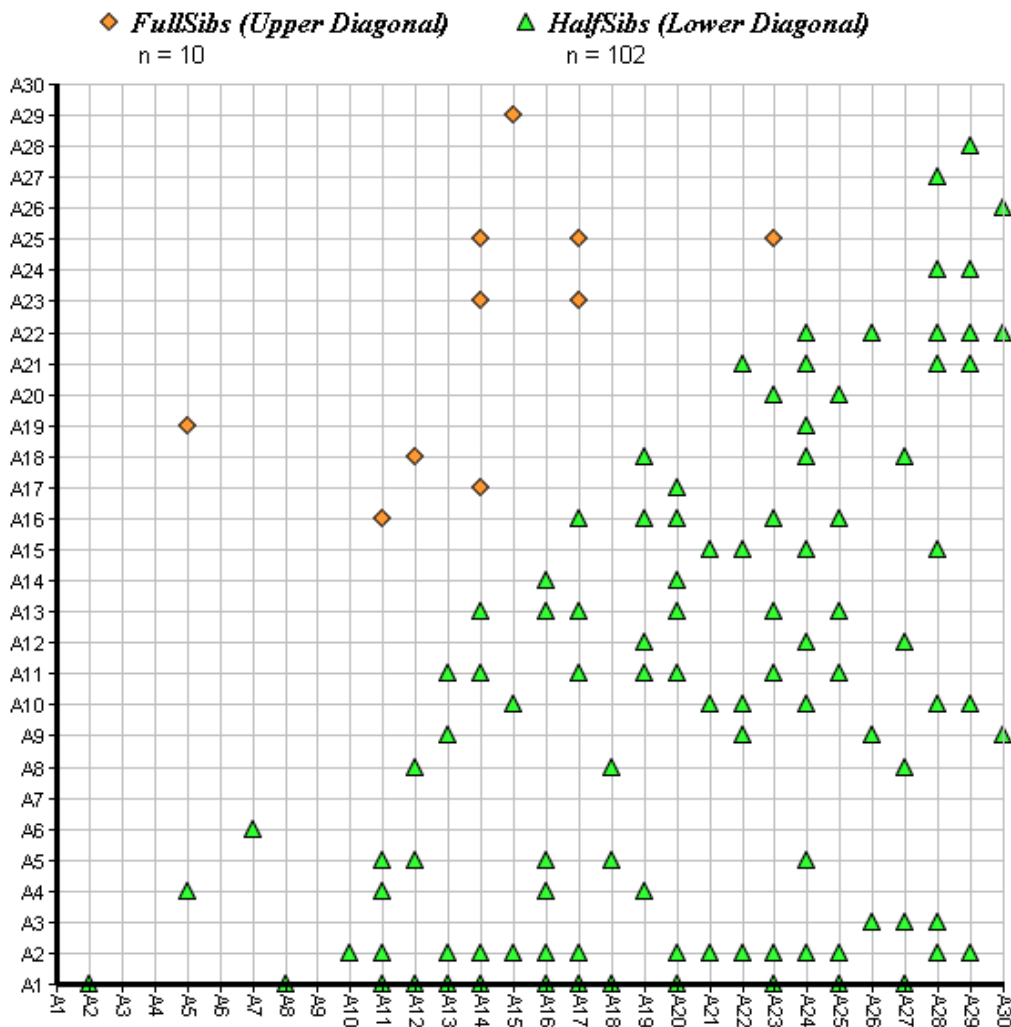


Figura 25. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população de Alevinos de *S. brasiliensis*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Para a População Natural, 12% dos indivíduos foram identificados como irmãos completos, 17% como meio irmãos e 71% não estão relacionados (Figura 26). Foram encontradas duas famílias para a população natural, 29 indivíduos para a família um e 1 indivíduo para a família dois (Tabela 27). Dentre esses indivíduos, 2 foram identificados como irmãos completos e 91 como meio irmão (Figura 27).

