

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Diversidade genética das espécies de *Prochilodus spp.*
utilizadas em piscicultura no baixo São Francisco no
Estado de Sergipe**

ANNA CAROLINA MOTA LOPES

ARACAJU
Abril – 2010

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE

**Diversidade genética das espécies de *Prochilodus spp.*
utilizadas em piscicultura no baixo São Francisco no
Estado de Sergipe**

Dissertação de mestrado submetida à banca examinadora como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Ambiente, na área de concentração em Saúde e Ambiente.

ANNA CAROLINA MOTA LOPES

Orientadores:

Edilson Divino de Araújo, D.Sc.

Cláudia Moura de Melo, D.Sc.

ARACAJU

Abril – 2010

FICHA CATALOGRÁFICA

L864d Lopes, Anna Carolina Mota.

Diversidade genética das espécies de *Prochilodus spp.* Utilizadas em piscicultura no baixo São Francisco no Estado de Sergipe. / Anna Carolina Mota Lopes – Aracaju: Universidade Tiradentes, 2010.

175f.:il.

Orientadores: Edílson Divino de Araújo, Cláudia Moura de Melo.
Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Tiradentes UNIT, 2010.

1. *Prochilodus spp.* 2. Piscicultura. 3. Baixo São Francisco.
4. RAPD. I. Universidade Tiradentes II. Título.

CDU – 614:504:639.3(282.281.5)

Diversidade genética das espécies de *Prochilodus spp.* utilizadas na piscicultura no baixo São Francisco no Estado de Sergipe

ANNA CAROLINA MOTA LOPES

DISSERTAÇÃO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E AMBIENTE DA UNIVERSIDADE TIRADENTES, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM SAÚDE EM AMBIENTE.

Aprovada por:

Edílson Divino de Araújo, D.Sc.

Orientador

Cláudia Moura de Melo, D.Sc.

Orientadora

Rubens Riscala Madi, D.Sc.

1º. Examinador

Fabiana Botelho de Miranda Onofre, D.Sc.

2º. Examinador

Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior, D.Sc.

1º. Suplente

Verônica de Lourdes Sierpe Jeraldo, D.Sc.

2º. Suplente

ARACAJU

Abril – 2010

Aos meus pais, meus avôs Joaquim Lopes (in memorian) e Luis Motta e minhas avós Volite Motta (in memorian) e Lenira Lopes (in memorian). Muitos passam por nossas vidas, mas esses são eternos.

“Persegue os teus objetivos ainda que difícil te possa parecer. Os navios nunca alcançam as estrelas, mas é seguindo-as que se lançam ao mar”.

Paulo Newton Danzi Salvia

“Frequentemente, as metodologias científicas forneceram exemplos de moralidade científica, de prontidão à mudança, de busca da verdade como fim e não como meio. O homem não é, nem nunca será, o deus diante de quem outro homem deve ajoelhar-se. Nenhum homem, portanto, jamais será onisciente. Isso vale, antes de mais nada, para os cientistas”.

Mauro Maldonato

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, em especial:

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pelo apoio financeiro.

À Universidade Tiradentes e ao Núcleo de Pós-graduação em Saúde e Ambiente pelo apoio, condições e oportunidades oferecidas tornando possível a realização do curso de mestrado.

Ao Prof.^o Dr. Edilson Divino de Araújo, meu orientador, pela confiança em mim depositada, pelos ensinamentos e apoio fundamentais para a realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Moura de Melo, minha orientadora, pelo acompanhamento e pelas sugestões sempre tão pertinentes.

À Prof^a Dr.^a Sara Cuadros Orellana, não somente por oportunizar, de maneira tão agradável, os primeiros ensinamentos a respeito da técnica desenvolvida no presente trabalho, mas também pelo apoio emocional em uma fase tão difícil da minha vida.

A todos os docentes do Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes pelos ensinamentos ministrados.

Aos colegas do Mestrado em Saúde e Ambiente da Universidade Tiradentes pelo agradável convívio durante os dois anos de mestrado.

A todos do Instituto de Tecnologia e Pesquisa (Aracaju/SE) especialmente ao pessoal do Laboratório de Biologia Molecular no qual este trabalho foi realizado.

Aos Profs. Drs. Walter Antônio Pereira Boeger e Márcio Roberto Pie, como também a equipe do Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva da Universidade Federal do Paraná, pelo apoio nos períodos iniciais e incentivo.

Aos produtores de pescado do baixo São Francisco/SE por permitir que os espécimes fossem coletados em suas estações de produção.

À equipe de profissionais da Aquatrix pelo apoio na coleta dos exemplares de *Prochilodus* spp cultivados no baixo São Francisco em Sergipe.

Ao prof^o Dr. Marcelo Fulgêncio Guedes de Brito do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe pelo apoio nas análises morfológicas dos espécimes de *Prochilodus* spp.

Aos membros da banca examinadora, Dr. Rubens Riscala Madi da Universidade Estadual de Campinas e a prof^a Dra. Fabiana Botelho de Miranda Onofre da Universidade Tiradentes, pelas relevantes sugestões dadas.

A todos os profissionais do Hospital do Coração pela dedicação e perseverança.
Serei eternamente grata a todos.

Ao amigo-irmão Fabinho, meu grande incentivador a realizar o mestrado.

A todos os meus amigos pela inestimável amizade.

Ao meu noivo Marcos, por estar presente em todos os momentos, pelo apoio, amor, carinho e por entender as minhas ausências e crises na realização do presente trabalho.
Sem você, nada faria sentido.

Aos meus pais por terem me dado a oportunidade de estudar viabilizando minha chegada ao mestrado e minhas queridas sobrinhas pelas constantes e boas risadas.

A Deus, pela minha vida, fé, força e, principalmente, minha saúde e a Nossa Senhora, pela proteção em todos os momentos.

SUMÁRIO

RESUMO	14
ABSTRACT	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
Objetivo Geral	19
Objetivos Específicos	19
3. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	20
 CAPÍTULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	 22
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
1.1 A bacia do rio São Francisco e o gênero <i>Prochilodus</i>	23
1.2 A pesca e a piscicultura no Estado de Sergipe	27
1.3 Diversidade Genética e Marcadores Moleculares	31
1.3.1 <i>Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)</i>	32
2. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	38
 CAPÍTULO II –AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Prochilodus spp.</i> NO BAIXO SÃO FRANCISCO/SE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE <i>RAPD-PCR</i>.....	 42
RESUMO	43
ABSTRACT	44
1. INTRODUÇÃO	45
2. MATERIAL E MÉTODOS	46
2.1 Coleta das Amostras	46
2.2 Identificação Taxonômica	48
2.3 Extração do DNA	48
2.4 Concentração, Grau de Pureza e Integridade do DNA	48
2.5 Análise da Diversidade Genética	49
2.5.1 Reação de Amplificação do DNA por <i>RAPD-PCR</i>	49
2.5.2 Análise Eletroforética dos Fragmentos Amplificados	49
2.5.3 Análise dos Dados	49
 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	 51

3.1 Identificação Taxonômica	51
3.2 Concentração, Grau de Pureza e Integridade do DNA.....	51
3.3 Seleção dos primers <i>RAPD</i>	52
3.4 Gradiente da Temperatura de Anelamento	54
3.5 Análise da Diversidade Genética por <i>RAPD-PCR</i>	54
4. CONCLUSÃO	59
5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	60
 CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS	 62
 ANEXOS ou APÊNDICES	 64

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1: Principais espécies de peixes de água doce comercializadas no baixo São Francisco no Estado de Sergipe, produção e valores em reais	30
--	----

CAPÍTULO II

Tabela 1: Produtores, localidade das estações de produção e origem dos alevinos	47
--	----

Tabela 2: Seqüência, número de nucleotídeos e número de fragmentos amplificados dos primers <i>RAPD</i> , selecionados	53
---	----

Tabela 3: Matriz de identidade e distância genética de Nei das espécies de <i>Prochilodus argenteus</i> cultivadas no baixo São Francisco/SE	57
---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1: Unidades hidrográficas de referência e divisão fisiográfica da Bacia do Rio São Francisco	23
Figura 2: Exemplares de <i>Prochilodus spp.</i>	26
Figura 3: Municípios do Estado de Sergipe na Bacia do Rio São Francisco	28
Figura 4: Comportamento “dominante” de marcadores RAPD	33

CAPÍTULO II

Figura 1: Contagem das escamas da fileira transversal	51
Figura 2: Perfil eletroforético da integridade dos DNAs extraídos	52
Figura 3: Perfil eletroforético da amplificação dos 20 <i>primers RAPD</i>	53
Figura 4: Percentual de loci polimórficos das amostras de <i>Prochilodus argenteus</i> do baixo São Francisco/SE	54
Figura 5: Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA a partir da distância genética de Nei para <i>Prochilodus argenteus</i> dos 17 produtores selecionados (A a Q) do baixo São Francisco/SE	58

ANEXOS

Figuras 6 a 10: Perfil eletroforético de <i>RAPD</i> obtido com o <i>primer</i> OPA-03	65
Figura 11 a 15: Perfil eletroforético de <i>RAPD</i> obtido com o <i>primer</i> OPA-04	68
Figura 16 a 20: Perfil eletroforético de <i>RAPD</i> obtido com o <i>primer</i> OPA-18	71
Figura 21 a 25: Perfil eletroforético de <i>RAPD</i> obtido com o <i>primer</i> OPP-07	74
Figura 26 a 30: Perfil eletroforético de <i>RAPD</i> obtido com o <i>primer</i> OPP-08	77

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

AFLP – *Amplified Fragment Length Polymorphism*
CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba
DNA – Ácido desoxirribonucléico
dNTPs – Deoxinucleotídeos
DMSO – Dimetil sulfóxido
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra acético
HCl – Ácido clorídrico
IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais
ISSR – *Inter Simple Sequence Repeat*
ITP – Instituto de Tecnologia e Pesquisa
LBM – Laboratório de Biologia Molecular
MG – Minas Gerais
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
RAPD – *Random Amplified Polymorphic DNA*
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
SE – Sergipe
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SSR – *Simple Sequence repeat*
Taq – *Thermus aquaticus*
TBE – Tris borato EDTA
TE – Tris-EDTA
U – Unidade
UPGMA – *Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*
UV – Ultra-violeta
V – Voltagem
VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*

cm – Centímetros
ha – Hectares
Km – Kilômetros
mL – Mililitros
mM – Milimolar
nm – Nanômetro
µg – Micrograma
µL – Microlitro
µM – Micromolar
λ – Lambda

DIVERSIDADE GENÉTICA DAS ESPÉCIES DE *Prochilodus* spp. UTILIZADAS EM PISCICULTURA NO BAIXO SÃO FRANCISCO

RESUMO

Nos sistemas de cultivo os cruzamentos são geralmente realizados com um número reduzido de indivíduos. Se estes indivíduos forem aparentados, pode ocorrer um aumento da consangüinidade na prole resultando na endogamia. O conhecimento da diversidade genética dos estoques naturais ou cultivados de peixes é de fundamental importância para o manejo correto destes estoques. Atualmente, os programas de aquicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, com vistas não somente a ampliar a produção como também manter a diversidade genética dos mesmos. Nesse contexto, de identificação da diversidade e estrutura genética é que estão sendo aplicados os marcadores genéticos e moleculares nas espécies de peixes neotropicais, buscando, inclusive, a exploração de características de interesse econômico, bem como a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção dessa biodiversidade. O presente trabalho propôs, portanto, avaliar a diversidade genética das espécies de *Prochilodus* spp utilizadas em piscicultura no baixo São Francisco através da técnica de *RAPD* ("Random Amplified Polymorphic DNA"), onde se espera produzir conhecimentos que sirvam como instrumento norteador para a conservação e o uso sustentável deste recurso. Foram analisados 70 espécimes de estações de piscicultura do baixo São Francisco no estado de Sergipe. A análise taxonômica demonstrou que os espécimes coletados apresentam características fenotípicas de *Prochilodus argenteus* e que se houve hibridização, esta não foi passível de ser detectada morfológicamente. Os percentuais de loci polimórficos obtidos variaram de 26.67% a 93.33%. Os índices de diversidade genética de Shannon obtidos foram de 0.16 a 0.53, indicando baixa diferenciação intrapopulacional. Estes resultados foram corroborados pelos valores da matriz de distância e identidade genética de Nei e demonstrados graficamente no dendrograma de similaridade genética. De modo geral, foi possível observar por meio dos índices pareados de identidade genética que os produtores apresentam grande similaridade genética.

Palavras-chave: Piscicultura, *Prochilodus* spp, baixo São Francisco, *RAPD*.

GENETIC DIVERSITY OF THE SPECIES OF *Prochilodus* spp. USED IN PISCICULTURE IN THE LOWER SÃO FRANCISCO

ABSTRACT

In hatchery station crosses are usually made with a small number of individuals. If these individuals are related, may be an increase of inbreeding in the offspring resulting in inbreeding. The genetic diversity of natural and cultured stocks of fish is of fundamental importance for the correct management of these stocks. Currently, aquaculture programs have given high importance to the genetic evaluations, aiming not only to expand production but also maintain the genetic diversity of them. In this context, identification of genetic diversity and structure is being applied to the genetic and molecular markers in Neotropical fish species, seeking even the operating characteristics of economic interest and the preservation of evolutionarily significant units for the maintenance of biodiversity. This paper therefore proposes to evaluate the genetic diversity of the species of *Prochilodus* spp used in pisciculture at the Lower São Francisco through the *RAPD* technique (*Random Amplified Polymorphic DNA*), which is expected to produce knowledge that will serve as a guiding instrument for the conservation and sustainable use of this resource. Were analyzed 70 specimens of fish cultivated in the Lower São Francisco in the state of Sergipe. The taxonomic analysis showed that the specimens show phenotypic characteristics of *Prochilodus argenteus* and that there was hybridization, it was not likely to be detected morphologically. The percentage of polymorphic loci obtained ranged from 26.67% to 93.33%. The indices of genetic diversity Shannon obtained were 0.16 to 0.53, indicating low intrapopulation differentiation. These results were corroborated by the values of the array of distance and Nei's genetic identity and demonstrated graphically in a dendrogram of genetic similarity. Overall, it was observed by means of indices matched the genetic identity that specimens have great genetic similarity.

Keywords: Pisciculture, *Prochilodus* spp, Lower São Francisco, *RAPD*.

1. INTRODUÇÃO

Há oito mil anos, quando a região amazônica era explorada apenas pelos índios, os peixes já se constituíam em recursos naturais importantes para a manutenção das populações humanas (SANTOS; SANTOS, 2005). Com a intensificação do processo de globalização da economia na última década, a produção agropecuária ficou mais sujeita à competição internacional e foi induzida a buscar novas alternativas, para viabilizar econômica e socialmente as propriedades rurais, notadamente o segmento da agricultura familiar. Dentre as alternativas, a piscicultura vem ganhando importância por contribuir para a preservação ambiental e cultural, para a produção de alimentos diferenciados, para a valorização do agricultor na sua atividade laboral e principalmente como uma nova alternativa de renda (LORENZINI *et al*, 2005).

A fauna de peixes de água doce no Brasil é particularmente diversa e muitas das espécies que a compõem não são encontradas naturalmente fora da América do Sul. Essa diversidade abrange um número elevado de estoques naturais, os quais vêm sofrendo sensíveis reduções nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, pela captura de espécimes jovens, pela pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos, que modificam as áreas de desova coletivas e interrompem o trajeto migratório de algumas espécies. Desta maneira, torna-se fundamental o conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais para a tomada de medidas racionais na preservação dos estoques (ASHIKAGA, 2008).

Segundo Rossi (1998), a criação de espécies exóticas, como a carpa, a tilápia, a truta e de espécies nativas, como o pacu e o tambaqui, vêm crescendo a cada dia. Atualmente, o Brasil produz mais de 60 milhões de juvenis por ano destes peixes, em suas cinco regiões geográficas.

De acordo com estudo realizado por Gomes (2007), a produção aquícola brasileira passou de 20,5 mil toneladas, em 1990, para 210 mil toneladas, em 2001, com um aumento de 925%, enquanto a aquíicultura mundial teve um crescimento de 187% no mesmo período, o que fez com que o país ocupasse a 19ª posição na produção de organismos aquáticos. O Brasil, entretanto, apresenta uma série de condições que podem aumentar ainda mais sua produtividade, tais como clima adequado, baixo custo da terra, grande variedade de espécies com valor econômico adaptáveis aos cultivos, profissionais qualificados e com experiência, potencial mercado consumidor, infra-estrutura de apoio e escoamento para exportação, linhas de crédito, ausência de poluição e contaminação acentuada dos

ecossistemas aquáticos além de ser um grande produtor e exportador de soja e outros grãos que formam a base da maior parte da alimentação dos peixes.

A aquicultura objetiva implantar programas de manejo da ictiofauna e resgatar a atividade pesqueira com espécies nativas, fortalecendo-a como fonte de geração de emprego e renda, bem como transferir tecnologias de cultivo, conservação, processamento e distribuição de pescado e seus derivados e, dessa forma, diversificar a estrutura econômica e social do meio rural (ROSSI, 1998).

A região do Baixo São Francisco possuía uma tradição histórica na atividade de piscicultura extensiva, quando os produtores da região utilizavam o ciclo anual de cheias para represar as águas do rio, capturando alevinos e peixes jovens que eram mantidos e manejados em canais e lagoas para posteriores despescas. Entretanto, desde a construção da represa de Sobradinho, a vazão do Rio São Francisco foi regularizada e esta atividade inviabilizada pela inexistência de cheias anuais. A partir da década de 1980, particularmente pelos esforços da iniciativa privada e de entidades como a Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF) e o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais (IBAMA), a piscicultura ganhou ênfase na região. De acordo com a CODEVASF (2004), existem mais de 1.000 ha de viveiros de piscicultura distribuídos em cerca de 370 propriedades, apenas no estado de Sergipe.

Nos sistemas de cultivo, os cruzamentos são geralmente realizados com um número reduzido de espécimes. Se estes apresentarem alto grau de parentesco, pode ocorrer um aumento da consangüinidade na prole resultando em endogamia (ARTONI; MATIELLO, 2003). A endogamia tem como consequência uma redução na heterozigosidade permitindo que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose e manifestem fenótipos indesejáveis (SOUZA, 2007).

A ocorrência de variabilidade genética herdável em características adaptativas fornece uma plasticidade fenotípica às populações, o que permite uma maior chance destas se resistirem a mudanças estacionais e/ou temporais, aumentando, portanto a capacidade de sobrevivência destas diante de mudanças ambientais (DE PAULA, 2006).

Atualmente, os programas de aquicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, não somente para ampliar a produção como também manter a diversidade genética dos estoques. O conhecimento da diversidade genética em estoques naturais ou cultivados de peixes é de fundamental para o manejo correto destes (GOMES, 2007).

Neste contexto, o desenvolvimento de técnicas moleculares criou novas possibilidades para a seleção e melhoramento genético em estoques. A técnica da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) teve um grande impacto sobre a investigação de

genomas eucarióticos e contribuiu para o desenvolvimento e aplicação de vários marcadores genéticos (ALI *et al*, 2005).

Diferentes metodologias tais como, isoenzimas, marcadores que usam hibridização (VNTR-“*Variable Number of Tandem Repeats*”) e aqueles que usam a amplificação do DNA (RFLP-*Restriction Fragment Length Polymorphism*, AFLP-“*Amplified Fragment Length Polymorphism*”, microssatélites ou SSR-“*Simple Sequence Repeats*”, ISSR-“*Inter Simple Sequence Repeat*” e o RAPD-“*Random Amplified Polymorphic DNA*”) têm sido amplamente aplicadas em estudos de genética pesqueira em diferentes países (AFFONSO, 2004; DE PAULA, 2006; COSTA, 2006; CORTINHAS, 2007; GOMES, 2007; SILVA, 2007 e ASHIKAGA, 2008), não somente para fins econômicos, mas também para preservação e manutenção da biodiversidade (ASHIKAGA, 2008).

No Brasil, pouco tem sido feito no sentido de melhor utilizar os dados disponíveis sobre a variabilidade genética de populações naturais de peixes, especialmente em relação a sua interação com o ambiente visando à conservação deste importante recurso natural (ARTONI; MATIELLO, 2003). Portanto, marcadores genéticos e moleculares de espécies de peixes neotropicais, tanto para diversidade quanto para estrutura genética, permitiriam também a exploração sustentável de fenótipos de interesse econômico, bem como a preservação de unidades evolutivamente significativas para a manutenção da biodiversidade piscívora (PAZZA, 2005; DE PAULA, 2006).

Até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados com *Prochilodus* spp com o objetivo de avaliar a diversidade genética; portanto, o conhecimento da variabilidade e divergência genética de seus estoques naturais ou cultivados poderá contribuir para o desenvolvimento de um manejo adequado, permitindo um monitoramento específico para que não ocorra redução de variabilidade genética nos programas de cultivo (DE PAULA, 2006).

Diante do exposto, o presente estudo objetivou caracterizar geneticamente as espécies de *Prochilodus* spp utilizadas em piscicultura no baixo São Francisco no Estado de Sergipe.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a diversidade genética das espécies de *Prochilodus spp* utilizadas em piscicultura no baixo São Francisco no Estado de Sergipe.

Objetivos Específicos

- Quantificar a variabilidade genética dos espécimes coletados nas estações de piscicultura através da técnica de *RAPD*;
- Realizar análise comparativa, através de diferentes parâmetros genéticos, para verificar a existência de dissimilaridade genética interespecífica e intraespecífica.

