

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis*
através de marcadores microssatélites**

Rafael Aldrighi Tavares

Pelotas, 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microssatélites

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências, na área de concentração: Melhoramento Animal.

Orientador: Heden Luiz Marques Moreira

Co-Orientador: Nelson José Laurino Dionello

Co-Orientador: Vitor Hugo Borba Manzke

Pelotas, 2010

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

T231e Tavares, Rafael Aldrighi

Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microssatélites / Rafael Aldrighi Tavares; orientador Heden Luiz Marques Moreira; co-orientadores Nelson José Laurino Dionello e Vitor Hugo Borba Manzke. - Pelotas, 2010.-68f. ; il..- Dissertação (Mestrado em melhoramento animal) –Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2010.

1. Melhoramento genético 2. Marcadores moleculares
3. Peixes nativos I Moreira, Heden Luiz Marques (orientador) II
.Título.

CDD 639.1

Banca Examinadora

Dr. Heden Luiz Marques Moreira (Presidente)

Dr. Bernardo dos Santos Vaz (UFPel)

Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras (UFPel)

Dr. Paulo Rodinei Soares Lopes (UNIPAMPA)

Dedico

À Deus, aos meus pais: José Lucio e Marli, ao meu irmão: José Lucio Junior, a minha esposa: Lilian, pelo apoio, força e compreensão nesta minha caminhada.

“A cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não havia pobreza no mundo e ninguém morreria de fome”.

(Ghandi)

Agradecimentos

Ao meu orientador acadêmico, Heden, que abriu as portas de seu laboratório e acreditou em mim, tornando-se um grande amigo.

Aos amigos Milton e Leonor, que com humildade e amizade, me mostraram o fascinante mundo da pesquisa, sempre ressaltando a ética em experimentação animal.

A equipe do LEGA, Diones, Marco, Bernardo, Marília, Janaina, Liane, Plínio, Natália, Izani e Carla, pelo carinho que me acolheram e disposição para me ajudar no que fosse preciso.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação pelo ensinamento, aprendizagem e amizade.

Ao CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização desta pesquisa.

Ao meu pai, Zezé, e minha mãe Marli, meus queridos e amados pais, sempre me ensinando que com simples atos de humildade, sinceridade e respeito todos os objetivos de nossa vida são alcançados. E ao meu irmão Zinho, com carinho compartilhou minhas angústias e alegrias nesta caminhada rumo ao sucesso.

Aos meus sogros, Domingos e Maria Helena, por todo carinho que fui recebido por esta família, servindo como fonte de inspiração para alcançar os meus objetivos.

E a minha esposa Lilian, que sempre ao meu lado e com muito amor me motivou a ir frente e soube compreender os momentos que estive ocupado em prol da pesquisa e ensinamento.

Sem nunca esquecer, agradeço a Deus por ter me concedido a vida proporcionado o dom pelo trabalho em pesquisa e desenvolvimento.

Resumo

TAVARES, Rafael Aldrighi. **Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microssatélites**. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Foram identificadas a divergência e a variabilidade genética de duas populações de peixe-rei (Brasil e Argentina), através do polimorfismo de seis marcadores microssatélites. Oitenta e cinco (85) animais de duas populações de peixe-rei, 40 animais coletados na lagoa de Chascomus, localizado na Província de Buenos Aires, Argentina e 45 animais coletados na barragem do Chasqueiro localizado no município de Arroio Grande, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O material coletado foi de fragmentos de músculo e nadadeira caudal, sendo armazenados em etanol 95% e preservados a -20°C . Foram testados 3 protocolos diferentes para extração de DNA: 1) Fenol – Clorofórmio; 2) Cloreto de Sódio e 3) Acetato de Amônia (Cloreto de Sódio modificado). Seis *loci* de microssatélites foram analisados através das frequências alélicas, heterozigosidade observada, diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por *locus*, porcentagem de *loci* polimórficos e índice de fixação de Wright. Os resultados mostram que os microssatélites analisados apresentaram alto polimorfismo. Os números de alelos variaram de 4 a 15. Para todas as amostras foi obtido um total de 49 alelos, com uma média de 8,16 alelos por *locus*. O valor de F_{st} entre as duas populações foi de 0,1303, ou seja, as populações apresentam moderada diferenciação genética ($P < 0,05$). Foi concluído que através do alto polimorfismo analisado nos seis *loci* de microssatélites, estes fornecem uma ferramenta eficiente para estudo da variação genética de *O. bonariensis* e a diferenciação genética significativa nas populações analisadas pode fornecer a base para futuros programas de melhoramento genético.