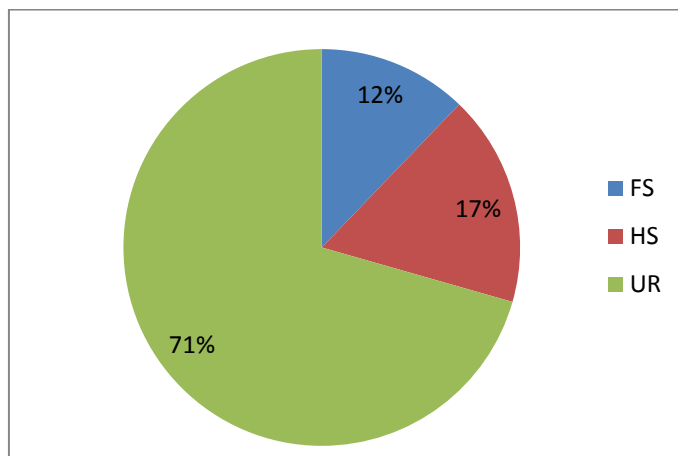


Figura 26. Representação gráfica da porcentagem total dos indivíduos de acordo com sua classificação da população Natural de *S. brasiliensis*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos; UR – Não relacionados.

Tabela 27. Reconstrução de parentesco da População Natural da espécie *Salminus brasiliensis*

Amostra	Pai	Mãe	Família
N1	*1	#1	1
N2	*2	#1	1
N3	*3	#2	1
N4	*2	#1	1
N5	*4	#3	1
N6	*5	#4	1
N7	*5	#5	1
N8	*2	#6	1
N9	*4	#4	1
N11	*7	#2	1
N12	*8	#8	1
N13	*2	#8	1
N14	*1	#2	1
N15	*3	#6	1
N16	*7	#5	1
N17	*4	#9	1
N18	*5	#5	1
N19	*9	#8	1
N20	*5	#1	1
N21	*10	#5	1
N22	*2	#3	1
N23	*5	#6	1
N24	*4	#1	1
N25	*11	#6	1
N26	*4	#5	1
N27	*4	#10	1
N28	*5	#3	1
N29	*3	#1	1
N30	*4	#2	1
N10	*6	#7	2