3. REFERÊNCIAS

- AFFONSO, P. R. A. de M. Marcadores moleculares na análise de espécies e composição populacional de peixes marinhos de recife de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2004.
- ALI, B. A.; HUANG, T. H.; QIN, D. N. & WANG, X. M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. (14): 443–453. 2005.
- ARTONI, R. F. e MATIELLO, M. C. de A. Genética de peixes neotropicais. i. Aspectos da conservação genética dos peixes no parque estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. *Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde*. Ponta Grossa. (9): 7-15. 2003.
- ASHIKAGA, F. Y. Estudo da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) das escadas para transposição de peixes do complexo Canoas – rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2008.
- COMPANHIA DO DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DOPARNAÍBA – CODEVASF. Censo Aqüicultura. 2004. Em: www.codevasf.gov.br. Acessado em: 23/03/2007.
- CORTINHAS, M. C. da S. Análise da diversidade populacional de *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae) baseada em marcadores RAPD das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR), lagoa da Conceição e lagoa do Camacho (SC), lagoa dos Patos (RS), lagoa de Carapebus (RJ) e Barra Grande de Camamu (BA). Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 2007.
- COSTA, L. F. C. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do Rio São Francisco, na região de Três Marias (MG). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2006.
- DE PAULA, F. M. Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas-rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2006.
- GOMES, P. C. Diversidade genética de três estoques de Piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá/PR. 2007.
- LORENZINI, L. M.; CALEGARI, O.; ECHHARDT, G. e LIMA, M. S. Piscicultura: importância socioeconômica no espaço agrário de Assis Chateaubriand/PR. Trabalho apresentado na VI Semana de Iniciação Científica na FECILCAM – Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Campo Mourão/PR. 2005.
- PAZZA, R. Contribuição citogenética à análise da biodiversidade em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2005.
- ROSSI, F. Criação de peixes. *Empreendedor rural e urbano*. Minas Gerais. 9 (32). 1998.

SANTOS, G. M. dos e SANTOS, A. C. M. dos. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. Estudos avançados 19 (54). 2005.

SILVA, M. M. Caracterização da variabilidade genética do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em fazendas de produção da região de Canavieiras (BA). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus/BA. 2007.

SOUZA, M. E. de. Caracterização Genética de reprodutores de tilápia: estratégias para a manutenção da variabilidade. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife/PE. 2007.

CAPITULO I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. A bacia do Rio São Francisco e o gênero *Prochilodus*

O rio São Francisco tem a sua nascente histórica na Serra da Canastra, enquanto que a nascente geográfica localiza-se na Serra D'Água, ambas em Minas Gerais, abrangendo uma área total de 631.133 Km². É considerado o terceiro maior rio brasileiro, representando 2/3 da disponibilidade de água doce da Região Nordeste. Ocupa, aproximadamente, 8% do território nacional, drenando os Estados de Minas Gerais, Goiás, Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas e o Distrito Federal, numa extensão de 2.700 km (conforme representado na figura 1), além de atravessar três biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (GODINHO, GODINHO, 2003; COSTA, 2006; MMA, 2007). Cerca de 83% de sua área banha os estados de Minas Gerais e Bahia, uma região ocupada por cerca de 13 milhões de habitantes (COSTA, 2006).

O rio São Francisco, apresenta uma área drenada de 639.219 km², correspondente a 7,5% da área do Brasil, e oferece uma vazão média de 2.850 m³/s. A correnteza é no sentido sul-norte pela Bahia e Pernambuco, onde altera seu curso para leste, chegando ao Oceano Atlântico através da divisa entre Alagoas e Sergipe. Quinhentos e quatro municípios se distribuem ao longo da bacia do “Velho Chico”, o que corresponde a cerca de 9% do total de municípios do país (MMA, 2007).

A Bacia do São Francisco é subdividida em quatro segmentos: Alto São Francisco - das nascentes até a cidade de Pirapora (111.804km² - 17,5% da região); Médio São Francisco – de Pirapora até Remanso (339.763km² - 53% da região); Sub-Médio São Francisco - de Remanso até Paulo Afonso (155.637km² - 24,4% da região); e o Baixo São Francisco - de Paulo Afonso até sua foz (32.013km² - 5,1% da região), conforme mostrado na Figura 1 (GODINHO, GODINHO, 2003; IBAMA, 2007).

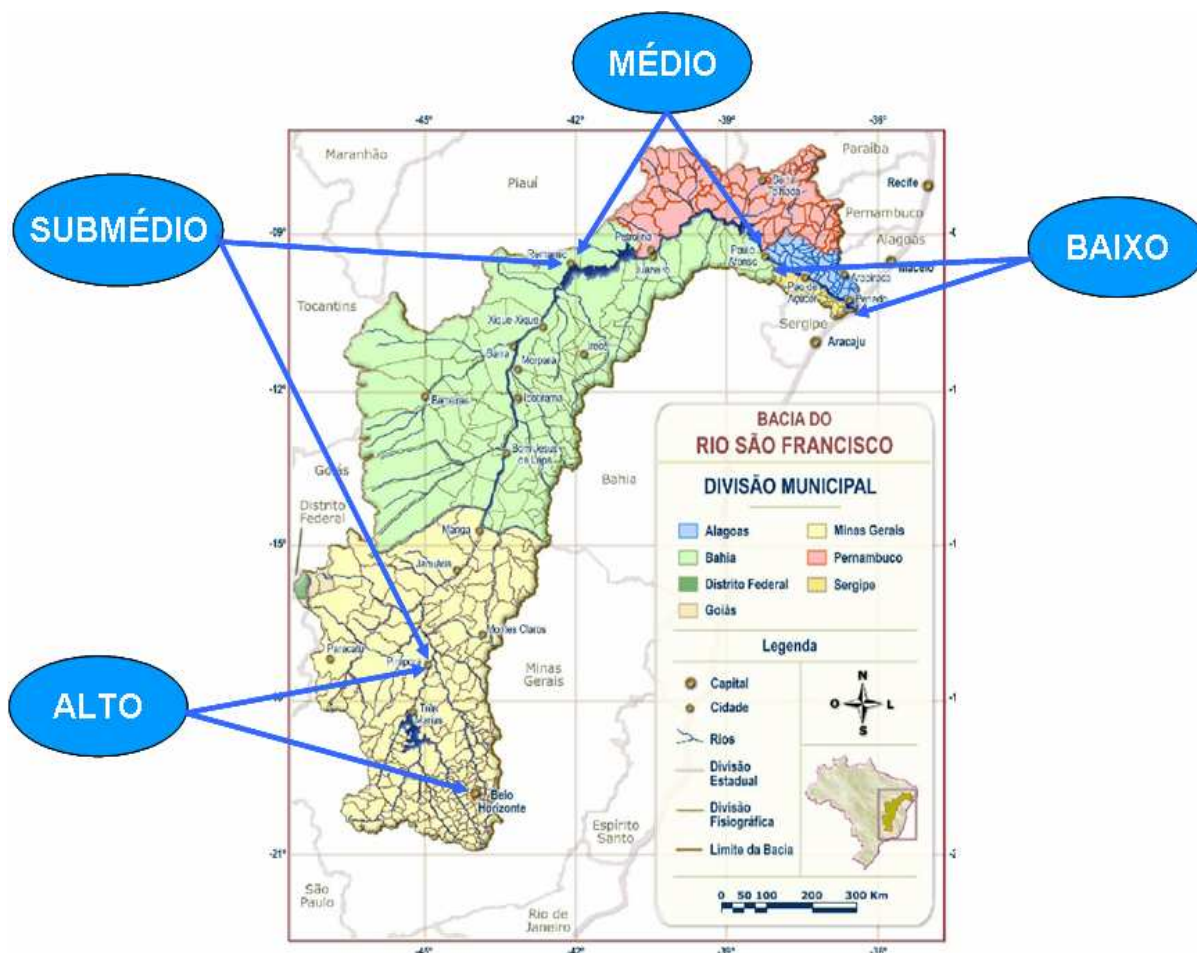


Figura 1: Unidades hidrográficas de referência e divisão fisiográfica da Bacia do Rio São Francisco. Fonte: Ministério do Meio Ambiente - MMA (2007).

De acordo com estudo realizado por Ashikaga (2008), os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade dos vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, considerando apenas duas ordens descritas (Characiformes e Siluriformes). Essa enorme biodiversidade de peixes supre não somente as necessidades alimentares da população, com as diversas espécies exploradas, mas também pode ser utilizada no manejo de ecossistemas, no controle de mosquitos vetores de doenças, no controle de vegetação aquática invasiva e em biomanipulações e, às vezes, na restauração de sistemas aquáticos. Além disso, é reconhecida a grande contribuição dos peixes nos processos do ecossistema aquático, os quais incluem a participação na cadeia trófica, transferência de energia entre os níveis tróficos e transporte de nutrientes entre os ecossistemas marinhos, de água doce e terrestre.

Excluídas as espécies diádromas (espécies que migram entre o mar e a água doce), a ictiofauna do São Francisco é composta por cerca de 158 espécies de água doce, mas novas espécies têm sido descritas sendo que aproximadamente 8% delas migram para reproduzir-se. Dentre essas, sete são provavelmente migradoras de longa distância: *Brycon*

lundii (Matrinchã), *Salminus brasiliensis* (Dourado), *Leporinus elongatus* (Piau-verdadeiro), *Prochilodus costatus* (Curimbatá-pioá) e *Prochilodus argenteus* (Curimbatá-pacú) (Characiformes); *Conorhyncus conirostris* (Pirá) e *Pseudoplatystoma corruscans* (Surubim) (Siluriformes) (GODINHO; GODINHO, 2003; COSTA, 2006).

Esse grupo de vertebrados é importante não só pela quantidade de espécies, mas também por ser uma relevante fonte de proteínas para várias comunidades humanas e, apesar da grande importância dos peixes para o homem, pouco se conhece sobre sua diversidade. Estima-se que 20% da ictiofauna de água doce do mundo esteja extinta ou ameaçada (HATANAKA, GALETTI JR, 2003; ASHIKAGA, 2008).

Em várias partes do mundo o manejo da ictiofauna, seja ele no conceito da conservação da biodiversidade ou pela manutenção e incremento da produção pesqueira, tem forte apelo sócio-econômico e ambiental. Por isso mesmo tem sido alvo de grandes esforços em conhecimento e recurso financeiro por parte das iniciativas públicas e privadas (SILVA, 2006).

A região do Baixo São Francisco possuía uma tradição histórica na atividade de piscicultura extensiva, quando os produtores da região utilizavam o ciclo anual de cheias para represar as águas do rio, capturando alevinos e peixes jovens que eram mantidos e manejados em canais e lagoas para posteriores despescas. Entretanto, desde a construção da represa de Sobradinho, a vazão do Rio São Francisco foi regularizada e esta atividade inviabilizada pela inexistência de cheias anuais. A partir da década de 1980, particularmente pelos esforços da iniciativa privada e de entidades como a CODEVASF e o IBAMA a piscicultura ganhou ênfase na região. De acordo com a CODEVASF (2004), existem mais de 1.000 ha de viveiros de piscicultura distribuídos em cerca de 370 propriedades, apenas no estado de Sergipe onde algumas espécies de peixe nativas do Brasil têm sido cultivadas. Dentre elas se destacam os curimatãs (*Prochilodus marggravii*, *P. costatus*, *P. argenteus*, *P. lineatus* e *P. vimboides*), também denominadas regionalmente de xira, curimbatá, curimatá, papa-terra e bambãs (COSTA, 2006; HATANAKA, HENRIQUE-SILVA, GALETTI JR, 2006).

O gênero *Prochilodus* spp. têm distribuição geográfica nas Bacias: Amazônica e Araguaia-Tocantins (*P. nigricans*), Prata (*P. lineatus*, *P. scrofa*, *P. platensis*) e São Francisco (*P. marggravii*, *P. affinis*, *P. vimboides*), na qual *Prochilodus costatus* (= *P. affinis* Valenciennes, 1850), é uma espécie endêmica da bacia do Rio São Francisco que foi introduzida na bacia do rio Jequitinhonha e as demais foram introduzidas nos açudes do Nordeste (COSTA, 2006). O *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) é originário das bacias nordestinas principalmente as cearenses sendo atualmente disseminado por todo o Nordeste e parte da região Sudeste (ARAÚJO, GURGEL, 2002).

A família Prochilodontidae constitui um dos mais importantes recursos pesqueiros da América do Sul e está distribuída em três gêneros e 13 espécies descritas que ocorrem em quase todas as grandes bacias da América do Sul (CASTRO, VARI, 2004; COSTA, 2006). Estes peixes têm como principais características morfológicas um focinho peculiar, boca subterminal em forma de ventosa, com lábios carnosos sobre os quais estão implantados numerosos dentes diminutos dispostos em fileiras. Seu corpo é fusiforme e comprido de coloração prateada-acinzentada, ventre e face brancos, e escamas ásperas. A altura do corpo e o comprimento variam com a espécie, podendo alcançar de 30 a 80 cm de comprimento total (Figura 2) (GODINHO, 2005; DE PAULA, 2006).



Figura 2: Exemplares de *Prochilodus* spp. (A) juvenil; (B) adulto. Fonte: Aquatrix®.

Os curimatãs são espécies detritívoras, alimentam-se de matéria orgânica e microrganismos associados à lama do fundo de lagos e margens de rios. São limnófagos (ou iliófagos) ingerindo grandes quantidades de lodo com matéria orgânica em fases avançadas de dissociação, juntamente com microrganismos, a partir de depósitos de fundo ou sobre substratos verticais, exibindo especializações anatômicas refinadas no trato digestivo, tais como, o estômago mecânico além do químico. Estes peixes são migradores e reofílicos (peixes de piracema), migram contra a correnteza dos rios para maturação das gônadas, necessitando de ambientes lóticos para desova. Sua periodicidade reprodutiva é sazonal com picos nos meses de novembro a fevereiro, realizam fecundação externa, desova total, alta fecundidade, não demonstrando cuidado com a prole (DE PAULA, 2006). A captura dessa espécie ocorre em grandes cardumes, sendo importantes comercialmente, principalmente para as populações de baixa renda, e desempenham papel importante na conservação dos rios neotropicais (GODINHO, 2005; COSTA, 2006).

A variação morfológica entre as espécies de *Prochilodus* spp. é reduzida e as grandes áreas de distribuição de cada espécie não têm sido caracterizadas adequadamente no sentido de avaliar o grau de variação intraespecífica e ecofenotípica uma vez que a taxonomia deste grupo tem sido notadamente problemática (RENNO *et al*, 2005). O estudo de Castro e Vari (2004) é uma excelente atualização sobre a questão sistemática neste

grupo de peixes, porém não esclarece as relações filogenéticas entre as espécies devido à pequena variação na morfologia externa. Com o desenvolvimento de métodos moleculares, várias análises têm sido realizadas a fim de gerar evidências genéticas que facilitem o estudo filogenético entre estas espécies e também estabelecer os padrões de variação intraespecífica (RENNO *et al*, 2005).

1.2. A pesca e a piscicultura no Estado de Sergipe

O Estado de Sergipe possui uma área territorial de 22.050 km², correspondente a 0,26% do território nacional, e população de aproximadamente 1.900.000 habitantes (MMA, 2007). Ao norte, o limite com Alagoas é definido pelo Rio São Francisco, a oeste e ao sul limita-se com a Bahia e, a leste com o Oceano Atlântico.

A pesca é uma das atividades mais importantes nessa região, constituindo-se em fonte de alimento, comércio, renda e lazer para grande parte de sua população, especialmente a que reside às margens do rio São Francisco. A complexidade da pesca no Baixo Rio São Francisco é alta, pois o predomínio de procedimentos artesanais na detecção do cardume e nas operações de captura é reflexivo nas variedades de apetrechos e estratégias de pesca. Coexistem quatro modalidades de pesca: a) a de subsistência, praticadas por grupos de famílias e pequenas comunidades; b) a pesca comercial destinada ao abastecimento dos centros urbanos regionais e praticada em geral por pescadores residentes nesses centros; c) a pesca em reservatórios, resultado da construção da hidroelétrica de Xingó; d) e a pesca esportiva, que tem como alvo o tucunaré (*Cichla* sp.) e o robalo (*Centropomus* sp.) (MMA, 2007).

Na região do Baixo São Francisco, no Estado de Sergipe existem 13 municípios (figura 3) onde a atividade da pesca é desenvolvida: Canindé do São Francisco, Poço Redondo, Porto da Folha, Gararu, Canhoba, Amparo do São Francisco, Telha, Propriá, Santana do São Francisco, Neópolis, Ilha das Flores, Pacatuba e Brejo Grande (fazendo divisa interestadual com o estado de Alagoas). Alguns municípios se destacam quanto ao volume de produção desembarcada, entre eles, Propriá e Neópolis, são considerados os maiores produtores de pescado do Baixo São Francisco (MMA, 2007).



Figura 3: Municípios do Estado de Sergipe na Bacia do Rio São Francisco. Fonte: CODISE, 2010.

Segundo dados do Ministério do Meio Ambiente (2007), além da pesca, outras atividades também são desenvolvidas nas localidades onde ocorrem desembarques de pescado, tais como o artesanato e a pecuária, onde na maior parte são de subsistência. Em geral, o pescado é de pequeno e médio porte (curimatã, piaui, tambaqui, mandi, traíra, piranha, pirambeta, pilombeta, tucunaré, dentre outros) é comercializado, principalmente, na forma resfriado inteiro. Outra forma de comercializar o pescado, em menor escala, é na forma eviscerada. Raramente o pescado é congelado (somente quando é comercializado para a capital ou outro estado). A maior parte do pescado é comercializada dentro dos próprios municípios. Apenas pequenas quantidades saem para a capital e outros municípios e alguns estados. Vale ressaltar que a comercialização do pescado no Baixo Rio São Francisco em sua maioria é feita por atravessadores com exceção da cidade de Propriá, único da região do Baixo São Francisco que possui um mercado de peixe.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 60% das doenças alimentares são relacionadas a práticas impróprias de higiene e processamento de alimentos e o pescado especificamente exige cuidados especiais na sua manipulação, preparo e armazenamento,

por ser muito perecível, principalmente quando comercializado *in natura*. No entanto, o conceito de qualidade para muitos pescadores e consumidores brasileiros, normalmente se limita a aparência geral do produto comercializado, como o aspecto viçoso e a ausência de trauma físico devido ao manuseio. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008), o peixe é um pescado em que se encontra uma das principais fontes de proteína do ser humano. Todavia, é também um dos alimentos mais suscetíveis à deterioração devido à atividade de água elevada, teor de gorduras insaturadas facilmente oxidáveis e, principalmente, um pH próximo à neutralidade, representando importante relevância em questões de saúde pública (ANVISA, 2008). No caso específico do *Prochilodus* spp., a morfologia do peixe também é responsável por sua maior propensão a deterioração a fresco, uma vez que este gênero apresenta especializações anatômicas do trato digestivo, como por exemplo, estômago mecânico além do químico e intestino mais longo em relação a outros peixes (DE PAULA, 2006).

A situação torna-se ainda mais problemática quando levamos em consideração o perfil dos manipuladores de pescado na região Nordeste, que desenvolvem uma atividade familiar de geração de renda. Esses manipuladores, principalmente aqueles que trabalham em mercados públicos ou pequenas peixarias, geralmente apresentam baixos níveis de escolaridade e, na maioria das vezes, carecem de conhecimentos necessários para a prevenção de riscos e perigos de contaminação alimentar. A preocupação higiênico-sanitária com o produto a ser comercializado, por outro lado, beneficiaria não só consumidor, que obteria produtos com maior segurança alimentar, mas possibilitaria a agregação de valor ao produto e, conseqüentemente, aumentaria a renda das famílias de pescadores que expõem seus produtos em bancas de mercado (CASTILHO-WESTPHAL *et al*, 2008).

De acordo com estudo realizado por Anjos *et al.* (2009) o curimatã-pacu representa metade das capturas realizadas no Baixo São Francisco. Esta espécie é o segundo peixe mais comercializado na feira livre de Penedo/AL, onde 70% do volume comercializado são oriundos das capturas no rio São Francisco, o restante vem de cultivos semi-intensivo de paragem acima do rio. Dessa forma o Curimatã-pacu, tem grande relevância para a população local, motivando pesquisadores, técnicos e produtores a refletir sobre as necessidades de ampliação, melhoramento do manejo e transferência de tecnologia a pequenos e médios produtores, incluindo a espécie no plantel de peixes cultiváveis na região.

De acordo com o IBAMA (2007) a produção estimada de peixes no estado de Sergipe no ano de 2007 foi de 520,5 t com valor da produção estimado em R\$ 1.761.700,00. Entre as principais espécies de peixes de água doces mais comercializadas na região, o curimatã

foi a espécie capturada em maior quantidade no ano de 2007 e vendido com preço médio/Kg a R\$ 3,50, conforme demonstrado na tabela 1.

Tabela 1: Principais espécies de peixes de água doce comercializadas no baixo São Francisco no Estado de Sergipe, produção e valores em reais. Fonte: IBAMA, 2007.

Principais Espécies	Preço Médio	Total	
	(R\$/Kg)	(t)	(R\$)
Curimatã-pacu (<i>Prochilodus spp.</i>)*	3,50	150,0	525.000,00
Tambaqui (<i>Colossoma spp.</i>)*	4,50	82,0	369.000,00
Tucunaré (<i>Cichla spp.</i>)*	4,50	65,0	292.500,00
Piau (<i>Leporinus elongatus</i>)*	2,50	77,0	192.500,00
Carpa (<i>Cyprinus carpio</i>)*	3,50	47,5	166.250,00
Traíra (<i>Hoplias malabaricus</i>)*	2,00	38,5	77.000,00
Tilápia (<i>Oreochromis spp.</i>)*	3,50	17,5	61.250,00
Piaba (<i>Astyanax spp.</i>)*	1,80	20,0	36.000,00
Piranha (<i>Pygocentrus spp.</i>)*	1,80	9,0	16.200,00
Pescada (<i>Plagioscion spp.</i>)*	3,00	0,5	1.500,00
Jundiá (<i>Rhamdia spp.</i>)*	2,00	0,5	1.000,00
Apaiari (<i>Astronotus ocellatus</i>)*	2,00	0,5	1.000,00
Acará (<i>Geophagus brasiliensis</i>)*	1,80	0,5	900,00
Outros	1,80	12,0	21.600,00

* A nomenclatura científica foi determinada conforme descrito por Barbosa e Ferraz (2009).