Palavras-chaves: melhoramento genético, marcadores moleculares, peixes nativos.

Abstract

TAVARES, Rafael Aldrighi. Genetic analysis of two populations of *Odontesthes bonariensis* using microsatellite markers. 2010. 68f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Divergency and genetic variability of two populations (Brazil and Argentina) were identified through polymorphism of six microsatellite markers. Eighty Five animals from the two populations were studied, 40 animals collected from Chascomus lake in Buenos Aires, Argentina and 45 from Chasqueiro Dam in Arroio Grande, Rio Grande do Sul, Brazil. The collected material was muscle and caudal fin fragments, stored in 95% ethanol and kept at -20 °C. Three different protocols for DNA extraction were tested: 1) Phenol – Chloroform; 2) Sodium chloride 3) Ammonia acetate (modified Sodium chloride). Six microsatellite *loci* were analyzed by allelic frequency, observed heterozygosis, expected genetic diversity according to Hardy-Weinberg equilibrium, number of alleles per *locus*, percentage of polymorphic *loci* and Wright fixation. The results showed that the microsatellites analyzed presented high polymorphism. The number of alleles varied from 4 to 15. A total of 49 alleles were obtained from all the samples. Fst value between the two populations was 0.1303, that is, the populations presented moderate genetic differentiation ($P < 0.05$). It was concluded that due to the high polymorphism analyzed in the six microsatellite *loci*, they can be an efficient tool for genetic variation studies of *O. bonariensis* and the significant genetic differentiation in the populations analyzed can provide basis for further genetic improvement programs.

Key words: genetic improvement, molecular markers, native fish.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Relações filogenéticas entre o gênero Atherinopsidae	20
Figura 2 – Relações filogenéticas entre a espécie Sorgentinini	21
Figura 3 – Mapa de distribuição das espécies, marinhas e água doce, de Sorgentinini	22
Figura 4 – Peixe-rei – <i>Odontesthes bonariensis</i>	23
Figura 5 – Habitat do <i>Odontesthes bonariensis</i> no extremo sul do Brasil	23
Figura 6 – Cuba de eletroforese ORIGINS® para gel Spreadex®	41
Figura 7 – Análise da extração de DNA em gel de agarose 1%	43
Figura 8 – Frequências dos alelos do <i>locus</i> Obo64TUF nas populações do Brasil e Argentina	46
Figura 9 - Frequências dos alelos do <i>locus</i> Obo19TUF nas populações do Brasil e Argentina	47
Figura 10 - Frequências dos alelos do <i>locus</i> Obo21TUF nas populações do Brasil e Argentina	48
Figura 11 - Frequências dos alelos do <i>locus</i> Obo71TUF nas populações do Brasil e Argentina	48
Figura 12 - Frequências dos alelos do <i>locus</i> Obo77TUF nas populações do Brasil e Argentina	49
Figura 13 - Frequências dos alelos do <i>locus</i> Obo79TUF nas populações do Brasil e Argentina	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Produção da aquicultura no mundo	16
Tabela 2 – Produção pesqueira, por modalidade, de 2005 a 2006	17
Tabela 3 – Produção da aquicultura continental no Brasil	19
Tabela 4 – Marcadores microssatélites em <i>Odontesthes bonariensis</i>	39
Tabela 5 – Sequência e temperatura de anelamento dos <i>primers</i> e tamanho do fragmento esperado	40
Tabela 6 – Número de alelos encontrados por <i>locus</i>	45
Tabela 7 – Análise da variação genética para os seis <i>loci</i> microssatélites nas duas populações de <i>O. bonariensis</i>	51