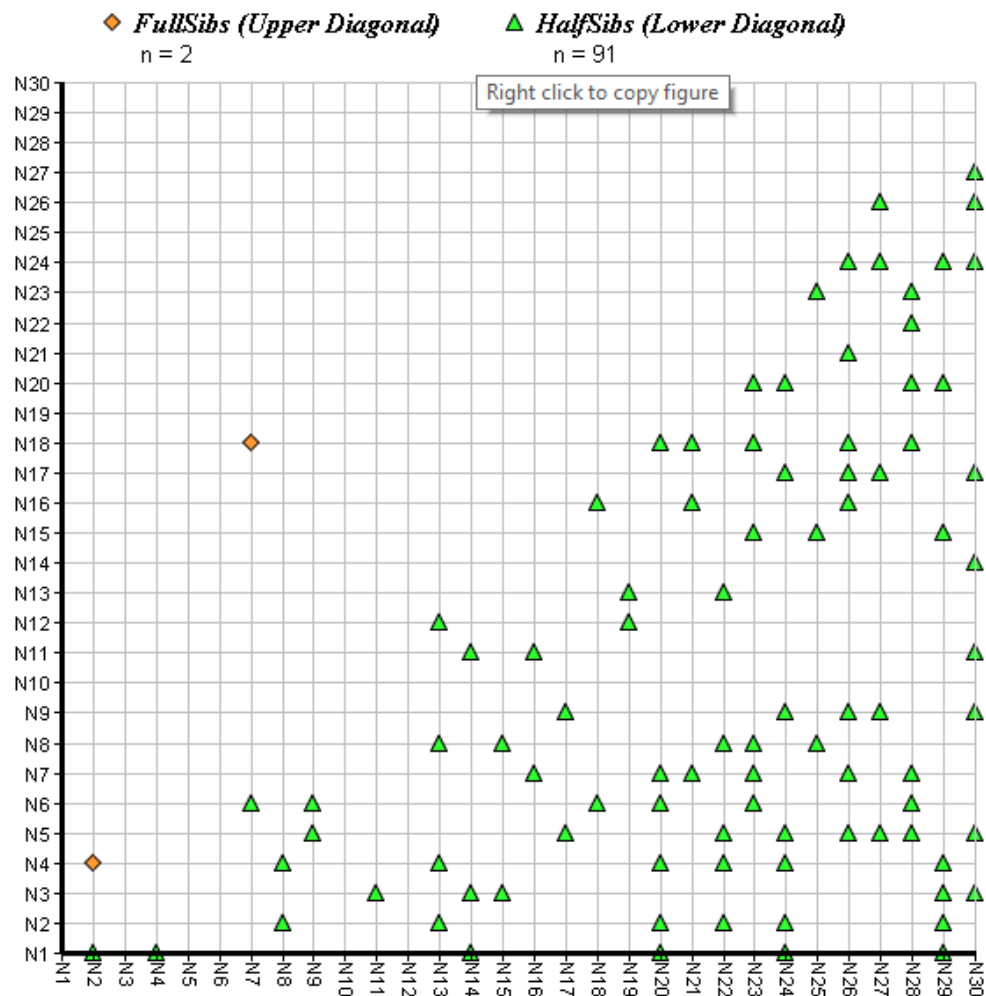


Figura 27. Representação gráfica da relação dos indivíduos entre si da população Natural de *S. brasiliensis*. FS – Irmãos completos; HS – Meio Irmãos.

Quanto observamos os dados para a espécie *Salminus brasiliensis*, nota-se até 4 famílias distintas e 13 progenitores diferentes. No entanto em todas as populações observa-se pelo menos uma família com grande número de indivíduos.

Nesta espécie é nítida a ocorrência de endogamia pelo alto valor de irmãos completos encontrados na população de Alevinos. Ribolli (2014) estudou larvas dessa espécie em um trecho com barragens no Rio Uruguai. Em seu trabalho, mostra que machos de menor porte tem uma maior limitação de acesso à fêmea, fazendo com que acabe deixando poucos

descendentes ou até mesmo nenhum. Podemos observar isso também neste trabalho, onde os machos 5, 6, 9 e 10 da população de Alevinos tiveram apenas um descende, enquanto nos outros encontramos de 2 a 4 descendentes.

5.4 Considerações finais

Quando se trata dessas três espécies e seu manejo na piscicultura de Salto Grande, não se tem muitas informações conclusivas. As três espécies são migradoras, em seu habitat natural, elas deveriam apresentar uma variabilidade genética alta e um baixo índice de endogamia. Mas esses estoques naturais de peixes têm sofridos danos devido principalmente as ações do homem (Henriques, 2014).

Lopes et al (2008) descrevem em seu trabalho que um manejo reprodutivo inadequado leva a uma perda de variabilidade genética nos estoques de piscicultura. Quando acontecem as solturas, essas perdas podem acarretar problemas de adaptabilidade desses alevinos e quando passados para a população residente do rio através de cruzamentos, podem também afetar a variabilidade genética local, como observado nesse estudo pelos índices de endogamia encontrados na população natural e a baixa heterozigosidade observada nas populações de *P. mesopotamicus* e *S. brasiliensis*.

A análise de endogamia é necessária antes de se formar estoques de reprodutores. Quando uma população apresenta alto nível de heterozogidade e baixo nível de parentesco, as espécies conseguem manter a variação genética, o que é ideal para programas de repovoamento (Mendonça, 2014). Como observado, *P. lineatus* apresentou um bom nível de

heterozigossidade, mas, no entanto, um alto nível de parentesco entre seus indivíduos, mostrando ser necessária uma melhor seleção dos estoques reprodutores, bem como o seu manejo em relação aos cruzamentos realizados.

Para aumentar a variabilidade genética da progênie é necessário o acasalamento múltiplo, o que contribui para o aumento de chances de sobrevivência e para o sucesso reprodutivo da prole, como Jorge (2016) inferiu em seu trabalho, que reforça que parceiros únicos para reprodução podem comprometer os descendentes, pois podem não apresentar gametas com qualidades ideais para se reproduzir e sobreviver.

Essas solturas acontecem há muito tempo e em grande quantidade por obrigação da legislação Brasileira que determina que os empreendimentos hidrelétricos devam fazer a soltura de espécies de acordo com a Instrução Normativa Nº 146, de 10 de Janeiro de 2007 (Copel, 2016), no entanto sem a exigência de uma fiscalização necessária. Não temos informação de como foi constituído inicialmente esses estoques de Matrizes e nem quantos indivíduos deram início a estes estoques, se a população da Matriz de hoje são peixes capturados diretamente do rio Paranapanema ou se são provenientes de uma antiga leva da população de Alevinos, ou até mesmo de outros rios ou ainda se foram obtidas de outras estações de pisciculturas.