As atividades de criação de peixes em tanque-rede no Estado de Sergipe, na Bacia do Rio São Francisco concentram-se na região da hidroelétrica de Xingó no município de Canindé do São Francisco. No perímetro irrigado de Betume, no município de Neópolis, a CODEVASF mantém em funcionamento uma estação de piscicultura, que possui 38.146 m² de área de viveiros destinados à produção de alevinos de espécies de peixes de importância econômica e ecológica (MMA, 2007).

Contudo, não se teve nenhum cuidado na manutenção da integridade genética dos seus reprodutores, o que pode ter acarretado em endogamias e hibridismos muitas vezes involuntários, sem contar com a introdução de espécies de outras bacias. A introdução de espécies pode causar sérios desequilíbrios ambientais, não só pela competição direta por espaço e alimento com as espécies nativas, mas também através de sua hibridização, degradando a integridade genética das populações originais (MOREIRA *et al*, 2007).

A falta de conhecimento acerca dos aspectos reprodutivos, são sérios entraves a sustentabilidade da piscicultura no Baixo São Francisco de Sergipe, seja por falta de planejamento dos programas de seleção genética, seja pelo uso de número reduzido de indivíduos como reprodutores (MOREIRA *et al*, 2007)

A piscicultura é uma atividade econômica que demanda um investimento consistente, mas não muito elevado, de acordo com a produção a ser atingida e os tipos de peixes a serem criados. Para que o piscicultor possa atingir seus objetivos de produção, produtividade e lucratividade deve estar totalmente preparado ou devidamente assessorado para empreender esse negócio. A piscicultura intensiva, ou seja, desenvolvida em tanques ou lagos nos quais o produtor possa ter total controle da criação, deve ser praticada com rígidas normas zootécnicas e com a constante supervisão de técnicos especializados, para se ter uma produção de boa qualidade e, principalmente, que não ofereça risco de perda da integridade genética dos indivíduos cultivados (LORENZINI *et al*, 2005). Diante disso, conhecer as espécies que estão sendo cultivadas e quais apresentam melhores características zootécnicas para os sistemas de piscicultura praticados na região é imprescindível para se montar bancos genéticos de reprodutores e iniciar planos de cruzamento orientado das espécies cultivadas.

1.3. Diversidade Genética e Marcadores Moleculares

Diversidade, variação ou variabilidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos dentro de uma população e entender a distribuição da variação genética dentro e entre populações é necessário para a conservação de espécies (COSTA, 2008).

A reprodução de um grande número de peixes não garante que sua descendência possua alta variabilidade. É comum que na formação de estações de produção sejam utilizados peixes da própria estação. Isto pode favorecer o cruzamento entre reprodutores aparentados geneticamente (endogamia), aumentando a homozigose e reduzindo a variabilidade genética. A seleção casual (não intencionada) dos peixes para reprodução, também constituem um fator que pode reduzir a variabilidade genética das gerações seguintes (POVH *et al*¹, 2008; LOPERA BARRERO *et al*, 2008).

O conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento do manejo e conservação *in situ* e de repovoamento. Para isso, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como apenas uma população, ou como populações geneticamente diferentes e qual o grau de interação entre elas. No caso dos peixes de água doce, suas

populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar as trocas gênicas entre elas, o que leva a processos de diferenciação genética (RAMOS, 2007).

Segundo Foresti *et al* (2005), marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações, quer cativas quer selvagens. Esses marcadores permitem a verificação tanto de relações filogenéticas entre espécies quanto de segregação reprodutiva entre populações reprodutivamente isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum.

Os avanços na biologia molecular nas últimas décadas permitiram o desenvolvimento de uma variedade de métodos que poderiam ser utilizados no presente estudo. Contudo, estes diversos métodos apresentam vantagens e desvantagens, sendo que a definição do método ideal necessita ser feita caso a caso (GOMES, 2007).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização e amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e minissatélites ou locos VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microsatélite ou SSR (*Simple Sequence Repeat*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), o ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*) e o sequenciamento de DNA, sendo que todos dependem do método da reação em cadeia da DNA polimerase (PCR) (AFFONSO, 2004; COSTA, 2006; DE PAULA, 2006; CORTINHAS, 2007; GOMES, 2007 e SILVA, 2007²).

A técnica da PCR consiste, fundamentalmente, na amplificação de fragmentos de DNA pela ação de uma enzima denominada Taq DNA polimerase capaz de polimerizar moléculas de nucleotídeos, com base em uma fita molde de DNA. Para este procedimento, utiliza-se um equipamento conhecido como termociclador, que submete a amostra e reagentes a ciclos subseqüentes de temperatura variáveis, que permitem a desnaturação da molécula de DNA, o anelamento dos iniciadores e a extensão da síntese de uma nova fita complementar catalisada pela Taq DNA polimerase. Todas as variáveis envolvidas neste processo, tais como temperaturas, tempo de ciclagem, concentração de reagentes, sequência dos iniciadores ou primers, devem ser otimizados a priori em laboratório, pois variam conforme o tecido e a espécie de peixes sendo processada. (TORRES, MATOSO, ARTONI, 2004).

1.3.1 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

RAPD ou polimorfismo de DNA amplificado ao acaso é uma técnica especial da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) que utiliza iniciadores (*primers*) pequenos (cerca

de 10 a 11 nucleotídeos), de seqüência arbitrária (SALEM *et al*, 2007; ASHIKAGA, 2008). Cópias destes *primers* se anelam aleatoriamente a ambas as fitas do DNA produzindo ampliações de fragmentos de tamanhos diferentes, representando locos diferentes. Estes fragmentos são, então, visualizados através de eletroforese de gel de agarose e as bandas são avaliadas quanto a sua presença, ausência e compartilhamento entre animais distintos (FORESTI *et al*, 2005; YAZBECK, 2005).

A utilização da técnica *RAPD* deve-se, principalmente, a sua rapidez, baixo custo em relação às demais técnicas, pouco tempo para se obter resultados, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico para extração de DNA, não sendo necessário o conhecimento prévio do genoma (OKUMUS e CIFTCI, 2003; JAYASANKAR, 2004; GOMES *et al*, 2008; RAMOS, 2007, MASSAGO *et al*, 2009). Devido a essas peculiaridades, a técnica de *RAPD* vem sendo utilizada nas mais diversas áreas do conhecimento, tanto em estudos que consideram a estrutura genética de populações naturais, quanto de espécies domesticadas, incluindo aquelas oriundas da atividade de cultivo (FREITAS, 2003).

Williams *et al* (1993), caracterizaram como dominante o comportamento genético (segregação mendeliana) dos marcadores de *RAPD*. A principal limitação na utilização do marcador *RAPD* é justamente sua característica dominante, onde a presença da banda ocorre tanto para os genótipos homozigotos como para heterozigotos (figura 4), sendo difícil distinguir um genótipo do outro através da intensidade da banda produzida (FREITAS, 2003; ALI *et al*, 2005). Em razão disso, alguns modelos estatísticos foram desenvolvidos permitindo a estimativa de parâmetros populacionais com a utilização de marcadores dominantes. De acordo com tais modelos, deve-se assumir que os alelos dos diferentes locos não co-migram para a mesma posição em um gel e que os grupos populacionais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg (DE PAULA, 2006).

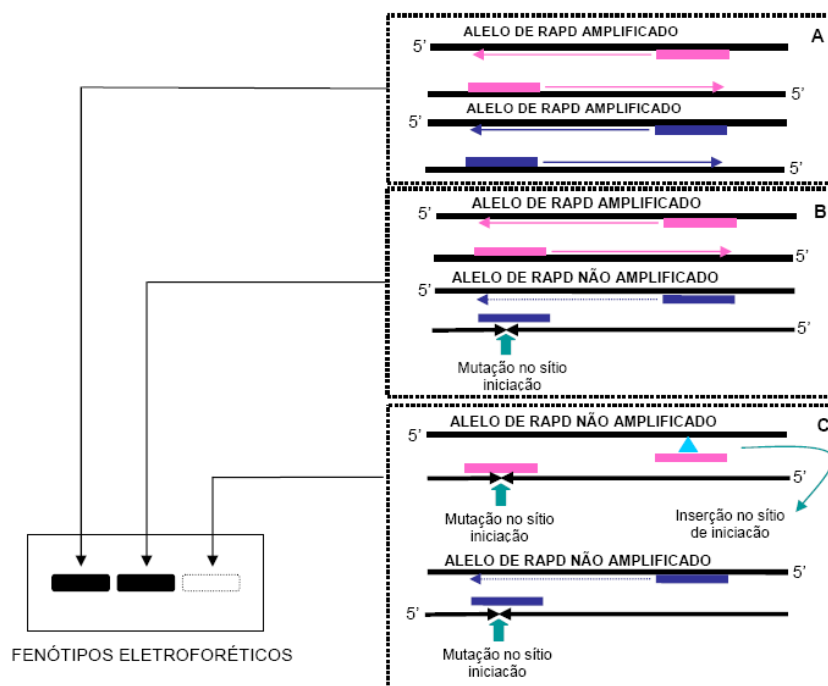


Figura 4: Comportamento “dominante” de marcadores *RAPD*. Os painéis (A, B e C) ilustram a correspondência que existe entre fenótipos *RAPD* no gel de eletroforese e respectivos genótipos. O fenótipo “presença de banda” (painéis A e B) pode corresponder a dois genótipos diferentes (homozigotos e heterozigotos). O painel C ilustra causas de fenótipo nulo (ausência de banda). Fonte: DE PAULA, 2006.

A estimativa da similaridade genética entre um genótipo e outro podem ser obtidos por meio de variáveis quantitativas ou dicotômicas. As medidas mais simples são aquelas relacionadas a variáveis dicotômicas, geradas por marcadores moleculares dominantes como o *RAPD*. Para estes marcadores, as observações de comparação entre dois genótipos são baseadas na presença (1) ou ausência (0) da banda no gel de eletroforese (FOWLER, 2008).

Os coeficientes não quantitativos são preferidos em estudos com marcadores dominantes, já que não se sabe a natureza molecular da ausência da banda no gel de eletroforese. Os mais utilizados em dados obtidos pelo marcador molecular *RAPD* são Jaccard, Sorensen-Dice e Nei e Li. Os valores do coeficiente de similaridade genética de Jaccard e de Nei e Li na elaboração de dendrogramas são idênticos (FOWLER, 2008).

Apesar de sua limitação, devido à sua alta capacidade de detectar polimorfismo de segmentos de DNA, este marcador vem sendo amplamente utilizado para o esclarecimento de vários aspectos da variabilidade genética, evolução, filogenia e fisiologia de espécies animais e vegetais (ALI *et al*, 2005; FORESTI *et al*, 2005; CORTINHAS, 2007).

Marcadores do tipo *RAPD* foram utilizados por Borges (2006), com o objetivo de avaliar a diversidade genética de 29 acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.). Nesse estudo o autor concluiu que apesar da existência de diversidade entre os genótipos de

amendoim para várias características morfológicas, houve pouca variação entre os grupos. Isso pode sugerir uma base genética estreita ou porque a capacidade de fixação biológica de nitrogênio é uma característica de caráter quantitativo, sendo difícil a observação de diferenças entre acessos próximos geneticamente.

Silva (2007)¹ utilizou marcadores *RAPD* com o objetivo de estudar a diversidade e estrutura genética de populações entre isolados do fungo *Phaeoisariopsis griseola* coletados nos estados de Minas Gerais e Goiás e demonstrou uma elevada variabilidade entre os isolados estudados, concluindo que essa variação foi maior dentro das populações e que as populações estão em equilíbrio de ligação.

Melo, Ciampi e Vieira (2009) analisando a variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) através de marcadores *RAPD* detectaram quatro agrupamentos consistentes, com índice de dissimilaridade variando entre 62 a 71%, demonstrando uma alta variação entre as populações estudadas. A expressiva variabilidade genética inter-populacional (35,7%) e intra-populacional (64,3%) configura-se em importantes informações para definição de uma estratégia de conservação desta espécie nativa do cerrado que se encontra em situação vulnerável a extinção.

Kamada *et al* (2009) estimaram a diversidade genética de populações naturais de ginseng (*Pfaffia glomerata*) oriundas da bacia do rio Paraná, por marcadores *RAPD* no qual obtiveram fragmentos polimórficos em quantidade e qualidade suficientes para estimar a distância dos indivíduos, observadas pela reprodutibilidade e repetibilidade do padrão dos fragmentos amplificados. As populações coletadas nas proximidades do rio Avaí, um dos efluentes do rio Paraná, apresentaram os maiores valores de diversidade dentro e entre as populações, indicando que sua preservação é prioritária em comparação as demais amostras de ginseng.

Magalhães, Martinez e Gaiotto (2007) estudaram a variabilidade genética de estoques comerciais do camarão *Litopenaeus vannamei*, por meio de marcadores *RAPD* em Canavieiras, BA. Eles observaram diferenciação genética significativa entre os estoques. Entretanto, as análises obtidas demonstraram não existir estruturação, mas considerável taxa de endogamia dentro dos estoques, em razão, provavelmente, do cruzamento entre indivíduos geneticamente similares.

Em peixes, o procedimento de *RAPD* tem sido usado de forma extensiva fornecendo dados sobre diversidade e diferenciações populacionais (CORTINHAS, 2007), incluindo alguns casos de distinção interespecífica e relações sistemáticas (HATANAKA; GALETTI JR, 2003). Em peixes neotropicais, os marcadores de *RAPD* têm sido úteis no manejo de espécies em localidades sob ação antrópica, relacionando-se os dados de variabilidade genética com parâmetros ambientais e identificando estruturação de populações (PRIOLI *et al*, 2002; CORTINHAS, 2007).

Panarari (2006) demonstrou, através do uso de *RAPD*, a existência de diferenciação genética entre espécies de *Brycon orbignyianus* coletadas no rio Paraná quando comparadas com indivíduos da mesma espécie coletados na estação de piscicultura de Piracema em Maringá/PR. Nesse estudo, o autor concluiu que a ocorrência de maior polimorfismo genético em populações naturais é esperada, já que normalmente os cruzamentos se dão ao acaso e a possibilidade de consangüinidade é menor e que o alto grau de similaridade genética encontrado na população cultivada pode estar relacionado a fatores tais como o uso de poucos peixes reprodutores, o emprego de estratégias de reprodução inapropriadas, deriva genética e cruzamentos consangüíneos.

Povh *et al* (2008)² ao estudarem a diversidade genética de amostras de pacu do rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento demonstraram, através da técnica de *RAPD*, que o índice de diversidade genética de Shannon e a percentagem de fragmentos polimórficos foram superiores nos indivíduos capturados do Rio Paranapanema. A similaridade genética foi maior nos indivíduos do estoque de reprodutores e a análise mostrou que a maior parte da variação está dentro de cada grupo (84,2%) e não entre os grupos (15,8%). Através dos parâmetros encontrados eles concluíram que há menor diversidade genética do estoque de reprodutores em relação aos indivíduos capturados do Rio Paranapanema.

Lopera Barrero *et al* (2008) analisaram a diversidade genética de dois estoques de alevinos de *Prochilodus lineatus* utilizados em programas de repovoamento, mediante o marcador molecular *RAPD*. Nesse estudo os sete iniciadores selecionados produziram um total de 77 fragmentos, dos quais 81,82% foram polimórficos. Os valores de variabilidade genética estimados pela porcentagem de fragmentos polimórficos (A= 83,12%; B= 81,82%) e pelo índice de diversidade genética de Shannon (A= 0,473; B= 0,463) mostraram que não existe uma alta diferenciação genética entre os dois estoques, possivelmente devido ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo.

Analisando a diversidade genética de quatro linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), através do marcador *RAPD*, Massago *et al* (2009) encontraram baixa porcentagem de fragmentos polimórficos (linhagem G: 18,52%; linhagem C: 19,75%; linhagem S: 20,99% e linhagem B: 24,79%). Os valores de distância e identidade genética (0,044 e 0,957 respectivamente) e o dendrograma demonstraram que as linhagens GxC são os mais semelhantes geneticamente. A similaridade genética foi alta dentro das linhagens (G: 0,932; C: 0,903; S: 0,891 e B: 0,900). Nesse trabalho eles concluíram que há uma alta variabilidade genética dentro das linhagens e uma baixa diferenciação entre cada linhagem.

Lopes *et al* (2009) utilizaram 10 iniciadores aleatórios de *RAPD* para avaliar a diversidade genética de 30 espécimes oriundos de estoques de reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) das pisciculturas de Boa Esperança e Vale Verde, localizadas no

Estado de Rondônia. Eles observaram que a porcentagem de fragmentos polimórficos e o índice de diversidade genética de Shannon foram altos nos dois estoques de reprodutores, porém a diferenciação genética entre os estoques foi baixa. Esses parâmetros foram confirmados pelo dendrograma, pois não houve separação dos espécimes dos estoques de reprodutores em grupos distintos. Eles concluíram que há alta variabilidade genética nos estoques de reprodutores, um pouco inferior no estoque de Vale Verde, e há grande proximidade genética entre os indivíduos dos estoques de reprodutores.

Garg *et al* (2009) aplicaram cinco primers aleatórios de *RAPD* com o objetivo de avaliar a diversidade genética de 20 espécimes do bagre *Mystus vittatus* oriundos de duas reservas (Bhadwada e Mohinisagar) na Índia. Os primers utilizados produziram um percentual de loci polimórficos de 64.98% e um percentual de loci monomórficos de 49.90% demonstrando variação inter e intrapopulacional.

2. REFERÊNCIAS

- AFFONSO, P. R. A. de M. Marcadores moleculares na análise de espécies e composição populacional de peixes marinhos de recife de corais da família Pomacanthidae (Perciformes). Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2004.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em: 02/06/2008 in: PRAZERES, A. GONDIM, A., SOUZA, E., ANDRADE, M. E. e BATINGA, V. T. S. Qualidade, conservação, manipulação e higienização dos peixes comercializados nos boxes do mercado público de São José em Recife-PE. Encontro de Ensino, Pesquisa e Extensão da Faculdade SENAC. 2009.
- ALI, B. A.; HUANG, T.; QIN, D. e WANG, X. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14: 443–453. 2005.
- ANJOS, G. M., MARTINS, A. S., SOARES, E. C., MELO, J., SANTOS, E. J. S., e DANTAS, L. H. N. Mortalidade no transporte de curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*). *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca* [Online] (3): 3. 2009. Disponível em: <http://ppg.revistas.uema.br/index.php/REPESCA/article/view/101/101>.
- ARAÚJO, S. A. de e GURGEL, H. C. B. Aspectos da biologia de *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte. *Rev. Bras. Zootecias*. 4 (1): 85-96. 2002.
- ASHIKAGA, F. Y. Estudo da estrutura genética de *Leporinus friderici* (Characiformes, Anostomidae) das escadas para transposição de peixes do complexo Canoas – rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2008.
- BARBOSA, J. e FERRAZ, K. Sistematização de nomes vulgares de peixes comerciais do Brasil: 1. Espécies dulciaquícolas. *Revista Brasileira de Engenharia de Pesca* [Online]. (3): 3. 2009. Disponível em: <http://ppg.revistas.uema.br/index.php/REPESCA/article/view/99>.
- BORGES, W. L. Análise da variabilidade genética e avaliação da fixação biológica de nitrogênio entre acessos de amendoim (*Arachis hypogaea* L.) Dissertação de mestrado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica/RJ. 2006.
- CASTILLO-WESTPHALL, G. G., FARIAS, H., YVANKIU, C., GIROTTO, M. V. F., OSTRENSKY, A. e BOEGER, W. Gestão da qualidade em mercados municipais de pescado. *Revista Aqüicultura & Pesca: 4º Anuário Brasileiro de Produtos e Serviços*. 2008.
- CASTRO, R. M. C. and VARI, R. P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. *Smithsonian Contributions to Zoology*. (622): 83 – 89. 2004.
- COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL E DE RECURSOS MINERAIS DE SERGIPE – CODISE. Mapa do território sergipano. Disponível em: www.codise.se.gov.br
- COMPANHIA DO DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DOPARNAÍBA – CODEVASF. Censo Aqüicultura. 2004. Disponível em: www.codevasf.gov.br.

CORTINHAS, M. C. da S. Análise da diversidade populacional de *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae) baseada em marcadores RAPD das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR), lagoa da Conceição e lagoa do Camacho (SC), lagoa dos Patos (RS), lagoa de Carapebus (RJ) e Barra Grande de Camamu (BA). Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 2007.

COSTA, F. R. da. Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. Campos dos Goytacazes/RJ. 2008.

COSTA, L. F. C. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do Rio São Francisco, na região de Três Marias (MG). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2006.

DE PAULA, F. M. Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas-rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2006.

FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; REVALDAVES, E; FORESTI, F. P. e SANTOS, S.A. Análise genética de estoques de reprodutores de curimatã (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da estação de piscicultura de promessa, utilizando marcadores de RAPD. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP. 2005.