SUMÁRIO

1 Introdução	12
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo Geral	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 Revisão Bibliográfica	16
3.1 Aquicultura no Rio Grande do Sul	16
3.2 Peixe-Rei no Sul do Rio Grande do Sul	20
3.3 Melhoramento Genético	25
3.4 Marcadores Moleculares	26
3.5 Marcadores Microssatélites	27
3.6 Variabilidade Genética no Melhoramento Genético	29
3.7 Análise da Variabilidade Genética	31
3.7.1 Polimorfismo	31
3.7.2 Heterozigose	31
3.7.3 Diversidade Alélica	31
3.7.4 Estatística F	31
3.7.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	32
4 Material e Métodos	33
4.1 Local de Desenvolvimento do Projeto	33
4.2 Amostras	33
4.3 Extração do DNA	36
4.3.1 Protocolo Fenol – Clorofórmio	36
4.3.2 Protocolo Cloreto de Sódio	37
4.3.3 Protocolo Acetato de Amônia	37
4.4 Busca de Sequências de Microssatélites e Desenhos de <i>Primers</i>	38
4.5 Amplificações dos Microssatélites	40
4.6 Análise do Polimorfismo	41
4.7 Análise dos Dados	42
5 Resultados e Discussão	43
5.1 Qualidade do DNA	43
5.2 Polimorfismo	44

5.3 Índices de Fixação	50
5.4 Diferenciação Genética	54
6 Conclusão	55
7 Considerações Finais	56
8 Referências Bibliográficas	57
Anexos	65

1 Introdução

Aquicultura é considerada uma atividade multidisciplinar, relacionada ao cultivo de diversos organismos aquáticos, entre eles plantas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo um ponto fundamental o manejo do processo de criação para o aumento da produção (OLIVEIRA, 2009).

A contribuição da aquicultura para as reservas mundiais de peixes, crustáceos, moluscos e outros animais aquáticos, teve um crescimento contínuo, passando de 3,9% do total da produção, em 1970, para 36,0% desse montante em 2006. Esse crescimento da aquicultura mundial teve um ganho expressivo nos últimos 50 anos, passando de uma produção de menos de um milhão de toneladas em 1950, a uma produção, em 2006, de 51,7 milhões de toneladas (FAO, 2008).

Porém este cenário de crescimento, não demonstra uniformidade entre as regiões do mundo. A América Latina e região do Caribe apresentam a maior média de crescimento anual, com 22%, seguida pela região próxima ao Oriente, com 20% e região da África, com 11,7%. Contudo, a taxa de crescimento da China, considerado o maior contribuinte da oferta mundial de organismos aquáticos cultivados, apresenta uma tendência de diminuição. Da mesma forma, a produção na Europa e Norte da América diminuiu substancialmente a cerca de um por cento por ano, desde 2000 (FAO, 2008).

Os países com grandes reservas de água e terra, associada a uma diversidade de espécies aquícolas nativas, são potentes celeiros para o desenvolvimento da aquicultura. Países como o Brasil, que querem adotar o desenvolvimento de suas próprias capacidades de inovação ou adaptar tecnologias às condições locais, o incremento nos sistemas de pesquisa e desenvolvimento do

setor público, focado na produção tecnológica para a solução de demandas, será um ponto fundamental.