No entanto, pelos dados observamos que o manejo que está sendo utilizado não está adequado. As espécies apresentaram uma baixa variabilidade genética nas populações da matriz e nas populações de alevinos, além de uma alta diferenciação genética quando comparada a população natural. Apresentaram valores altos de endogamia e com os valores de heterozigossidade observada abaixo do esperado.

Com os dados do presente estudo pode ser evidenciada a necessidade de rever o manejo dessa piscicultura de Salto Grande, para que as espécies consigam recuperar essa variabilidade perdida para que após a soltura ocorra a manutenção e conservação dessas espécies no meio ambiente natural e sem maiores danos genéticos para as populações que residem no rio Paranapanema.

6. Conclusão

Nas três espécies estudadas, todos os estoques de Matrizes e de Alevinos apresentaram endogamia. Duas espécies, *P. mesopotamicus* e *S. brasiliensis*, apresentaram uma baixa variabilidade genética na População Natural quando se comparada a dados da literatura, mostrando que mesmo vivendo em seu habitat natural e sendo espécies migradoras, as solturas de peixes com baixa variabilidade genética, as barragens e a deterioração do habitat natural podem estar levando essas espécies a um declínio da diversidade genética.

As análises genéticas mostram que mesmo havendo uma grande quantidade de indivíduos não relacionados diretamente, eles possuem um alto nível de parentesco entre eles, onde são poucos os indivíduos que se mostraram fora da genealogia.

Essas espécies são de extrema importância não só para a economia, mas também para a ecologia da fauna do rio Paranapanema. É necessário que através dos dados obtidos se faça o manejo e a conservação dessas espécies de forma correta, mantendo os valores de variabilidade genética e a adaptabilidade desses indivíduos em seu habitat natural.

Referências

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES L. C. e PELICICE F. M. Ecologia e manejo dos recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. **Maringá, EDUEM**, 2007.
- ALMEIDA F.S., FUNGARO M.H.P.; SODRÉ L.M.K. RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi river. **Journal of Zoology**, 253: 113-120, 2001.
- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. Manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.
- BELL, J. D. et al. Restocking and stock enhancement of coastal fisheries: potential, problems and progress. **Fisheries Research**, v. 80, n. 1, p. 1-8, 2006.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Lista Nacional das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/179/_arquivos/in_mma_005_04_179.pdf
Acesso em: 12 ago. 2015a
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Mata Atlântica. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acesso em: 12 ago. 2015b.
- CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v. 1, n. 4, p. 245-247, 2001.
- CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, Rob. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 607-616, 2009.
- CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T., GALETTI JR, P. M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 377-380, 2008.
- CASTRO, R. et al. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v. 3, n. 1, p. 1-31, 2003.
- CEMIG/CETEC. COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS; FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande**. Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, p144, 2000.
- COPEL, Companhia Elétrica Paranaense. Programa de monitoramento e repovoamento de peixe. Disponível em <[http://www.copel.com/hpcopel/root/sitearquivos2.nsf/arquivos/ictiofauna/\\$FILE/ictiofauna.pdf](http://www.copel.com/hpcopel/root/sitearquivos2.nsf/arquivos/ictiofauna/$FILE/ictiofauna.pdf)>. Acessado em: 18 de outubro, 2016.

da SILVA, S. A. et al. Avaliação da transferibilidade de locos de microssatélites em oito espécies de *Astyanax*. DOI: 10.7902/ecb.v2i1.33. **Evolução e Conservação da Biodiversidade**, v. 2, n. 1, p. 104-109, 2012.

DELGADO, Christopher L. Fish to 2020: Supply and demand in changing global markets. **WorldFish**. 2003.

DUKE ENERGY. **Peixes do rio Paranapanema**. Editora Horizonte Geográfico, São Paulo. 2008.

EARL, D. A. et al. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation genetics resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 2012.

EMBRAPA, Cartilha de Genética na Piscicultura: **Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA**. Brasília, DF : Embrapa, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FERREIRA, D. G. Tributários na manutenção da diversidade genética de peixes migradores da bacia do alto rio paraná, brasil. 2010. 149p. **Tese (Genética e Biologia Molecular)**, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

FLORA, M. A. D. et al. Biologia e cultivo do dourado (*Salminus brasiliensis*). **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 4, n. 1, p. 7-14, 2010.