FOWLER, J. A. P. Diversidade genética por marcador RAPD em populações naturais de *Pitocarpha angustifolia* Dusen ex Malme. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba/PR. 2008.

FREITAS, P. D. de. Estudo da diversidade genética em estoques de reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos/SP. 2003.

GARG, R. K.; SILAWAT, N.; SAIRKAR, P.; VIJAY, N. and MEHROTRA, N. N. RAPD analysis for genetic diversity of two populations of *Mystus vittatus* (Bloch) of Madhya Pradesh, India. African Journal of Biotechnology. 8 (17): 4032-4038. 2009.

GODINHO, A. L. Life history movements and spawning of San Francisco river fishies, Brazil. A dissertation submitted to the graduate of School of the University of Massachusetts Amherst in a partial fulfillment of the requirement for the degree of doctor of Philosophy. Department of Natural Resources Conservation. Wildlife and fisheries conservation. 2005.

GODINHO, H. P. e GODINHO, A. L. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC de Minas Gerais. SOGRAFE. 2003.

GOMES, P. C. Diversidade genética de três estoques de Piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá/PR. 2007.

GOMES, P. C.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARERO, N.; POVH, J. A.; VARGAS, L. e SIROL, R. N. Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. Maringá. 30 (2): 241-247. 2008.

HATANAKA, T. e GALETTI Jr., P. M. RAPD markers indicate occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. Genetics and Molecular Biology. 26 (1): 19-25. 2003.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F. & GALETTI JR, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*. (126):153–159. 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. Estatística da pesca – Brasil – grandes regiões e unidades da federação. Brasília/DF. Dezembro. 2007.

JAYASANKAR, P. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) fingerprinting resolves species ambiguity of domesticated clown fish (genus: *Amphiprion*, family: Pomacentridae) from India. Short communication. *Aquaculture Research*. (35):1006 – 1009. 2004.

KAMADA, T.; PICOLI, E. A. de T.; ALFENAS, A. C.; CRUZ, C. D.; VIEIRA, R. F. e OTONI, W. C. Diversidade genética de populações naturais de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen estimada por marcadores RAPD. *Acta Scientiarum Agronomy*. 31(3): 403-409. 2009.

LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; MANGOLIN, C. A.; BOSO, K. M. O. e GUALDA, T. 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. *Biosci. J.*, Uberlândia. 24 (4): 86-93. 2008.

LOPES, T.S.; STREIT Jr, D.P.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C. e QUEIROZ, J.R. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 61 (3): 728-735. 2009.

LORENZINI, L. M.; CALEGARI, O.; ECHHARDT, G. e LIMA, M. S. Piscicultura: importância socioeconômica no espaço agrário de Assis Chateaubriand/PR. Trabalho apresentado na VI Semana de Iniciação Científica na FECILCAM – Faculdade Estadual de Ciências e Letras de Campo Mourão/PR. 2005.

MAGALHÃES, M.; MARTINEZ, R. A. e GAIOTTO, F. A. Diversidade genética de *Litopenaeus vannamei* cultivado na Bahia. *Pesq. agropec. bras.* Brasília. 42 (8): 1131-1136. 2007.

MASSAGO, H.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA BARRERO, N. M.; POVH, J. A.; CASTAGNOLLI, N.; GOMES, P. C. Diversidade genética de quatro linhagens de *Oreochromis niloticus* utilizando o marcador RAPD. *Biosci. J.* Uberlândia. 25 (4): 150-159. 2009.

MELO, L. Q., CIAMPI, A. Y. e VIEIRA, R. F. Análise da variabilidade genética de arnica (*Lychnophora ericoides* Less. - Asteraceae) usando marcadores RAPD. *Acta bot. bras.* 23 (1): 259-266. 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. Programa de revitalização da bacia hidrográfica do rio São Francisco. Estatística de desembarque pesqueiro. Censo estrutural da pesca 2006. Relatório final. Brasília/DF. Abril. 2007.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V. da e SOUZA, V. R. de. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. *Pesq. agropec. bras.* Brasília. 42 (4): 521-526. 2007.

OKUMUS, I. & CIFTCI, Y. Fish population genetics and molecular markers: II- molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. Turkey. (3): 51-79. 2003.

PANARARI, R. de S. Variabilidade genética, evidenciada por marcadores nucleares e do genoma mitocondrial, de espécies do gênero *Brycon* (Characiformes: Characidae) de três bacias hidrográficas. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR. 2006.

¹POVH, J. A.; LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI Jr. E.; GOMES, P. C. e LOPES, T. S. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. Ciencia e Investigación Agraria. 35 (1): 5-15. 2008.

²POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C. e LOPES, T. da S. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. Pesq. agropec. bras. 43 (2): 201-206. 2008.

PRIOLI, S. M. A. P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO Jr., H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D. M. & PRIOLI, L. M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. Genetic and Molecular Biology. 25 (4): 421-430. 2002.

RAMOS, J. V. B. Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no complexo Canoas – rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2007.

RENNO, J. F., GARCÍA, C.; DUPONCHELLE, F. y NUÑEZ, J. Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica. Iquitos, Perú. 2005.

SALEM, H. H.; ALI, B. A.; HUANG, T. H.; QIN, D. N.; WANG, X. M. and XIE, Q. D. Use of random amplified polymorphic DNA analysis for economically important food crops. Journal of Integrative Plant Biology, 49 (12): 1670-1680. 2007.

SILVA, R. G. Análise da estrutura genética populacional do curimatã (*Prochilodus lineatus*, Characiformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP. Dissertação de mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo/SP. 2006.

¹SILVA, K. J. D. Variabilidade entre isolados de *Phaeoisariopsis griseola*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras/MG. 2007.

²SILVA, M. M. Caracterização da variabilidade genética do camarão *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931) em fazendas de produção da região de Canavieiras (BA). Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Santa Cruz. Ilhéus/BA. 2007.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A. e ARTONI, R. F. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de peixes neotropicais Publ. UEPG Biol. Health Sci. 10 (2): 27-37. 2004.

WILLIAMS, J.G.K.; HANAFEY, M.K.; RAFALSKI, J. A. & TINGEY, S. V. (1993). Genetic analyses using random amplified DNA markers. Pp. 704-740. In: Wu, R. (Ed.). *Methods in Enzymology, Recombinant DNA*. Academic Press. San Francisco. 218 (Part I).

YAZBECK, G. de M. Genética populacional de peixes migratórios. Relatório Técnico de Estágio de Doutorado no Exterior (Bolsa Sanduíche). Processo: 201280/2003-5. Maio. 2005.

**CAPÍTULO II – AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA
DE *Prochilodus spp.* NO BAIXO SÃO FRANCISCO/SE
ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RAPD-PCR**

AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Prochilodus* spp. NO BAIXO SÃO FRANCISCO/SE ATRAVÉS DA TÉCNICA DE RAPD-PCR

RESUMO

Nos sistemas de cultivo os cruzamentos são geralmente realizados com um número reduzido de indivíduos. Se estes indivíduos forem aparentados, pode ocorrer um aumento da consangüinidade na prole resultando na endogamia. O conhecimento da diversidade genética dos estoques naturais ou cultivados de peixes é de fundamental importância para o manejo correto destes estoques. Atualmente, os programas de aquicultura têm dado elevada importância às avaliações genéticas, com vistas não somente a ampliar a produção como também manter a diversidade genética dos mesmos. O presente trabalho propôs, portanto, avaliar fenotipicamente os espécimes de *Prochilodus* spp. cultivados e avaliar a diversidade genética das espécies de *Prochilodus* spp. utilizadas em piscicultura no Baixo São Francisco através da técnica de RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA"), onde se espera produzir conhecimentos que sirvam como instrumento norteador para a conservação e o uso sustentável deste recurso. Foram analisados 70 espécimes de estações de piscicultura do baixo São Francisco no estado de Sergipe. A análise taxonômica demonstrou que os espécimes coletados apresentam características fenotípicas de *Prochilodus argenteus* e que se houve hibridização, esta não foi passível de ser detectada morfolologicamente. Os percentuais de loci polimórficos obtidos variaram de 26.67% a 93.33%. Os índices de diversidade genética de Shannon variaram de 0.16 a 0.53, indicando baixa diferenciação intrapopulacional. Estes resultados foram corroborados pelos valores da matriz de distância e identidade genética de Nei e demonstrado graficamente no dendrograma de similaridade genética. De modo geral, foi possível observar por meio dos índices pareados de identidade genética que os produtores apresentam grande similaridade genética.

Palavras-chave: Piscicultura, *Prochilodus* spp, baixo São Francisco, RAPD.

ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY OF *Prochilodus* spp. IN THE LOWER SÃO FRANCISCO/SE THROUGH THE *RAPD-PCR* TECHNIQUE

ABSTRACT

In hatchery stocks crosses are usually made with a small number of individuals. If these individuals are related, may be an increase of inbreeding in the offspring resulting in inbreeding. The genetic diversity of natural and cultured stocks of fish is of fundamental importance for the correct management of these stocks. Currently, aquaculture programs have given high importance to the genetic evaluations, aiming not only to expand production but also maintain the genetic diversity of them. This paper therefore proposes to evaluate the genetic diversity of the species of *Prochilodus* spp. used in pisciculture at the Lower São Francisco through the *RAPD* ("Random Amplified Polymorphic DNA") technique, which is expected to produce knowledge that will serve as a guiding instrument for the conservation and sustainable use of this resource. Were analyzed 70 specimens of fish from the stocks in the Lower São Francisco at the state of Sergipe. The taxonomic analysis showed that the specimens show phenotypic characteristics of *Prochilodus argenteus* and that there was hybridization, it was not likely to be detected morphologically. The percentage of polymorphic loci obtained ranged from 26.67% to 93.33%. The indices of genetic diversity ranged from Shannon 0.16 to 0.53, indicating low intrapopulation differentiation. These results were corroborated by the values of the array of distance and Nei's genetic identity and shown graphically in the dendrogram of genetic similarity. Overall, it was observed by means of indices matched the genetic identity that producers have great genetic similarity.

Keywords: Pisciculture, *Prochilodus* spp., Lower São Francisco, *RAPD*.

1. INTRODUÇÃO

A região do Baixo São Francisco possuía uma tradição histórica na atividade de piscicultura extensiva, quando os produtores da região utilizavam o ciclo anual de cheias para represar as águas do rio, capturando alevinos e peixes jovens que eram mantidos e manejados em canais e lagoas para posteriores despescas. Entretanto, desde a construção da represa de Sobradinho, a vazão do Rio São Francisco foi regularizada e esta atividade inviabilizada pela inexistência de cheias anuais. A partir da década de 1980, particularmente pelos esforços da iniciativa privada e de entidades como a CODEVASF e o IBAMA a piscicultura ganhou ênfase na região e estima-se que existam mais de 1.000 ha de viveiros de piscicultura distribuídos em cerca de 370 propriedades, apenas no estado de Sergipe (CODEVASF, 2004).

Algumas espécies de peixe nativas do Brasil têm sido cultivadas na região, dentre as quais se destacam os curimatãs (*Prochilodus marggravii*, *P. costatus*, *P. argenteus*, *P. lineatus* e *P. vimboides*; Characiforme; Prochilodontidae), também denominadas regionalmente de Xira, Curimatã, Curimatá, Papa-terra e Bambas (CODEVASF, 2004; COSTA, 2006; HATANAKA, HENRIQUE-SILVA, GALETTI JR, 2006; LOPERA BARRERO *et al*, 2008). O curimatã é um peixe migratório, de desova total, fecundação externa sem cuidado parental e de hábito alimentar iliófago (DE PAULA, 2006). Esta espécie é endêmica das bacias formadas pelos rios Paraná e Paraguai, que atualmente apresenta uma diminuição na quantidade de populações naturais de peixes (LOPERA BARRERO *et al*, 2008).

Na região do Baixo São Francisco Sergipano existem 13 municípios onde a atividade da pesca é desenvolvida: Canindé do São Francisco, Poço Redondo, Porto da Folha, Gararú, Canhoba, Amparo do São Francisco, Telha, Propriá, Santana do São Francisco, Neópolis, Ilha das Flores, Brejo Grande e Pacatuba. Alguns municípios se destacam quanto ao volume de produção desembarcada, entre eles Propriá e Neópolis, que são considerados os maiores produtores de pescado do Baixo São Francisco (MMA, 2007).

De acordo com o IBAMA (2007) a produção estimada de peixes no estado de Sergipe no ano de 2007 foi de 520,5 t com valor da produção estimado em R\$ 1.761.700,00. Entre as principais espécies de peixes de água doces mais comercializadas na região, o curimatã aparece como a espécie capturada com maior produtividade no ano de 2007, sendo comercializada com preço médio/Kg de R\$ 3,50.

As atividades de criação de peixes em tanque-rede nesta região concentram-se na região da hidroelétrica de Xingó no município de Canindé do São Francisco. No perímetro

irrigado de Betume, município de Neópolis, a CODEVASF mantém em funcionamento uma estação de piscicultura, que possui 38.146 m² de área de viveiros destinados à produção de alevinos de espécies de importância econômica e ecológica (MMA, 2007).

Apesar dos esforços para o resgate da piscicultura na região, não se observou nenhum cuidado na manutenção da integridade genética dos seus reprodutores, o que pode ter acarretado processos de endogamias e hibridismos, muitas vezes involuntários, sem contar com a introdução de espécies de outras bacias (MMA, 2007), tornando-se necessário o manejo genético de progênies que direcionem os potenciais riscos genéticos, tais como a seleção dos reprodutores, acasalamentos e práticas de criação e liberação (LOPERA BARRERO *et al*, 2008). Para isso, as análises genéticas em estoques de pisciculturas representam informações importantes para alcançar resultados mais expressivos na produtividade e na manutenção da variabilidade das espécies piscívoras.

Marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações cativas e selvagens. Esses marcadores permitem a verificação tanto de relações filogenéticas entre espécies, quanto de segregação reprodutiva entre populações reprodutivamente isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (FORESTI *et al*, 2005).

Entre os vários marcadores moleculares desenvolvidos nos últimos anos, o marcador *RAPD* (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é um dos mais usados em estudos de genética de peixes, devido ao seu alto potencial de detecção de polimorfismo (ALI *et al.*, 2005; LOPERA BARRERO *et al*, 2008). Desta forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de *Prochilodus* spp cultivados no baixo São Francisco (SE) através do marcador *RAPD*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta das amostras

Foram selecionados ao acaso 95 espécimes de *Prochilodus* spp., oriundos de despesca de 17 estações de produção localizadas no baixo São Francisco no Estado de Sergipe (tabela 1), que foram fotografados (Kodak®) para identificação taxonômica no Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão/SE). Concomitantemente, foram seccionadas 95 amostras teciduais dos espécimes, acondicionadas em microtubos contendo solução de DMSO-EDTA e encaminhadas, em caixas isotérmicas, ao Laboratório de Biologia Molecular do Instituto e Tecnologia e

Pesquisa – LBM/ITP (Aracaju/SE) e armazenadas em freezer a -20°C para posterior extração do DNA.

Tabela 1: Produtores, localidade das estações de produção e origem dos alevinos.

Produtores	Municípios	Origem dos alevinos
A	Pacatuba/SE	Rio São Francisco/Piscicultura São Sebastião
B	Pacatuba/SE	CODEVASF-Estação Betume/IBAMA/Aquicultura Tropical
C	Brejo Grande/SE Ilha das Flores/SE	Rio São Francisco
D	Pacatuba/SE	Rio São Francisco/Piscicultura São Sebastião
E	Pacatuba/SE	Piscicultura São Sebastião/ IBAMA/ Aquicultura Tropical/ Rio São Francisco
F	Propriá/SE	Rio São Francisco/ Piscicultura São Sebastião
G	Propriá/SE	Piscicultura São Sebastião
H	Telha/SE	Piscicultura Jundiahy
I	Brejo Grande/SE	Piscicultura São Sebastião/Aquicultura Tropical
J	Propriá/SE	Rio São Francisco
K	Propriá/SE	Povoado Lagoa Comprida
L	Brejo Grande/SE Ilha das Flores/SE	Rio São Francisco
M	Pacatuba/SE	Rio São Francisco/ Piscicultura São Sebastião
N	Pacatuba/SE	Piscicultura São Sebastião/ IBAMA/ Aquicultura Tropical/ Rio São Francisco
O	Propriá/SE	Rio São Francisco/ Piscicultura São Sebastião
P	Telha/SE	Piscicultura Jundiahy
Q	Brejo Grande/SE	Piscicultura São Sebastião

2.2. Identificação Taxonômica

Os espécimes foram identificados por meio da contagem das escamas da fileira transversal, de origem da nadadeira dorsal à linha lateral, conforme descrito na chave de identificação das espécies de *Prochilodus* spp de acordo com Castro e Vari (2004).

2.3. Extração do DNA

Todos os métodos potenciais incluem um passo onde o DNA é extraído de amostras de tecido. Tal procedimento de extração de DNA consiste, basicamente, nas etapas de lise celular e precipitação das moléculas de DNA utilizando-se reagentes e temperaturas variadas. (TORRES, MATOSO e ARTONI, 2004; FORESTI *et al*, 2005).

O DNA total foi extraído conforme descrito por Sambrook e Russel (2001) e Marques (2003) com algumas modificações. Cerca de 100mg de tecido muscular ou branquial foi digerido em tampão de digestão (Tris-base 50mM, EDTA 100mM + SDS 0,5%/pH 8,0) contendo ainda, proteinase-K 20mg/mL (Biotools[®]) e mercaptoetanol. A mistura foi incubada em banho-maria a 65°C por oito horas a 12 horas para a digestão de tecido muscular e branquial, respectivamente. Após a digestão, o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), precipitado com isopropanol a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70% e etanol absoluto (ambos a 4°C), ressuspensionado em tampão TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA/ pH 8.0) e armazenado a -20°C.

2.4. Concentração, Grau de Pureza e Integridade do DNA

A estimativa da concentração do DNA presente em cada amostra foi quantificada em biofotômetro (Modelo 6131, Eppendorf[®]). A confirmação da pureza do DNA foi verificada pela razão das absorbâncias 260nm e 280nm para leitura do DNA e proteína, respectivamente, como também, em 260nm e 220nm para leitura do DNA e polissacarídeos, respectivamente (MARENGONI, MACHADO, GASPARINO, 2006). Após a quantificação, 6,5µL do material genômico foram corados com Blue Green Loading Dye (LGC/Biotecnologia[®]) e submetidos a uma corrida eletroforética, em gel de agarose 1,0%, a 90V/30 minutos em tampão TBE 1X (89mM Tris-base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA dissódico). Os géis foram visualizados em transluminador (sob luz UV) e fotografados por sistema de foto-documentação (Olympus[®]) para avaliação de sua integridade.

2.5. Análise da Diversidade Genética

2.5.1. Reação de Amplificação do DNA por *RAPD-PCR*

As condições de amplificação foram realizadas conforme descrito por Marques (2003), com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 25µL utilizando-se 2,8µM de cada *primer* aleatório com 10-mers (Alpha DNA[®]); 2,5U da enzima *Taq*-DNA polimerase recombinante (Invitrogen[®]); 2,5µL de buffer; 3,33mM de MgCl₂; 2,5mM de dNTPs (Invitrogen[®]); 5ng/µL de DNA molde e água ultrapura q.s.p. Um controle negativo (ausência de amostra de DNA) foi incluso em cada processo de amplificação.

As reações foram processadas em termociclador (Modelo MJ96G: BZ-001 - Biocycler[®]) programado para 35 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 94°C por quatro minutos e um passo de extensão final a 72°C por cinco minutos. Cada ciclo consistiu de desnaturação a 94°C por 40 segundos; anelamento a 41,2°C por um minuto; e extensão a 72°C por dois minutos. As amostras foram estocadas a -20°C para processamento posterior.

2.5.2. Análise Eletroforética dos Fragmentos Amplificados

Para visualização dos padrões de RAPD gerados, 7,5µL dos produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,7%, corados com Blue Green Loading Dye (LGC/Biotecnologia[®]). A eletroforese foi conduzida a 90V por uma hora e 20 minutos utilizando-se tampão TBE 1X (89mM Tris-base, 89mM ácido bórico e 2mM EDTA dissódico), sendo os géis visualizados em transluminador (sob luz UV) e fotografados por sistema de foto-documentação (Olympus[®]).

2.5.3. Análise dos Dados

Somente as bandas reprodutíveis e bem delineadas foram consideradas nesta etapa. O tamanho dos fragmentos obtidos com as amplificações foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb (Invitrogen[®], EUA) através do programa computacional *Gel Quant*[®]. A presença ou ausência de fragmentos de tamanhos moleculares medianos foi usada para a

construção de uma matriz binária, com base no cálculo no coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmento e 0 como sua ausência.

A variabilidade genética para cada estoque foi determinada pelo índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos. O Índice de Shannon varia de 0 a 1 e considera-se que, quanto mais próximo o valor for de zero, menor é a diversidade (SILVA, 2007). A divergência genética entre os estoques foi analisada através da distância genética de Nei (1972). Essas análises estatísticas juntamente com a determinação da distância e identidade genética (Nei) foram determinadas através do programa computacional *Pop Gen32*[®] (GOMES, 2007). A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, foi construído um dendrograma da distância genética, baseado em Nei (1972), pelo algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using an Arithmetic Average*) utilizando o programa computacional *NTSYS-PC 2.1*[®] (GOMES, 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Identificação Taxonômica

A análise por meio das imagens dos espécimes coletados demonstrou que os mesmos apresentaram cerca de 10 a 11 escamas na fileira transversal, de origem da nadadeira dorsal à linha lateral, sugerindo que os espécimes seriam todos *Prochilodus argenteus* e que, se houve hibridização, esta não foi passível de ser detectada morfologicamente (figura 1).