FRACALOSSO, D. M. et al. Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.

FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. Espécies cultivadas. In: MURGAS, L. D. S.; VIVEIROS, A. T. M.; MARIA, A. N.; FREITAS, R. T. F.; FREATO, T. A.; SANTOS, V. B. **Reprodução/Espécies para piscicultura: cursos de qualificação profissional a distância**. Lavras: UFLA/FAEPE, p. 17-28, 2002.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. Princípios de genética de populações. **Porto Alegre. Editora Artmed, 4º edição**. 2010.

HENRIQUES, J. M. Análise da diversidade genética em Curimatá (*Prochilodus*) da Bacia do Prata e Amazônia. 2014. 97p. **Dissertação (Ciências Biológicas – Zoologia)**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

HOLLAND, M. M.; PARSON, W.. GeneMarker® HID: A reliable software tool for the analysis of forensic STR data. **Journal of forensic sciences**, v. 56, n. 1, p. 29-35, 2011.

IWERSEN, L. H. L. Diversidade genética em curimba *Prochilodus lineatus* (pisces, characiformes) na bacia do alto Rio Uruguai, Brasil. 2010. 76p. **Dissertação (Ciências Agrárias – Aquicultura)**, Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, 2010.

JONES, O. R.; WANG, J. COLONY: a program for parentage and sibship inference from multilocus genotype data. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 551-555, 2010.

JORGE, P. H. Sequenciamento do transcriptoma e caracterização de microssatélites na pirapitinga *Piaractus brachypomus* para análises de variabilidade genética. 2016. 76p. **Dissertação (Ciências Biológicas - Zoologia)** – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

KONOVALOV, D. A.; MANNING, C; HENSHAW, M. T. KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 4, p. 779-782, 2004.

KUBITZA, F. Aquicultura no Brasil: Principais espécies, áreas de cultivo, rações, fatores limitantes e desafios. **Panorama da Aquicultura**, v. 25, n. 150, p. 10-23, jul./ago. 2015.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Monitoramento da diversidade genética dos reprodutores e da progênie de *Piaractus mesopotamicus* obtida pelo sistema seminatural. In: **Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce (2007 ago.: Dourados, MS)**. Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste, 2007.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Caracterização genética de estoques de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)(Characiformes: Prochilodontidae), utilizados em programas de repovoamento: importância para a conservação da ictiofauna e do ecossistema. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, 2008.

LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microssatélite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 954-963, 2010.

LOPERA-BARRERO, Nelson Mauricio; DOS SANTOS, Silvio Carlos Alves; DEL PILAR, Maria. Genetic diversity of wild populations and broodstocks of curimba for restocking programs in the Tietê, Grande, Pardo and Mogi-Guaçu Rivers (Brazil). **Bol. Inst. Pesca, São Paulo**, v. 41, n. 2, p. 287-304, 2015.

LOPES, C. M. et al. Fish passage ladders from Canoas Complex-Parapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, n. 2, p. 131-138, 2007.

LOPES, T. S. et al. Caracterização genética de estoques de curimba ("Prochilodus lineatus") utilizados em programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, 2008.

LOPES, T. S. et al. Skeletal Anomalies of Pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Larvae from a Wild-caught Broodstock. **Journal of the World Aquaculture Society**, v. 45, n. 1, p. 15-27, 2014.

LYNCH, M; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, n. 4, p. 1753-1766, 1999.

MAI, M. G. et al. Efeito da idade de estocagem em tanques externos no desempenho da larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis*. 2004. 45p. **Dissertação (Aquicultura)** – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.

MARQUES, A.K. Variabilidade genética de *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) de um programa de repovoamento do rio Paraná. 2015. 32p **Dissertação (Aquicultura e Desenvolvimento Sustentável)**. – Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2015.

MENDONÇA, B. B. Conservação genética e reposição de estoques nativos na bacia do rio Sapucaí-Mirim (SP). 2014. 85p. **Dissertação (Ciências Biológicas - Zoologia)** – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

MOREIRA, A. A. et al. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

MORELLI, K. A. et al. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 1, p. 32-34, 2007.

NEVES, Gilmar Perbiche. Efeitos do tempo de residência, morfometria e estado trófico sobre as assembléias de microcrustáceos (Cladocera e Copepoda) dos reservatórios de Chavantes e Salto Grande (rio Paranapanema, SP/PR). **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2008.

NOBILE, A. B. A ictiofauna agregada a um sistema de piscicultura em tanques-rede na represa oligotrófica de Chavantes (médio rio Paranapanema, SP/PR): composição de espécies e atributos ecológicos. 2010. 79p. **Dissertação (Ciências Biológicas - Zoologia)** – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

NUNES, A. G. et al. Estruturação genética populacional de *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae) na Bacia do Alto Paraná. 2015. 56p. **Dissertação (Genética e Evolução)** – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2015.

OLIVEIRA, C. et al. Análise genética de populações selvagens de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio Paranapanema, utilizando marcadores de RAPD. 2005. **Agencia Nacional de Energia Elétrica**, 2005.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A. W. S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 35, n. 1, p. 81-100, 2009.

OOSTERHOUT, C. V. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

ORSI, M. L.; AGOSTINHO, A. A. Introdução de espécies de peixes por escapes acidentais de tanques de cultivo em rios da Bacia do Rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 16, n. 2, p. 557-560, 1999.

OYAKAWA, O. T. et al. Peixes de riachos da Mata Atlântica: nas unidades de conservação do Vale do Rio Ribeira de Iguape no Estado de São Paulo. **Neotropica**, p. 133, 2006.

PEAKALL, R. O. D.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PERINI, V. R. Biologia reprodutiva e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* em um remanescente lótico da Bacia do Rio Grande. 2013.76p. **Tese (Biologia Celular)**. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

PIRY S, L. G, CORNUET JM. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. **Journal of Heredity** 90:502–503, 1999

POVH, J. A. et al. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 2, p. 201-206, 2008a.

POVH, J. A. et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, v. 35, n. 1, p. 5-15, 2008b.

POVH, J.A. et al. Avaliação reprodutiva e da diversidade genética de *Piaractus mesopotamicus* no sistema seminatural. In: **Genética. Em: I Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce, Brasil (Resumo)**. p7-13, 2007.

POVH, J. A. et al. Microsatellite analysis of pacu broodstocks used in the stocking program of Paranapanema River, Brazil. **Scientia Agricola**, v. 68, n. 3, p. 308-313, 2011.

POWELL, Wayne et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. **Molecular breeding**, v. 2, n. 3, p. 225-238, 1996.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000.

RIBOLLI, J. Caracterização genética populacional do dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) na Bacia do alto e médio rio Uruguai. **Tese**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2014.

ROCHA, C. M. Campos da et al. Avanços na pesquisa e no desenvolvimento da aquicultura brasileira. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 48, n. 8, p. iv-vi, 2013.

RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P. Genetic diversity of piaractus mesopotamicus (characiformes: characidae) broodstocks using in the restocking program of Tietê river, Brazil. **Biosci J**, v. 29, n. 2, p. 478-486, 2013.

ROUSSET, F. genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. **Molecular ecology resources**, v. 8, n. 1, p. 103-106, 2008.

RUEDA, E. C. et al. Isolation and characterization of eight polymorphic microsatellite markers for the migratory characiform fish, *Salminus brasiliensis*. **Journal of fish biology**, v. 79, n. 5, p. 1370-1375, 2011a.

RUEDA, E. C. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 4, p. 681-684, 2011b.

SHIBATTA, O. A.; DIAS, J. H. P. peixes do Brasil: CESP 40 anos. **Editores Doiis, Rio de Janeiro**, p.61-79, 2006.

SILVA, J. M. A. Características reprodutivas de curimba (*Prochilodus lineatus*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e Piracajuba (*Brycon orbignyanus*) 2007. 75p. **Dissertação (Zootecnia)**. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

SUGANUMA, C.H. Avaliação da diversidade genética de populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites. 2008. 129p. **Tese (Aquicultura)**. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.

URBINATI, E. C.; GONÇALVES, F. D.; TAKAHASHI, L. S. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 205-244, 2005.

VIVEIROS, A.T.M. et al. Sensibilidade dos espermatozoides de dourado (*Salminus brasiliensis*) a diferentes soluções crioprotetoras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.61, n.4, p.883-889, 2009.

WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. Uma Estrutura para o Ácido Desoxirribonucléico. **Nature**, v. 171, n. 4356, p. 737-738, 1953.