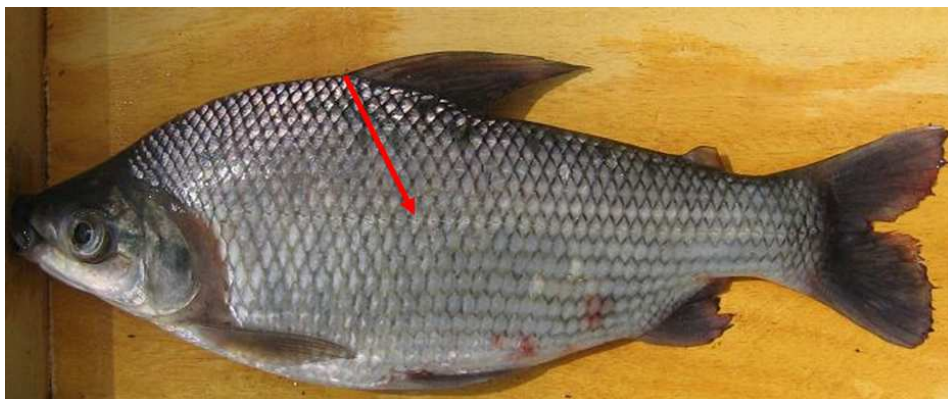


Figura 1: Contagem das escamas da fileira transversal. Fonte: Aquatrix.

3.2. Concentração, Grau de Pureza e Integridade do DNA

A concentração média do material genômico obtido foi de 191,4ng/μL com grau de pureza médio de 1,62 e 1,36 para a relação DNA/proteína e DNA/polissacarídeos, respectivamente.

Após a análise desses parâmetros, juntamente com a análise eletroforética da integridade do DNA, 73,7% das amostras coletadas (70 amostras) foram selecionadas para amplificação, por apresentarem melhor definição da banda gerada (figura 2).

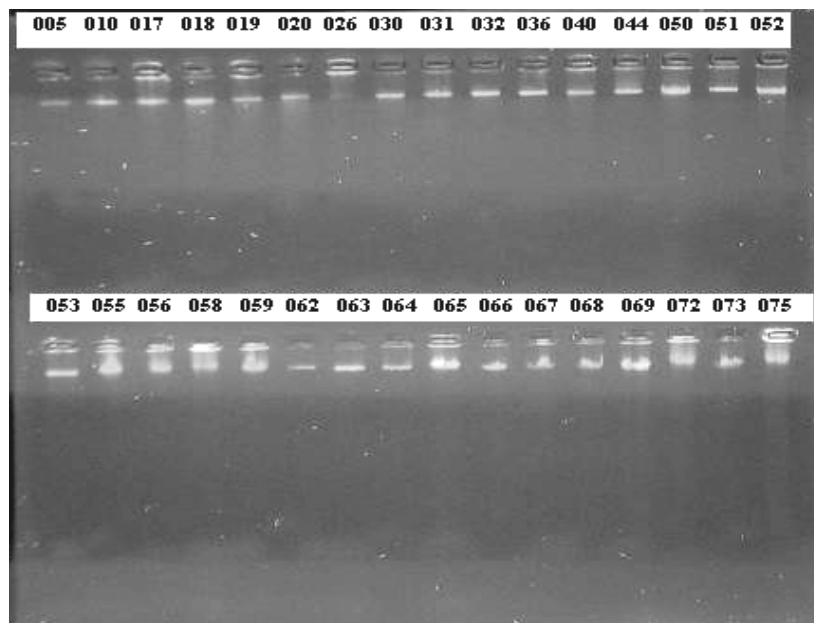


Figura 2: Perfil eletroforético da integridade dos DNAs extraídos.

3.3. Seleção dos primers RAPD

O DNA extraído de um espécime de *Prochilodus* spp. foi utilizado, em duplicata, para a seleção de *primers* que apresentassem o binômio maior número - melhor definição das bandas geradas para o estudo do gênero em questão. Foram testados 20 *primers* (figura 3) das séries OPA, OPP e OPR (Alpha DNA[®]).



Figura 3: Perfil eletroforético da amplificação dos 20 *primers* RAPD. (L) *ladder* – marcador de peso molecular; (P) *controle positivo* da eletroforese; (N) *controle negativo*; (1 a 6) *primers* da série OPA; (7 a 16) *primers* da série OPP; (17 a 20) *primers* da série OPR.

Entre os *primers* testados, cinco foram selecionados como marcadores para a análise de diversidade genética de acordo com a quantidade e definição dos fragmentos gerados. Na Tabela 2, são apresentadas as seqüências dos *primers* selecionados, o número de nucleotídeos e o número de fragmentos amplificados.

Tabela 2: Seqüência, nº de nucleotídeos e número de fragmentos amplificados dos *primers* RAPD, selecionados.

<i>Primers</i>	<i>Seqüência dos nucleotídeos (5'→3')</i>	<i>Nº de nucleotídeos</i>	<i>Nº de fragmentos</i>
OPA-03	AGTCAGCCAC	10	10
OPA-04	AATCGGGCTG	10	07
OPA-18	AGGTGACCGT	10	07
OPP-07	GTCCATGCCA	10	09
OPP-08	ACATCGCCCA	10	10

3.4. Gradiente de Temperatura de Anelamento

Após seleção dos cinco primers como marcadores, realizou-se teste de gradiente de temperatura de anelamento (que variou entre 30°C e 50°C) para cada um deles até estabelecermos a temperatura ideal de 41,2°C para os cinco primers. A análise deste gradiente e a otimização da temperatura de anelamento teve como objetivo minimizar as variáveis que possam afetar a reprodutibilidade do RAPD-PCR.

3.5. Análise da Diversidade Genética por RAPD-PCR

Foram obtidos 45 *loci* polimórficos, com os cinco primers utilizados, na amplificação do material genômico dos espécimes coletados das 17 estações de produção do Baixo São Francisco/SE. A análise dos perfis eletroforéticos de RAPD permitiram a obtenção de dados para a estimativa de parâmetros de diversidade genética para os grupos analisados (ver figuras em anexo). A figura 4 apresenta o percentual de loci polimórficos entre as amostras de *Prochilodus argenteus* analisadas por RAPD-PCR neste estudo.

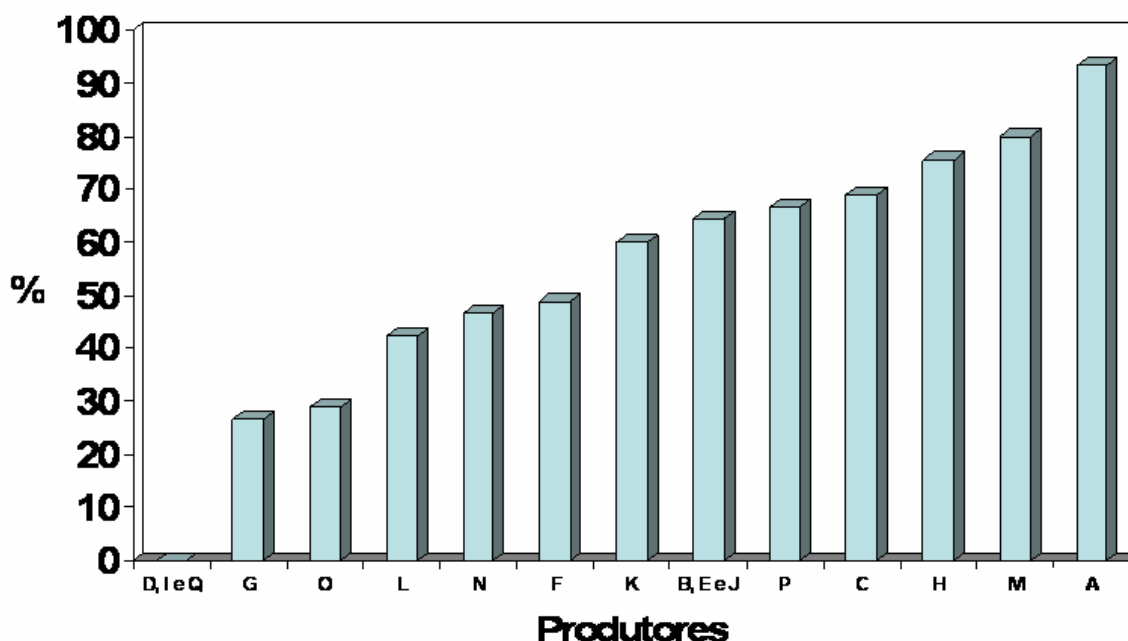


Figura 4: Percentual de loci polimórficos das amostras de *Prochilodus argenteus* do baixo São Francisco/SE.

Percentuais de loci polimórficos iguais a zero foram encontrados entre os peixes dos produtores D, I e Q; o que pode ser reflexo do pequeno número de espécimes analisados. Para os demais parâmetros ecológicos a mesma interpretação deve ser considerada.

Entre os demais produtores, o percentual de loci polimórficos foi de 26.67% (produtor G), 28.89% (produtor O), 42.22% (produtor L), 46.67% (produtor N), 48.89% (produtor F), 60.00% (produtor K), 64,44% (produtores B, E e J), 66.67% (produtor P), 68.89% (produtor C), 75.56% (produtor H), 80.00% (produtor M) e 93.33% (produtor A). Observa-se, portanto que entre estoques de *Prochilodus argenteus* cultivados na região do baixo São Francisco, a amplitude de variação polimórfica é bastante elevada e variável de 26,67% a 93,33%.

Os percentuais de loci polimórficos obtidos para os espécimes de *Prochilodus argenteus* dos produtores K, B, E, J, P e C são similares aos observados por De Paula (2006) em *Prochilodus lineatus* provenientes do complexo Canoas-rio Paranapanema (58.3% a 72.7%) através da técnica de RAPD. Entretanto, Lopera Barrero *et al* (2008), na análise de diversidade genética de estoques de alevinos de *Prochilodus lineatus* utilizados em programas de repovoamento no Paraná, observou percentuais de loci polimórficos mais elevados (81,82% e 83,12%), apesar de não haver diferenciação genética entre os mesmos.

Ao comparar o grau de polimorfismo com outras espécies de peixes cultivadas, observa-se que o polimorfismo de *Prochilodus argenteus* cultivado na região do baixo São Francisco sergipano pode ser considerado alto, com exceção do produtor G (26,67%). Sekine *et al.* (2002), utilizando marcadores *RAPD*, observaram que populações de pintado (espécie migradora) apresentaram percentuais de polimorfismo de apenas 27%. Massago *et al.* (2009), em estudo de diversidade genética de quatro linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com marcador *RAPD*, observou percentuais ainda menores, entre 18,52% a 24,79%.

Lopes *et al* (2009) numa análise de diversidade genética entre dois estoques de reprodutores de tambaqui, utilizando a mesma ferramenta metodológica deste estudo, obtiveram percentuais de loci polimórficos elevados (77% e 75%) intra-estoque e baixa variabilidade entre as duas estações de reprodução de peixes localizadas no norte brasileiro.

Assim como o percentual de loci polimórficos, o índice de diversidade genética de Shannon tem sido utilizado com sucesso na estimativa de níveis de diversidade genética em estoques e populações naturais de peixes neotropicais. Neste estudo os índices obtidos em ordem crescente foram de: 0.16 (produtores G e O); 0.26 (produtor L); 0.27 (produtor F); 0.28 (produtor N); 0.36 (produtor K); 0.38 (produtores B, C, J e P); 0.40 (produtor E); 0.42 (produtor H); 0.45 (produtor M) e 0,53 (produtor A). Considerados inferiores, com exceção dos produtores M e A, aos índices obtidos por Lopes *et al* (2009) numa análise de diversidade genética entre dois estoques de reprodutores de tambaqui mediante o marcador *RAPD* (A= 0.469; B= 0.440) e com o estudo realizado por Lopera Barrero *et al* (2008), na análise de diversidade genética de dois estoques de alevinos de *Prochilodus lineatus*

utilizados em programas de repovoamento mediante o marcador *RAPD* ($A= 0.473$; $B= 0.463$).

Estes resultados foram corroborados pelos valores de distância e identidade genética de Nei (tabela 3) e também de acordo com o dendrograma de similaridade genética (figura 30)

Tabela 3: Matriz de identidade genética (similaridade – diagonal superior) e de distância genética (dissimilaridade – diagonal inferior) (Nei, 1978) das espécies de *Prochilodus argenteus* cultivadas no baixo São Francisco/SE.

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Produtor A (1)	****	0.7593	0.7376	0.5866	0.7924	0.7002	0.6267	0.8165	0.5338	0.8042	0.7586	0.7469	0.8437	0.7421	0.6933	0.7690	0.5954
Produtor B (2)	0.2753	****	0.8298	0.7180	0.7960	0.8254	0.7373	0.7181	0.5973	0.7872	0.7703	0.7210	0.7538	0.7022	0.6459	0.7390	0.7459
Produtor C (3)	0.3044	0.1866	****	0.7840	0.8474	0.7522	0.6885	0.7004	0.6873	0.8096	0.8343	0.8110	0.7704	0.8070	0.7517	0.7610	0.6378
Produtor D (4)	0.5334	0.3313	0.2434	****	0.7608	0.7712	0.6459	0.5257	0.4889	0.6529	0.7096	0.5959	0.5720	0.6670	0.6522	0.6171	0.4889
Produtor E (5)	0.2327	0.2282	0.1656	0.2734	****	0.7398	0.6172	0.6881	0.6189	0.7894	0.7858	0.7638	0.7760	0.7443	0.6730	0.6873	0.5626
Produtor F (6)	0.3564	0.1918	0.2848	0.2598	0.3014	****	0.8225	0.7081	0.6090	0.7641	0.7467	0.6862	0.7179	0.7627	0.7262	0.7772	0.6702
Produtor G (7)	0.4673	0.3047	0.3732	0.4371	0.4826	0.1954	****	0.6821	0.5895	0.6918	0.7151	0.5978	0.7423	0.7273	0.7122	0.7474	0.7304
Produtor H (8)	0.2027	0.3311	0.3561	0.6431	0.4034	0.3451	0.3825	****	0.7031	0.8696	0.7775	0.6926	0.8340	0.7451	0.6931	0.8278	0.6961
Produtor I (9)	0.6278	0.5154	0.3749	0.7156	0.4798	0.4959	0.5630	0.3522	****	0.7586	0.6354	0.6246	0.6048	0.6736	0.6373	0.6917	0.6000
Produtor J (10)	0.2179	0.2393	0.2112	0.4264	0.2621	0.2690	0.3684	0.1397	0.2763	****	0.8507	0.7572	0.8308	0.8185	0.7424	0.8515	0.6707
Produtor K (11)	0.2762	0.2609	0.1812	0.3431	0.2411	0.2921	0.3353	0.2517	0.4535	0.1617	****	0.8338	0.8492	0.8105	0.7372	0.8205	0.6542
Produtor L (12)	0.2918	0.3271	0.2095	0.5177	0.2694	0.3767	0.5144	0.3672	0.4707	0.2782	0.1817	****	0.8430	0.7578	0.6566	0.7201	0.5471
Produtor M (13)	0.1699	0.2826	0.2609	0.5586	0.2536	0.3314	0.2980	0.1815	0.5029	0.1854	0.1635	0.1708	****	0.7734	0.7061	0.8058	0.6760
Produtor N (14)	0.2983	0.3535	0.2144	0.4049	0.2954	0.2709	0.3184	0.2942	0.3950	0.2002	0.2101	0.2773	0.2569	****	0.8811	0.8915	0.6499
Produtor O (15)	0.3663	0.4372	0.2854	0.4274	0.3960	0.3199	0.3394	0.3666	0.4505	0.2979	0.3048	0.4207	0.3480	0.1266	****	0.8842	0.6260
Produtor P (16)	0.2627	0.3024	0.2731	0.4827	0.3750	0.2520	0.2912	0.1890	0.3686	0.1608	0.1978	0.3283	0.2159	0.1149	0.1231	****	0.7412
Produtor Q (17)	0.5186	0.2932	0.4497	0.7156	0.5751	0.4002	0.3142	0.3623	0.5108	0.3995	0.4243	0.6031	0.3916	0.4309	0.4684	0.2994	****

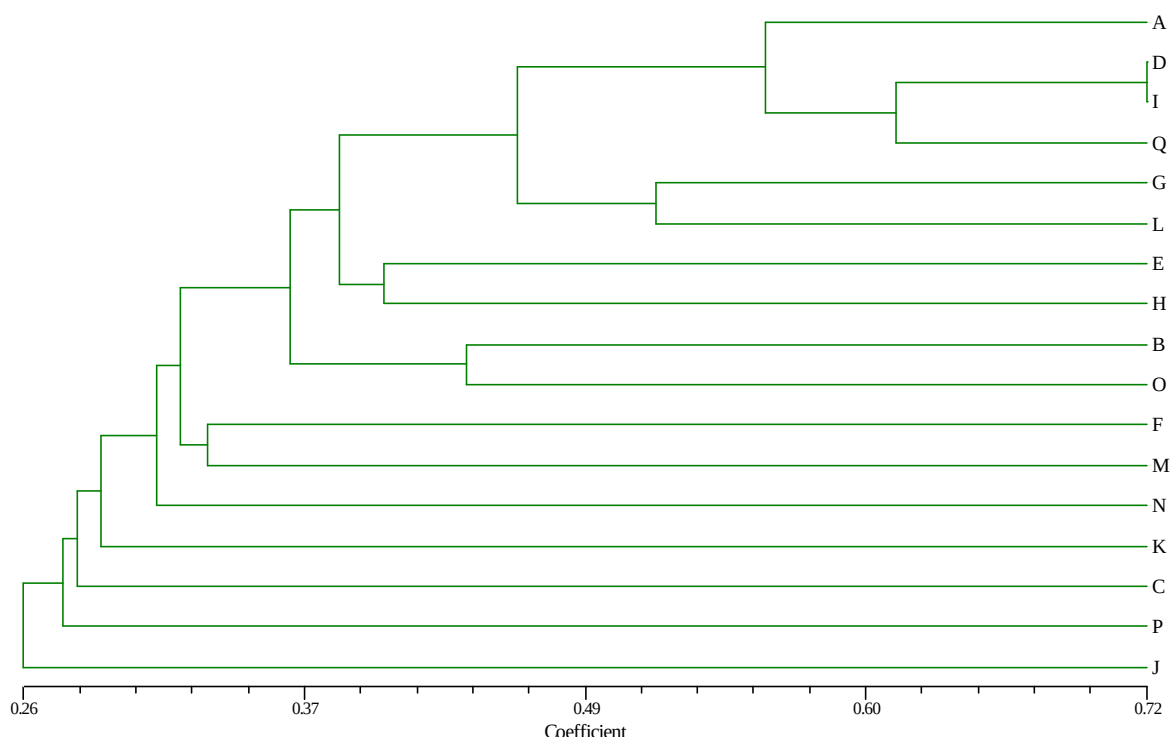


Figura 5: Dendrograma obtido pelo método de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average*) a partir da distância genética de Nei para *Prochilodus argenteus* dos 17 produtores selecionados (A a Q) do baixo São Francisco/SE.

Na figura 5 observa-se uma similaridade genética maior entre os espécimes dos produtores D e I, seguidos pelo produtor Q onde estes juntos são mais aparentados com os espécimes do produtor A. Os espécimes que apresentam uma similaridade genética menor em relação aos demais são os espécimes do produtor J. Este dendrograma mostra que os estoques de reprodutores não formaram grupos distintos, assim como a análise da diferenciação genética, indica grande proximidade genética entre os espécimes analisados.

De modo geral, é possível observar por meio dos índices de identidade genética que os peixes oriundos destes produtores apresentam baixa variabilidade genética. Tal fato pode estar relacionado ao número reduzido de fundadores destas populações na etapa de aquisição de alevinos, uma vez que estes têm origem de somente sete locais (tabela 1).

Alguns autores têm relatado que a diminuição da variabilidade genética em estações de piscicultura é de difícil reversão quando não existem práticas de manejo e cruzamento adequado entre progênies (WASKO *et al.*, 2004; SEKINO *et al.*, 2004). Os peixes cultivados em ambientes controlados podem estar expostos a uma diminuição da sua variabilidade genética devido ao cruzamento de indivíduos geneticamente aparentados e a práticas de manejo inadequadas, ocasionando homogeneização do componente genético dos descendentes (GOMES, 2007). Uma vez que a variabilidade genética é o atributo mais importante em uma população e constitui o material sobre o qual a seleção natural age,

supõe-se que uma população com variabilidade elevada terá maior possibilidade de enfrentar com sucesso as mudanças ambientais, melhor potencial reprodutivo, maior resistência à doenças, dentre outras características (SOUZA, 2007).

Em vista do panorama da piscicultura no baixo São Francisco sergipano, especificamente com relação à espécie *Prochilodus argenteus*, justifica-se um maior incremento a capacitação dos produtores nas etapas de manejo, em razão do elevado potencial econômico desta atividade econômica para geração de renda principalmente das comunidades locais do semi-árido.

4. CONCLUSÃO GERAL

- A análise morfológica demonstrou que os espécimes coletados apresentam características fenotípicas de *Prochilodus argenteus* e que se houve hibridização, esta não foi passível de ser detectada morfolologicamente;

- os parâmetros genéticos estimados por meio do marcador molecular *RAPD*, utilizado neste estudo para as análises de *Prochilodus* spp. utilizados em piscicultura no Baixo São Francisco demonstraram uma alta similaridade genética entre os diferentes grupos analisados, indicando a formação de uma única população de *Prochilodus* spp.;

- os estoques de produtores de *Prochilodus argenteus* obtiveram uma baixa diferenciação genética, devido possivelmente ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo.

5. REFERÊNCIAS

- ALI, B. A.; HUANG, T. H.; QIN, D. N. & WANG, X. M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. Rev. in Fish Biol. and Fish., 14: 443–453. 2005.
- CASTRO, R. M. C. and VARI, R. P. Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study. Smithsonian Contributions to Zoology. (662): 83 – 89. 2004.
- COMPANHIA DO DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E DO PARNAÍBA – CODEVASF. Censo Aquicultura. 2004. Em: www.codevasf.gov.br. Acessado em: 23/03/2007.
- COSTA, L. F. C. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do Rio São Francisco, na região de Três Marias (MG). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2006.
- DE PAULA, F. M. Diversidade genética de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes) das escadas de transposição de peixes das usinas hidroelétricas do complexo Canoas-rio Paranapanema. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina. Londrina/PR. 2006.
- FORESTI, F.; OLIVEIRA, C.; REVALDAVES, E; FORESTI, F. P. e SANTOS, S.A. Análise genética de estoques de reprodutores de curimatã (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da estação de piscicultura de promessa, utilizando marcadores de RAPD. Instituto de Biociências, UNESP, Botucatu-SP. 2005.
- GOMES, P. C. Diversidade genética de três estoques de Piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá. Maringá/PR. 2007.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F. & GALETTI JR, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. Genetica. (126):153–159. 2006.
- INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS – IBAMA. Estatística da pesca – Brasil – grandes regiões e unidades da federação. Brasília/DF. Dezembro. 2007.
- LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; VARGAS, L.; POVH, J. A.; GOMES, P. C.; MANGOLIN, C. A.; BOSCO, K. M. O. e GUALDA, T. 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. Biosci. J. Uberlândia. 24 (4): 86-93. 2008.
- LOPES, T.S.; STREIT Jr, D.P.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C. e QUEIROZ, J.R.. Diversidade genética de estoques de reprodutores de Colossoma macropomum. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 61 (3): 728-735. 2009.

MARENGONI, N. G.; MACHADO, M. R. F. e GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina. 27 (1): 99-106. 2006.

MARQUES, D. K. S. Caracterização genética do Pirarucu *Arapaima gigas* (Cuvier) (Teleostei, Osteoglossidae) da bacia Tocantins-Araguaia, Estado do Mato Grosso. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos/SP. 2003.

MASSAGO, H.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA BARRERO, N. M.; POVH, J. A.; CASTAGNOLLI, N.; GOMES, P. C. Diversidade genética de quatro linhagens de *Oreochromis niloticus* utilizando o marcador RAPD. *Biosci. J.* Uberlândia. 25 (4): 150-159. 2009.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. Programa de revitalização da bacia hidrográfica do rio São Francisco. Estatística de desembarque pesqueiro. Censo estrutural da pesca 2006. Relatório final. Brasília – Distrito Federal. Abril. 2007.

NEI, M. Genetic distance between populations. *The American Naturalist*. 106 (949): 283-291. 1972.

SAMBROOK, J. & RUSSELL, D. W. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Volume 1. Third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor. New York. 2001.

SEKINE, S. E.; PRIOLI, A.J.; PRIOLI, S.M.A.P.; JÚLIO Jr, H. F. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum*. (24): 507-512. 2002.

SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. Amsterdam. 233 (1-4): 163-172. 2004.

SILVA, K. J. D. Variabilidade entre isolados de *Phaeoisariopsis griseola*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Lavras. Lavras/MG. 2007.

SOUZA, M. E. Caracterização genética de reprodutores de tilápia: estratégias para manutenção da variabilidade. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife/PE. 2007.

TORRES, R. A.; MATOSO, D. A. e ARTONI, R. F. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de peixes neotropicais *Publ. UEPG Biol. Health Sci.*, Ponta Grossa, 10 (2): 27-37. 2004.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmers. *Journal of Applied Ichthyology*. Hamburg. 20 (1): 48-52. 2004.

CAPÍTULO III – CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através deste estudo foi possível verificar que:

- O parâmetro morfológico utilizado demonstrou que os espécimes estudados apresentam características fenotípicas de *Prochilodus argenteus*.

- Os parâmetros genéticos estimados por meio do marcador molecular RAPD, utilizado neste estudo para as análises de *Prochilodus* spp. utilizados em piscicultura no Baixo São Francisco/SE demonstraram uma alta similaridade genética entre os diferentes grupos analisados, indicando a formação de uma única população de *Prochilodus* spp.

- Comparando-se os dados obtidos através da identificação taxonômica, da análise genética através do RAPD e dos dados de origem dos alevinos observou-se uma baixa variabilidade genética entre os estoques de *Prochilodus argenteus*, devido possivelmente ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo.

- A reprodução de um grande número de peixes não garante que sua descendência possua alta variabilidade. É comum que na formação de estações de produção sejam utilizados peixes da própria estação. Isto pode favorecer o cruzamento entre reprodutores aparentados geneticamente, aumentando a homozigose e reduzindo a variabilidade genética.

- A caracterização do perfil genético da população mantida em cativeiro é de grande importância para uma piscicultura voltada à produção de alevinos. Tal abordagem determinará condutas de manejo mais adequadas para a homogeneização genética, objetivando reunir um bom potencial zootécnico do estoque de produção ou formar um estoque fundador para fins de repovoamento de variação genética na natureza. Diante disso, a presente pesquisa encontra-se na vanguarda acerca da caracterização genética de estoques piscícolas no Estado de Sergipe, visando estimar o quanto de contribuição genética um estoque cativo pode disponibilizar na produção de proteína animal, na geração de emprego e renda, bem como na mitigação de alterações ambientais, fruto do desenvolvimento humano desordenado.

- Estudos científicos adicionais, como o realizado no presente trabalho, devem ser propostos com o objetivo de auxiliar na indicação de atividades de manejo desses estoques ou até mesmo de estações de piscicultura em outros Estados.

ANEXOS

ANEXO A

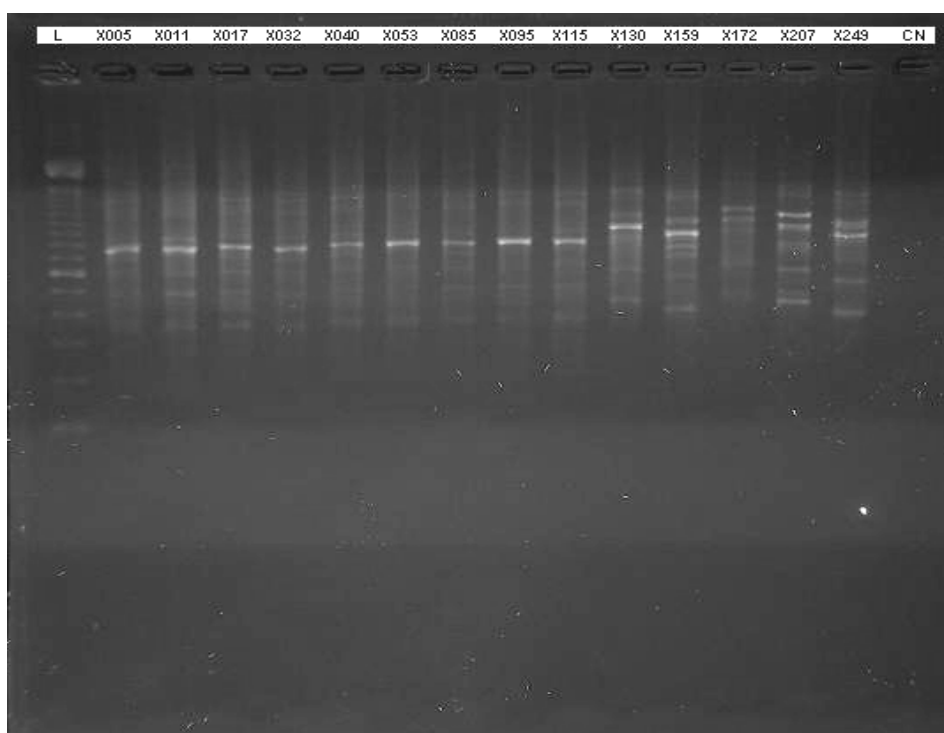


Figura 6: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-03. (L) *Ladder*; Amostras (X005 a X249); (CN) *Controle negativo*.

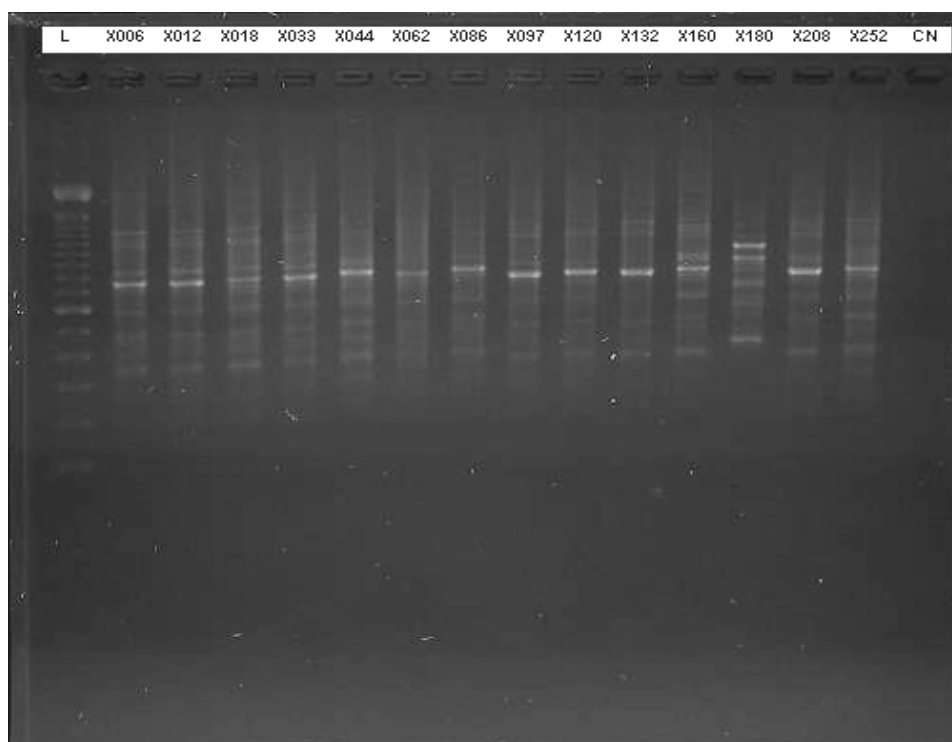


Figura 7: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-03. (L) *Ladder*; Amostras (X006 a X252); (CN) *Controle negativo*.

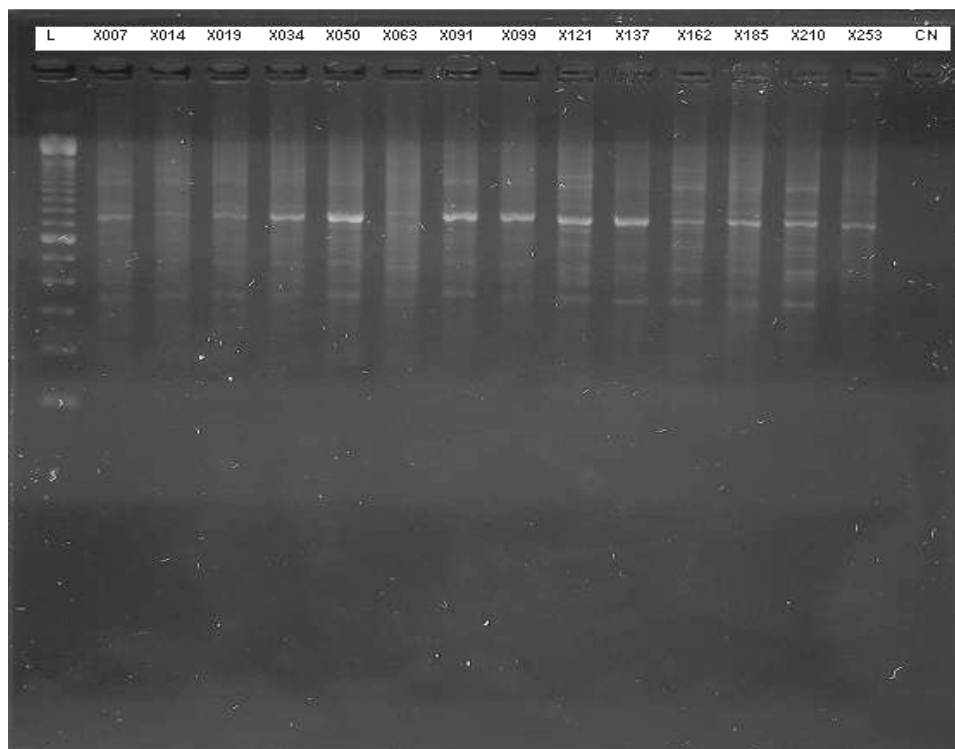


Figura 8: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-03. (L) *Ladder*; Amostras (X007 a X253); (CN) *Controle negativo*.

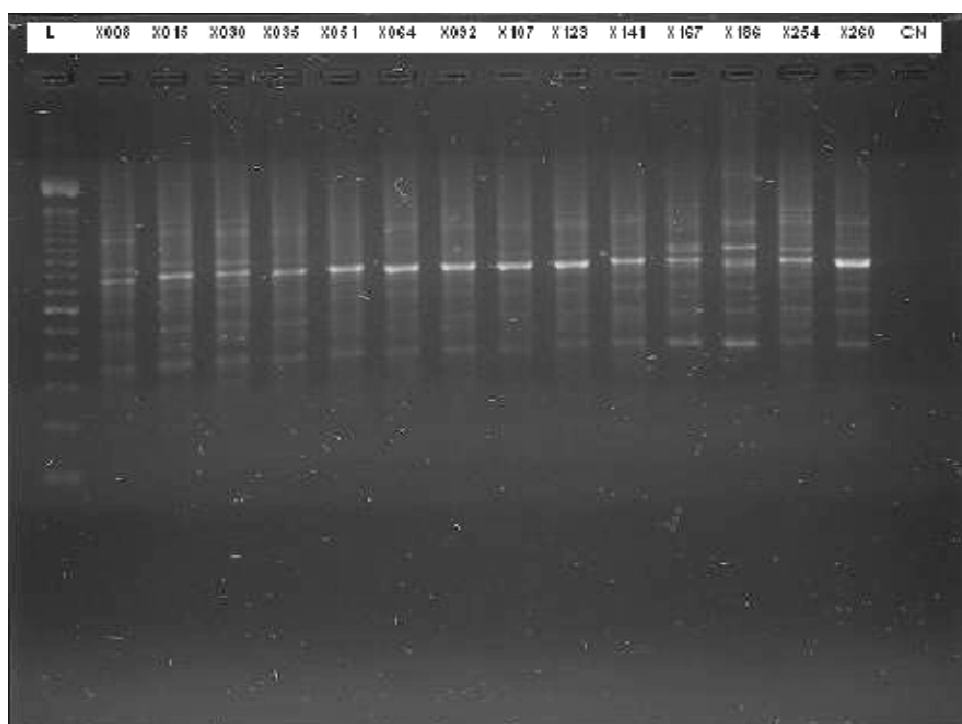


Figura 9: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-03. (L) *Ladder*; Amostras (X008 a X260); (CN) *Controle negativo*.

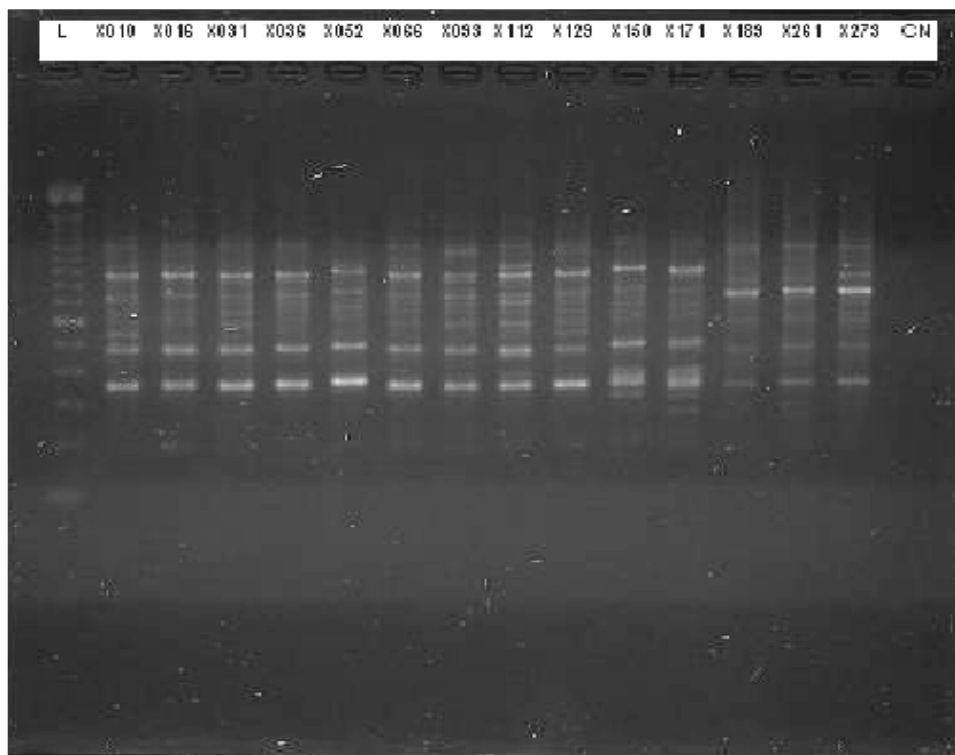


Figura 10: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-03. (L) *Ladder*; Amostras (X010 a X273); (CN) *Controle negativo*.

ANEXO B

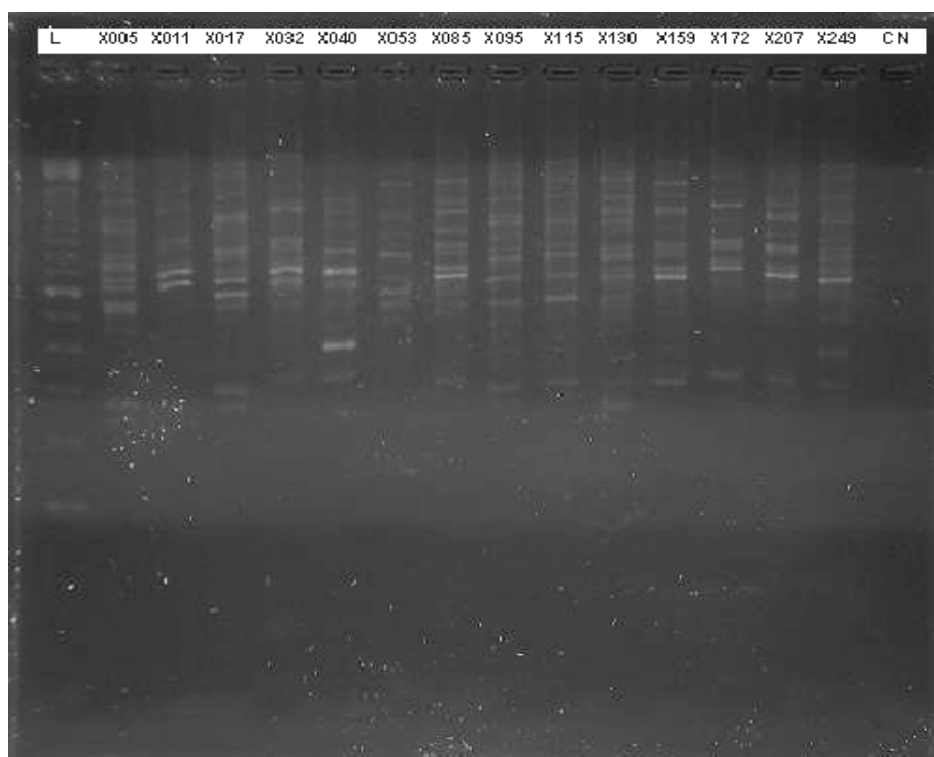


Figura 11: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-04. (L) *Ladder*; Amostras (X005 a X249); (CN) Controle negativo.

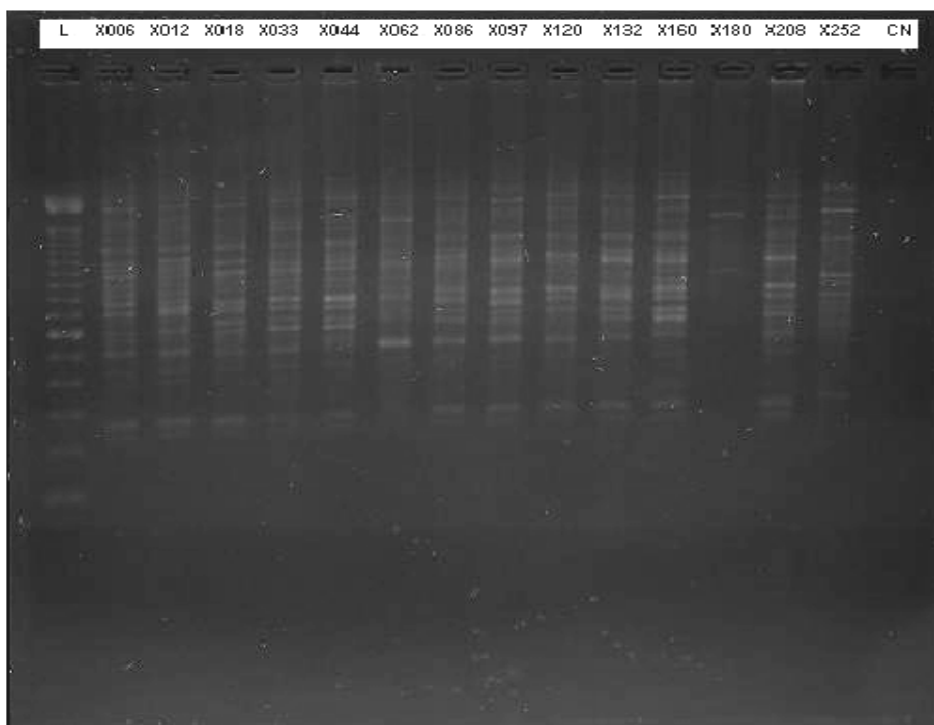


Figura 12: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-04. (L) *Ladder*; Amostras (X006 a X252); (CN) Controle negativo.

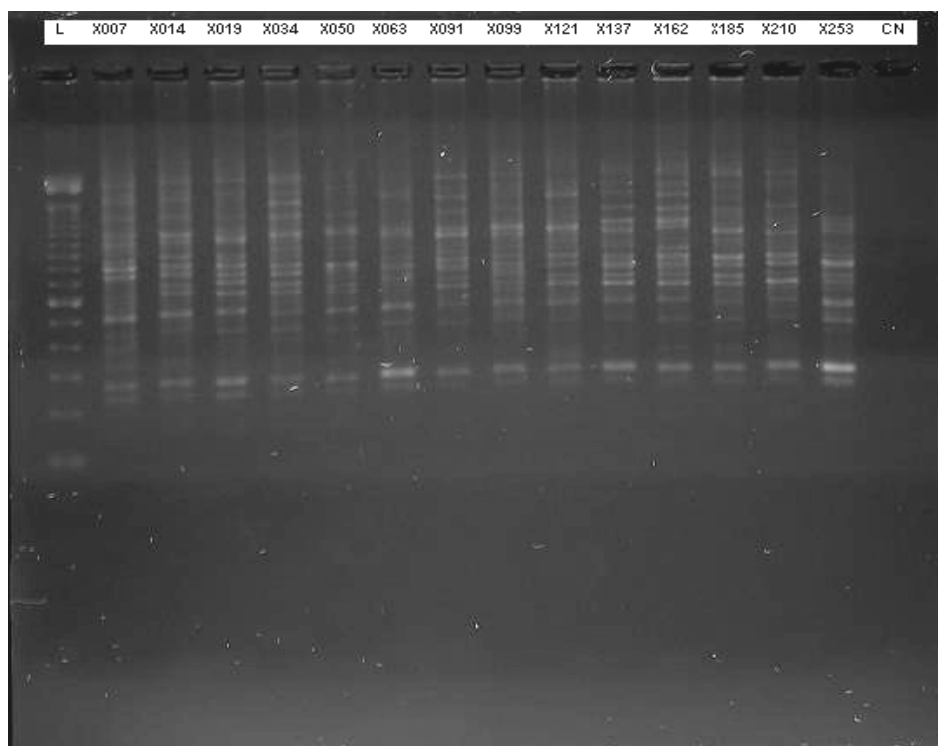


Figura 13: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-04. (L) *Ladder*; Amostras (X007 a X253); (CN) Controle negativo.

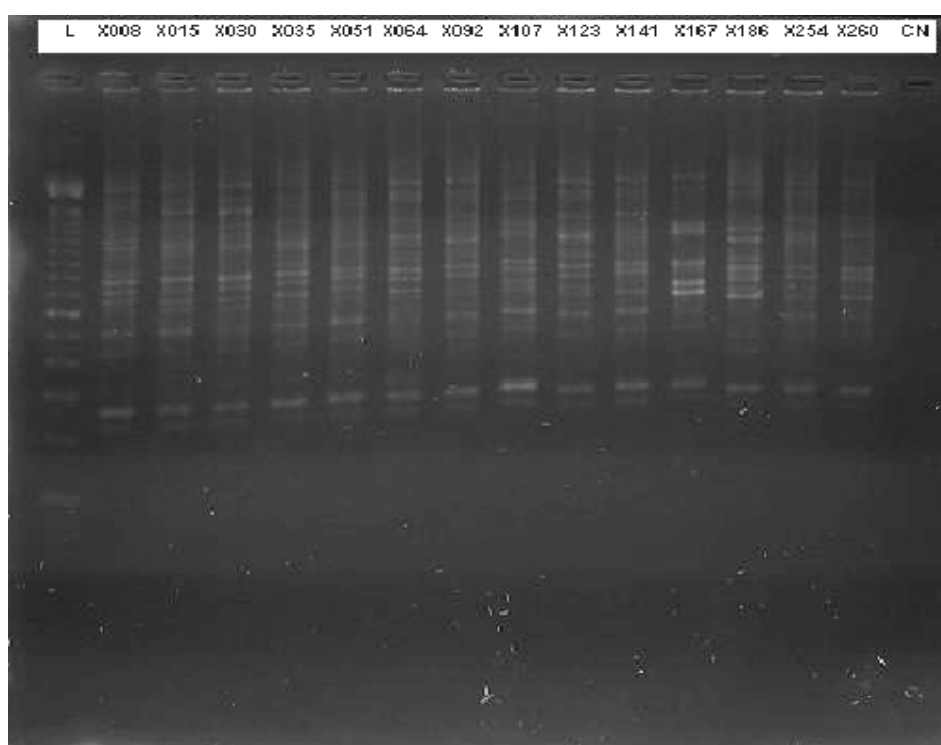


Figura 14: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-04. (L) *Ladder*; Amostras (X008 a X260); (CN) Controle negativo.

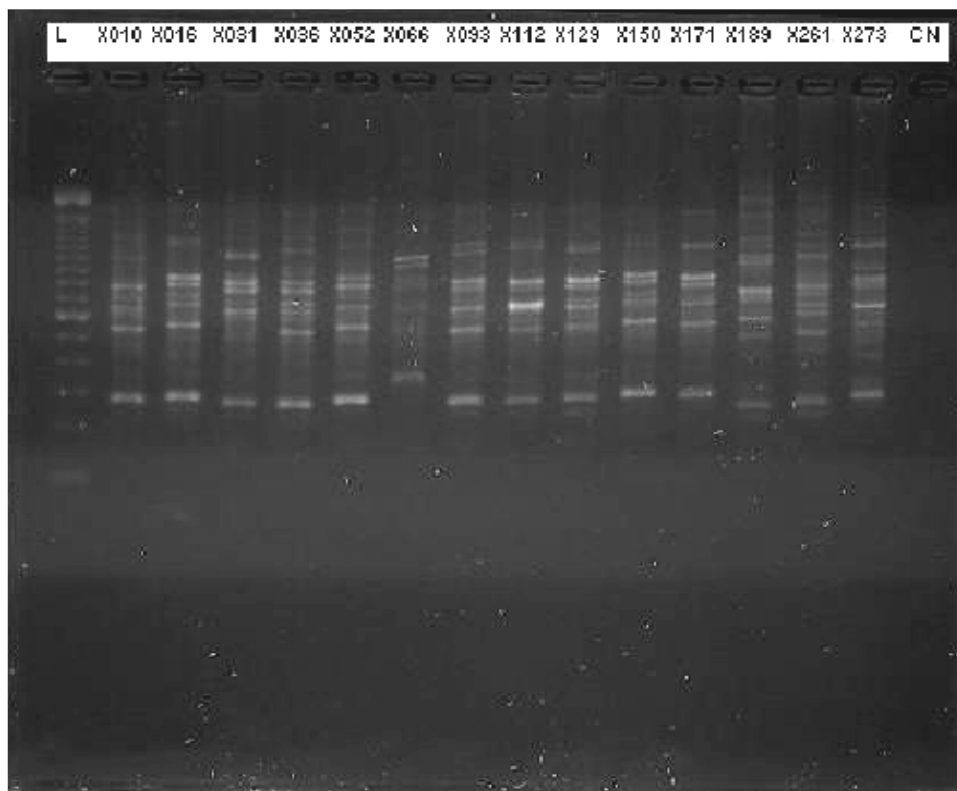


Figura 15: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-04. (L) *Ladder*; Amostras (X010 a X273); (CN) *Controle negativo*.

ANEXO C

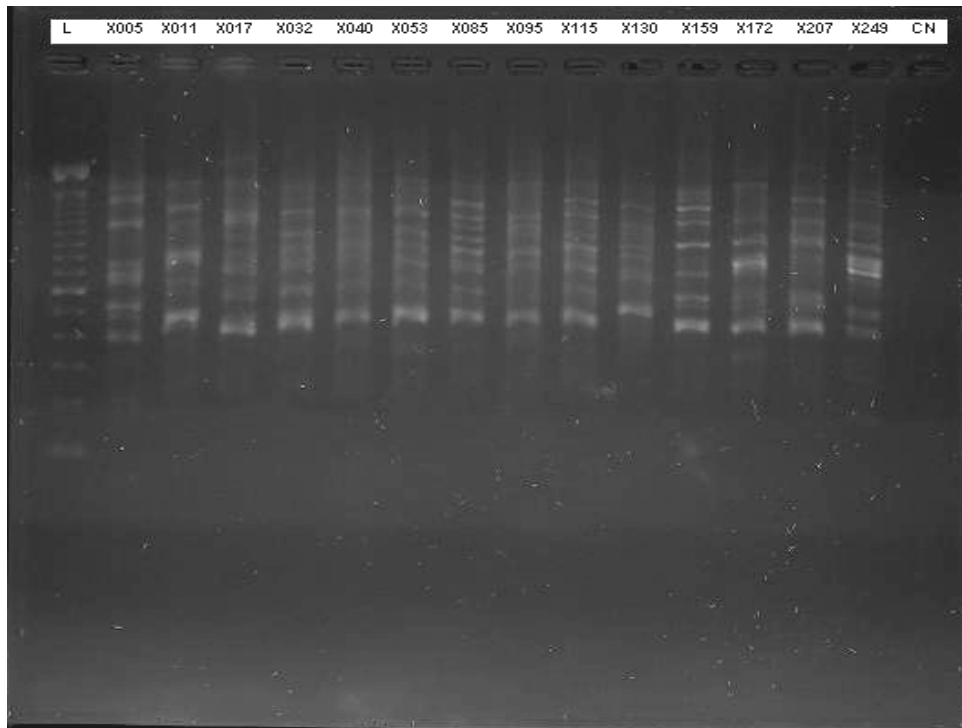


Figura 16: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-18. (L) *Ladder*; Amostras (X005 a X249); (CN) *Controle negativo*.

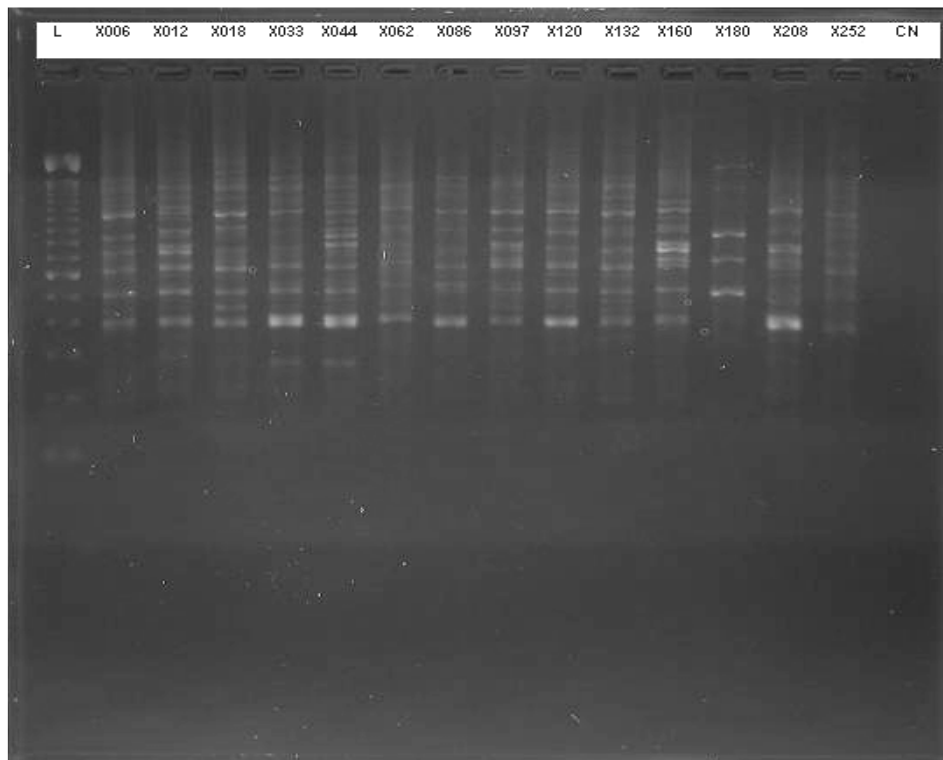


Figura 17: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-18. (L) *Ladder*; Amostras (X006 a X252); (CN) *Controle negativo*.

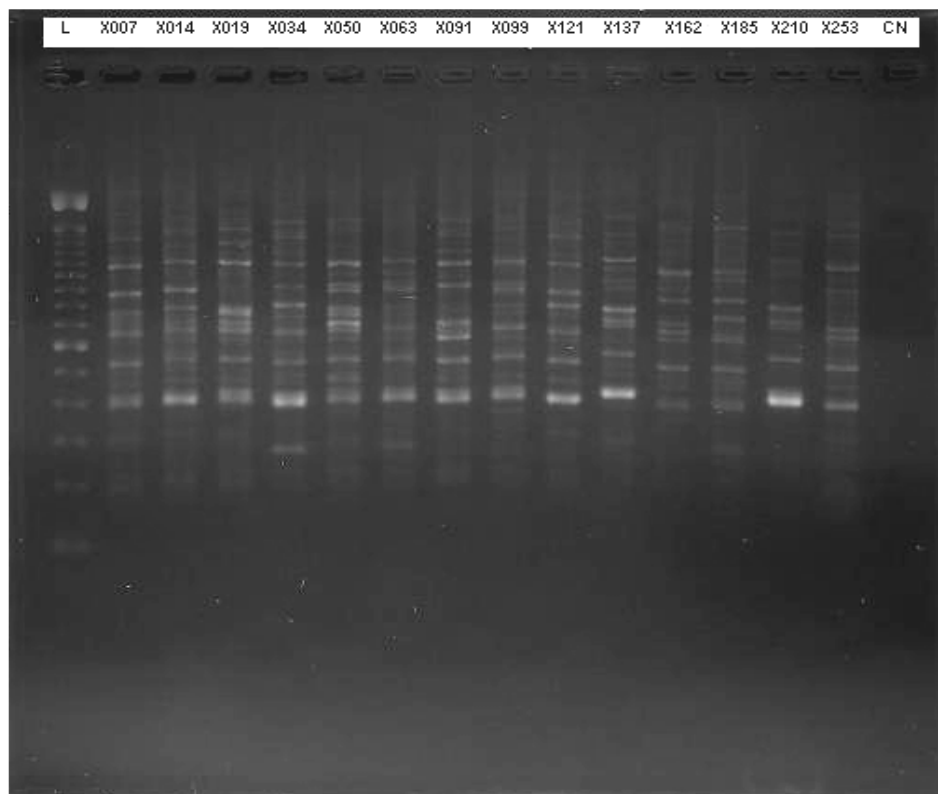


Figura 18: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-18. (L) *Ladder*; Amostras (X007 a X253); (CN) *Controle negativo*.

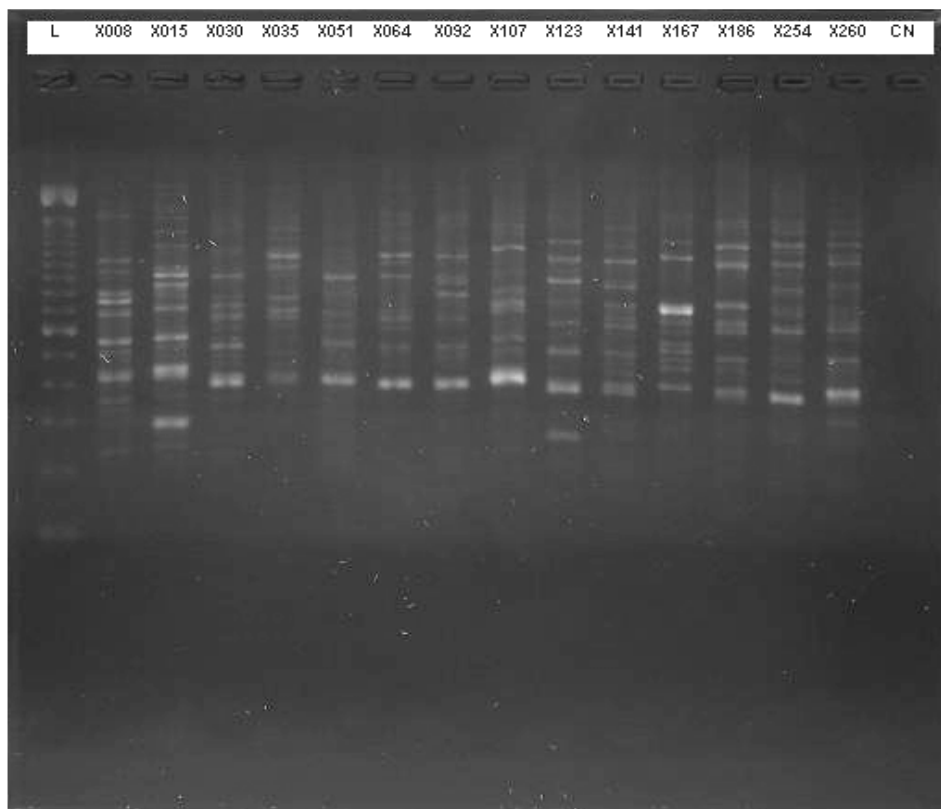


Figura 19: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-18. (L) *Ladder*; Amostras (X008 a X260); (CN) *Controle negativo*.

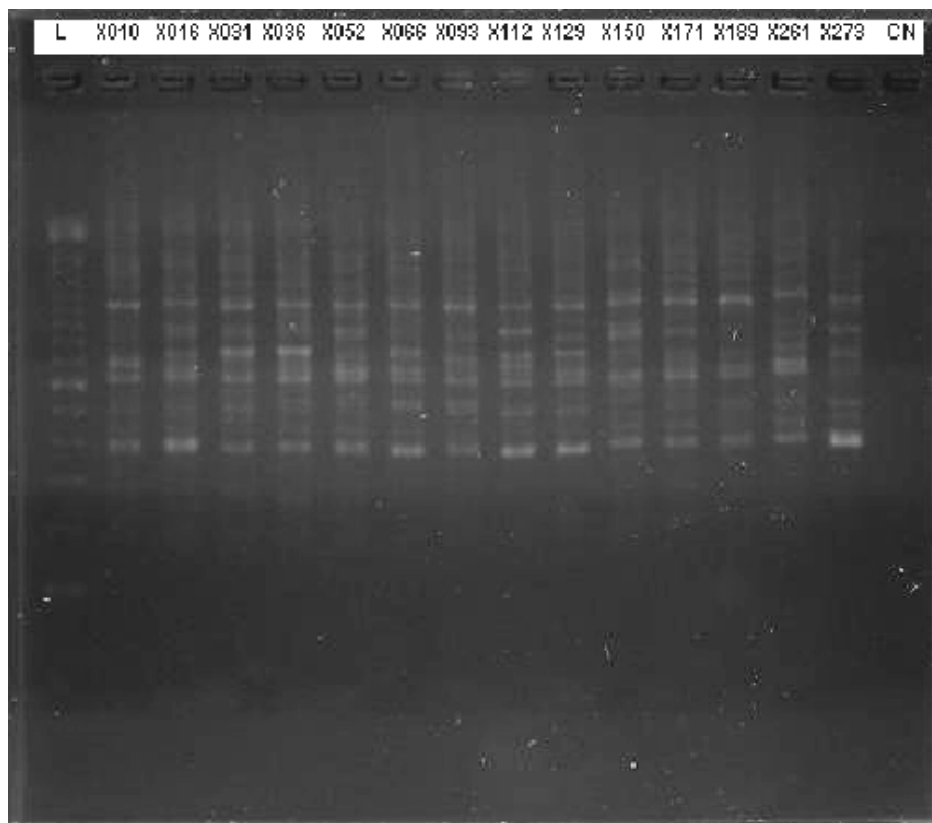


Figura 20: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPA-18. (L) *Ladder*; Amostras (X010 a X273); (CN) *Controle negativo*.

ANEXO D

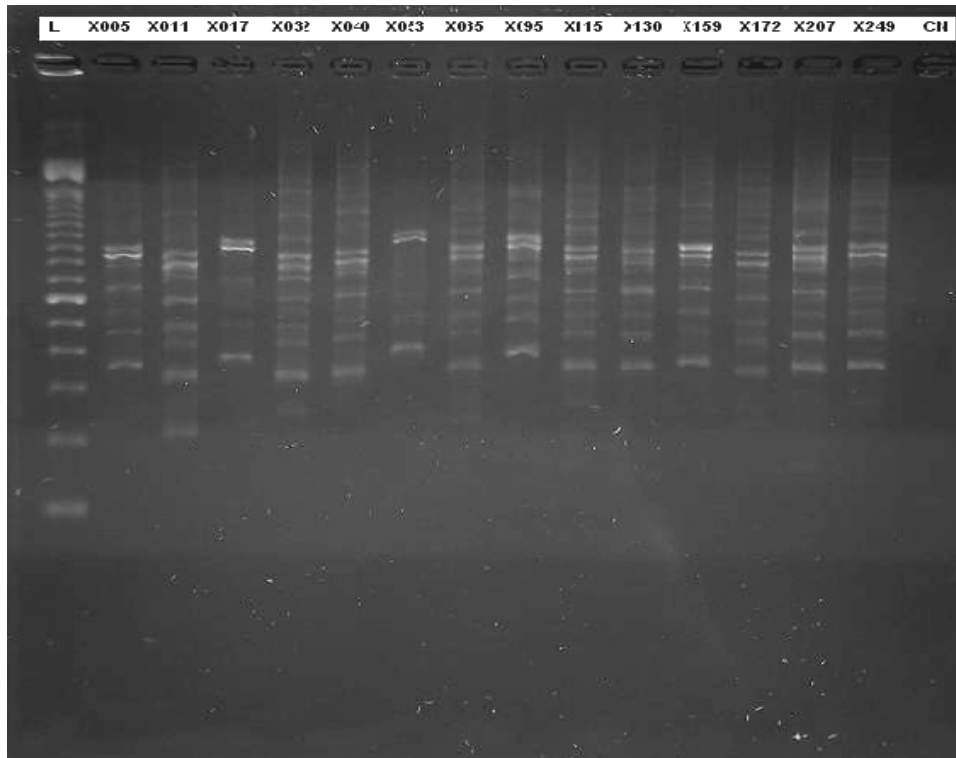


Figura 21: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-07. (L) *Ladder*; Amostras (X005 a X249); (CN) *Controle negativo*.

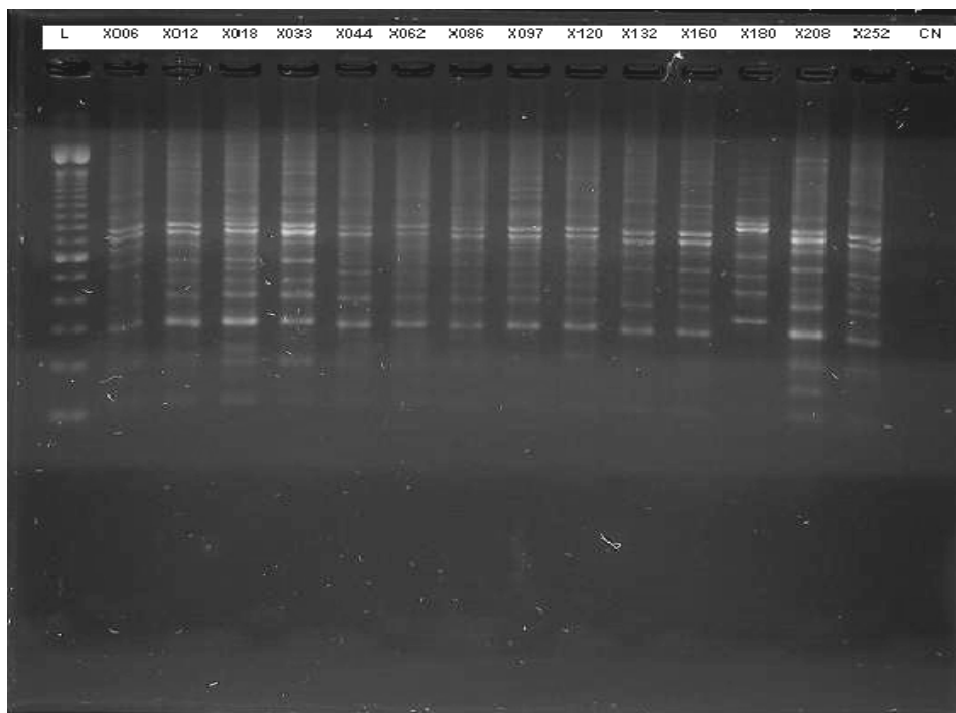


Figura 22: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-07. (L) *Ladder*; Amostras (X006 a X252); (CN) *Controle negativo*.

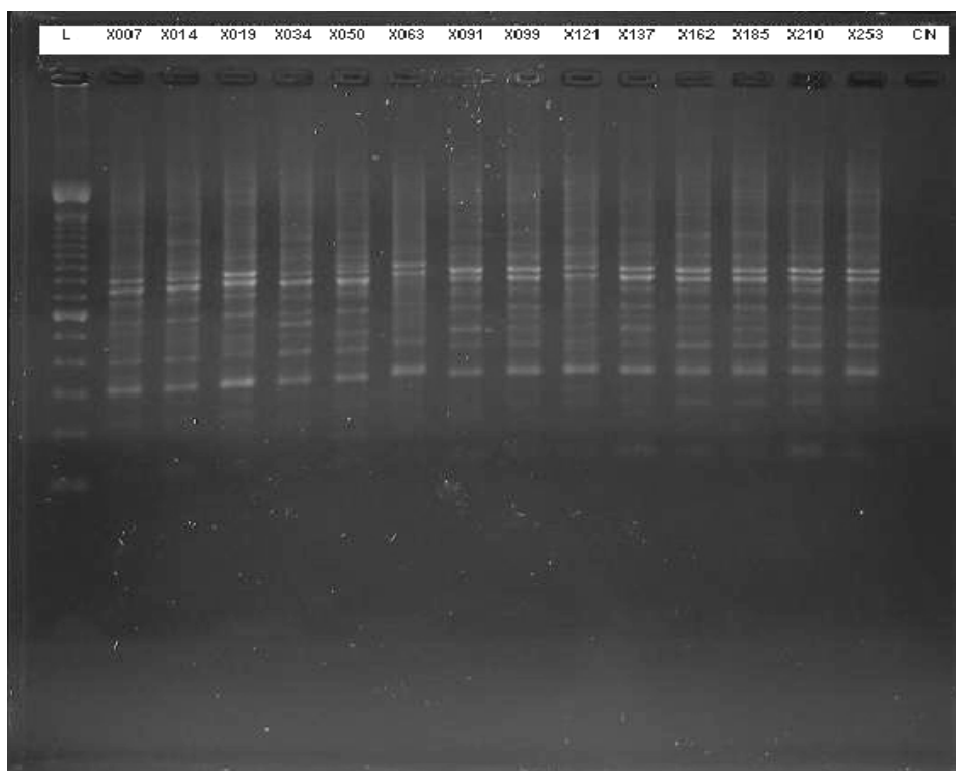


Figura 23: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-07. (L) *Ladder*; Amostras (X007 a X253); (CN) *Controle negativo*.

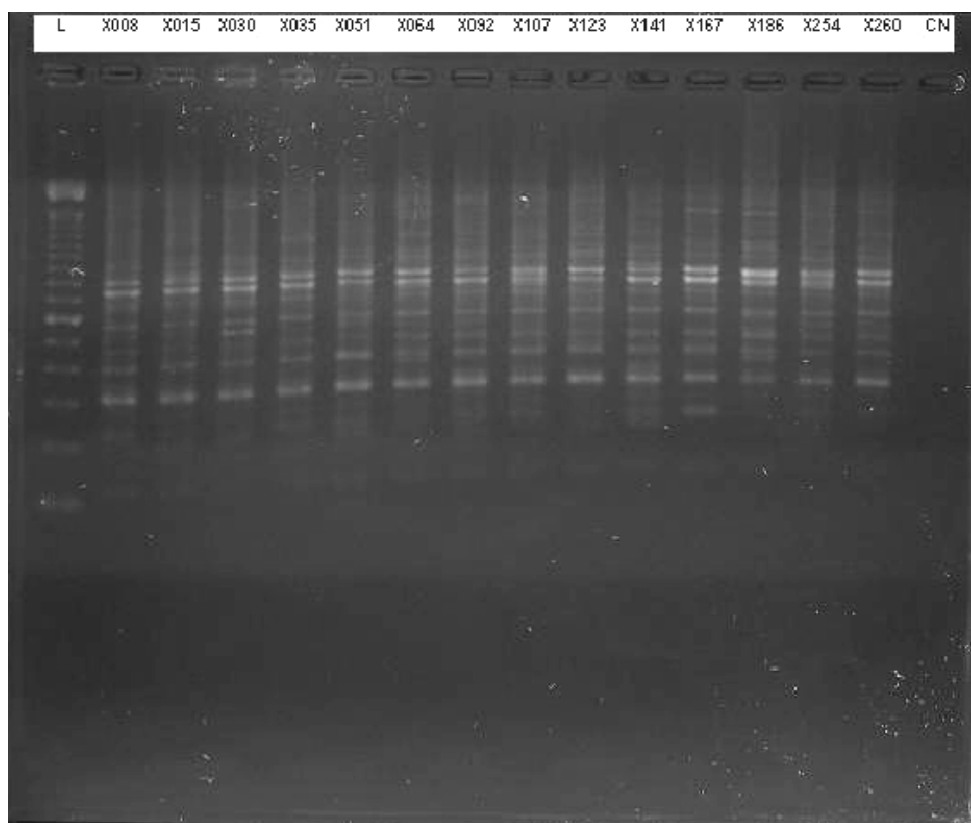


Figura 24: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-07. (L) *Ladder*; Amostras (X008 a X260); (CN) *Controle negativo*.

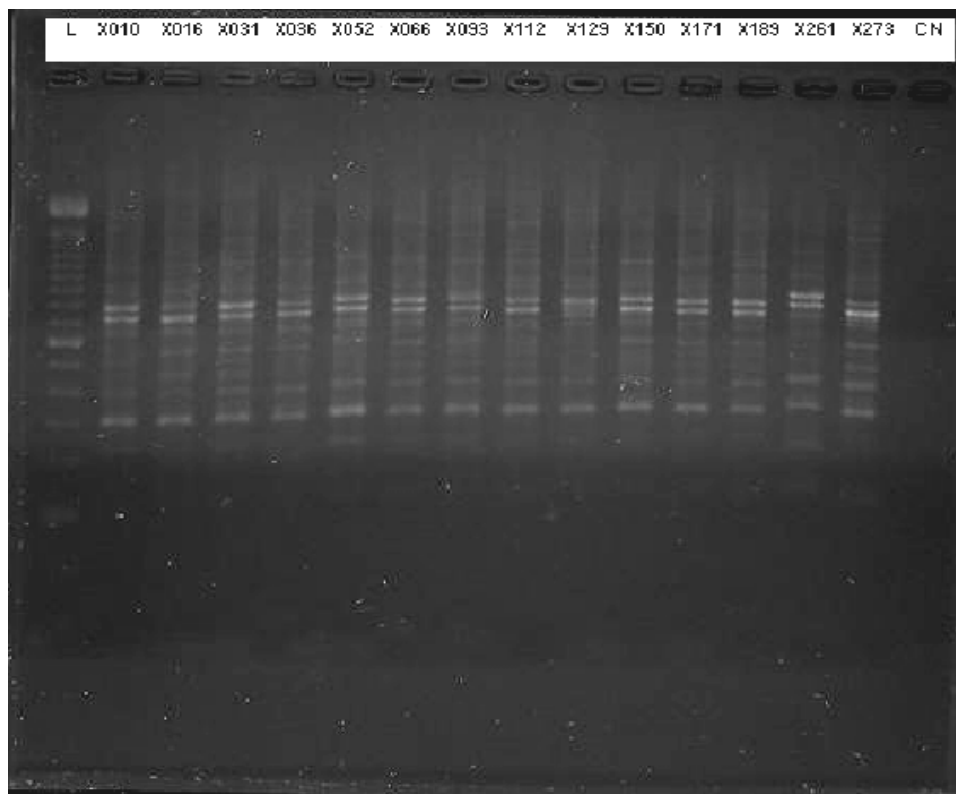


Figura 25: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-07. (L) *Ladder*; Amostras (X010 a X273); (CN) *Controle negativo*.

ANEXO E

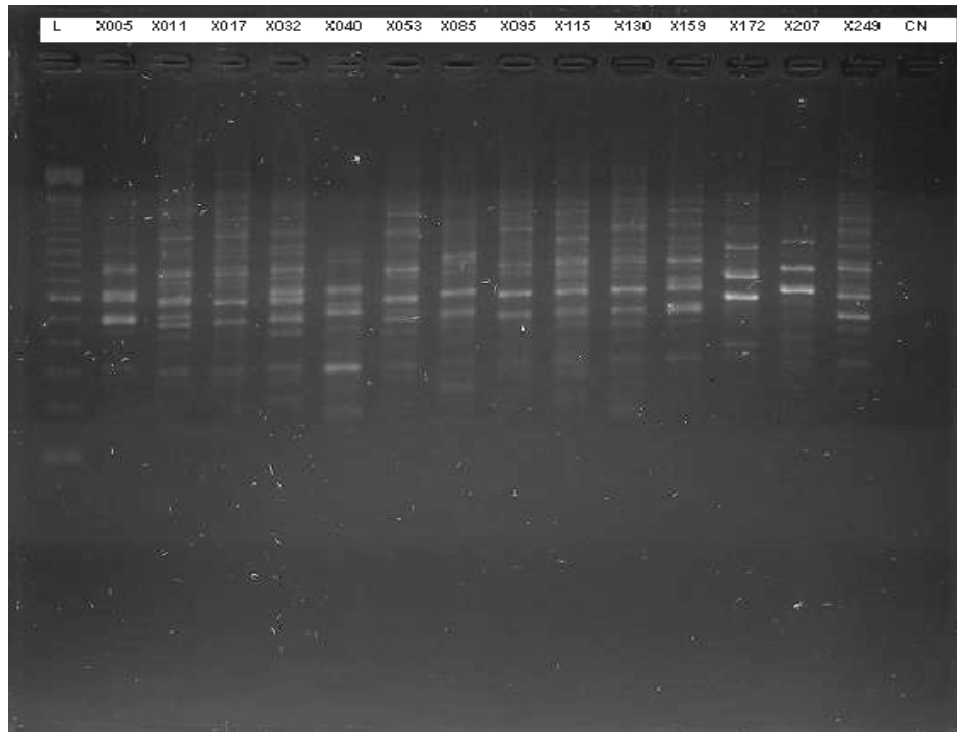


Figura 26: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-08. (L) *Ladder*; Amostras (X005 a X249); (CN) Controle negativo.

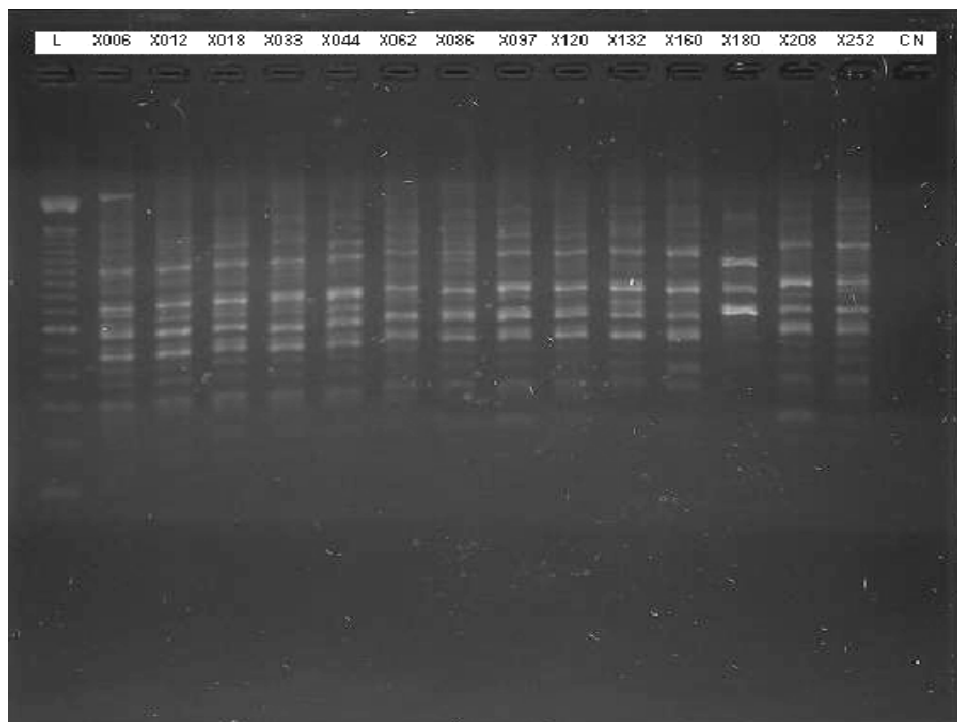


Figura 27: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-08. (L) *Ladder*; Amostras (X006 a X252); (CN) Controle negativo.

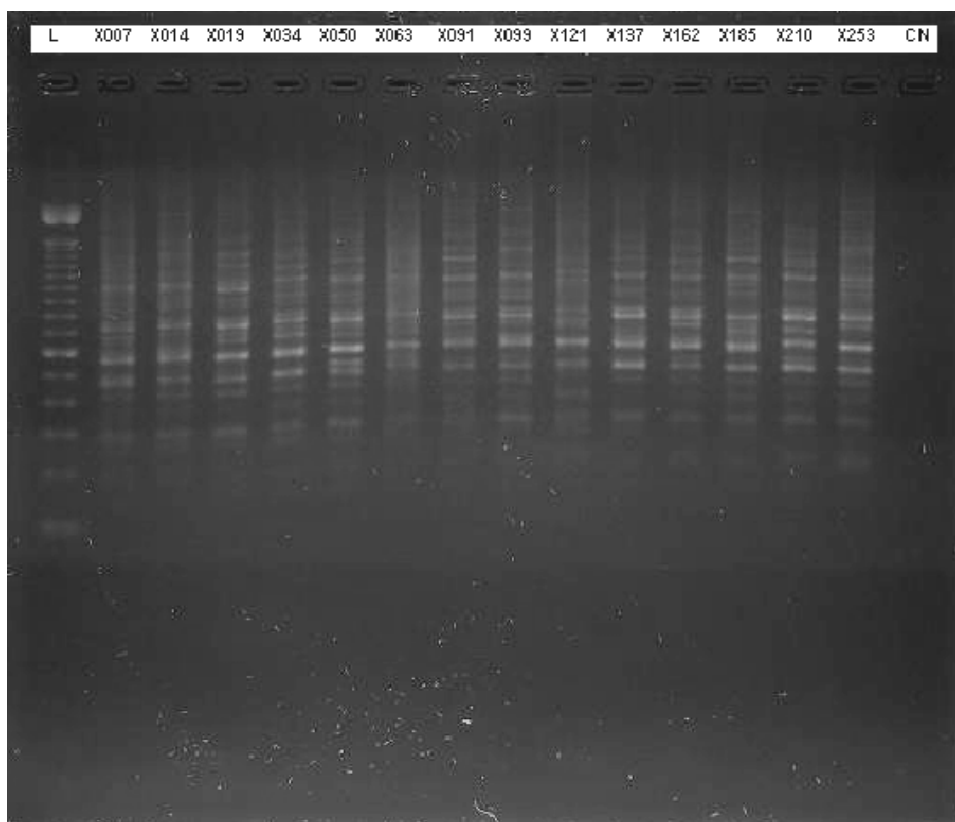


Figura 28: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-08. (L) *Ladder*; Amostras (X007 a X253); (CN) *Controle negativo*.



Figura 29: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-08. (L) *Ladder*; Amostras (X008 a X260); (CN) *Controle negativo*.

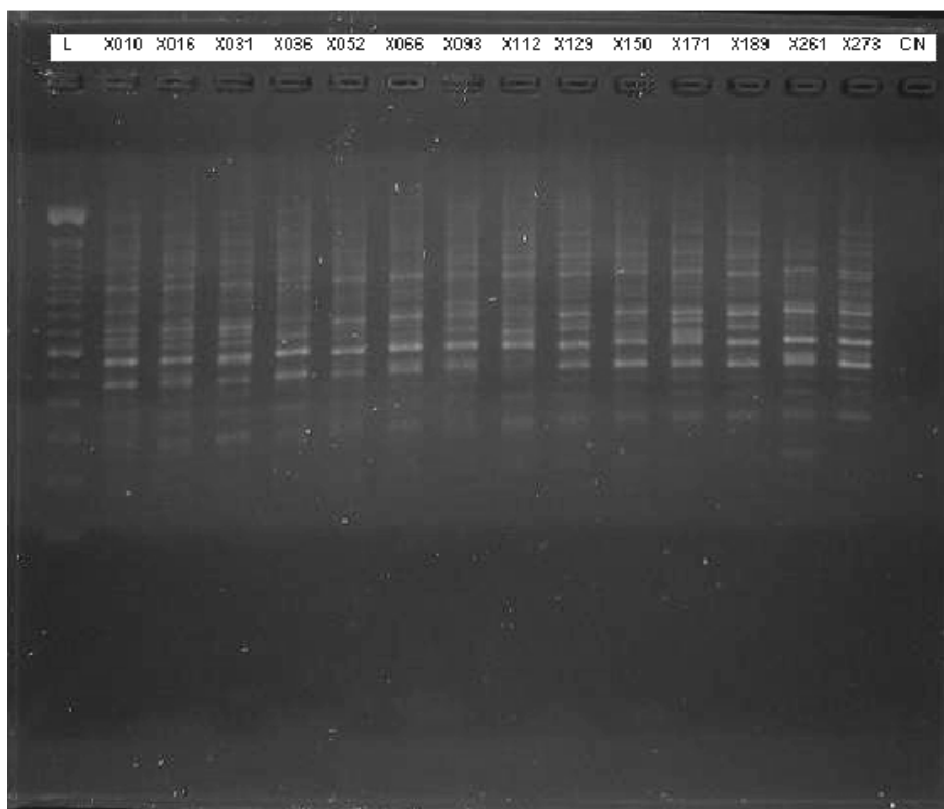


Figura 30: Perfil eletroforético de *RAPD* obtido com o *primer* OPP-08. (L) *Ladder*; Amostras (X010 a X273); (CN) *Controle negativo*.