O Brasil apresenta 8.400 km de costa marítima, 5.500.000 ha de reservatórios de água doce, equivalendo a 12% da água doce do planeta, clima favorável, terras disponíveis, mão-de-obra relativamente barata, crescente mercado interno e país com maior biodiversidade de espécies nativas de peixes (IBAMA, 2008; RESENDE et al., 2008). Contudo, sua produção aquícola é irrisória. Para alavancar a produção, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), está desenvolvendo o projeto em rede “Bases tecnológicas para o desenvolvimento da aquicultura no Brasil - AQUABRASIL”, onde procurará desenvolver informações e tecnologias adaptadas às condições locais para melhorar o desempenho da aquicultura. Isso para propiciar o abastecimento do mercado interno e a exportação, tendo como linha mestra a promoção de um grande salto tecnológico capaz de promover a sustentabilidade da atividade, do ponto de vista econômico, social e ambiental, com geração de emprego e renda e a inclusão social de parcelas significativas do campo (AQUABRASIL, 2009).

O crescimento da produção aquícola no Brasil ocorreu devido ao aumento da demanda e aperfeiçoamento das técnicas de manejo e produção, bem como certa organização da cadeia produtiva, consequência do aumento da demanda e da oferta (SANDRE, 2009). Contrastando com outros países, que utilizaram técnicas de melhoramento genético, mostrando um potencial de ganho na taxa de crescimento por geração, tendo como exemplo a seleção genética em tilápia (*Oreochromis niloticus*), salmão (*Salmo salar*) e truta (*Oncorhynchus mykiss*). O melhoramento genético de espécies nativas é a chave para o desenvolvimento da aquicultura do Brasil, aumentando os índices de produção, tornando um país competidor no mercado internacional (RESENDE et al., 2008).

Quando se trata de espécies nativas no Brasil, a situação é bastante constrangedora. Nas estatísticas de 2006 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA aparecem como principais espécies cultivadas a carpa (*Cyprinus carpio*) e tilápia, espécies exóticas, perfazendo 61% do total. Dentre as espécies nativas, apenas o tambaqui (*Colossoma macropomum*)

aparece com algum valor significativo, da ordem de 14%, seguido pelo seu híbrido, o tambacu, com 5,7% e o pacu com 5,5% (IBAMA, 2008; RESENDE et al., 2008).

No estado do Rio Grande do Sul várias espécies de peixes merecem destaque, entre elas o Jundiá (*Rhamdia quelen*) e o Peixe-Rei (*Odontesthes bonariensis*), demonstrando uma grande aceitação pelo mercado consumidor.

O peixe-rei, *Odontesthes bonariensis* é um peixe *atherinid* economicamente importante da América do Sul. É considerado como uma espécie de água doce por causa de sua ocorrência natural em águas interiores (TSUZUKI et al., 2007). Esta espécie originalmente habita lagos e lagoas das regiões pampianas da Argentina e Rio Grande do Sul, Brasil, mas também tem sido estocada com sucesso em outras bacias do Brasil, Argentina e até mesmo de outros países sul-americanos devido aos seus valores de pesca. A elevada qualidade do peixe-rei também tem incentivado a cultura em locais distantes da sua área de distribuição nativa, como o Japão e a Itália (BAIGÚN, et al., 2009).

Apesar do peixe-rei habitar águas continentais, sua carne tem sabor, cheiro, textura e até mesmo características químicas semelhantes às das requintadas e caras espécies marinhas e, por estas razões, é apropriado para uma variedade de preparações do tipo seca ou defumada para ser cozido, assado ou frito como na cozinha do estilo ocidental (SOMOZA, et al., 2008).

Seu cultivo não é desenvolvido o suficiente para alcançar níveis comerciais, sendo a comercialização desta espécie praticamente através da coleta de populações naturais. Um ponto para alavancar o cultivo desta espécie, no Sul do Rio Grande do Sul, é a utilização do melhoramento genético dirigido. Ao se realizar este tipo de técnica, com base em uma grande variabilidade genética inicial, assegura-se a existência de variabilidade suficiente para se alcançar as melhorias desejadas para sucessivas gerações (KUBITZA et al., 2007, RESENDE et al., 2008).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Descrever a divergência e a variabilidade genética de duas populações de peixe-rei (Brasil e Argentina), através do polimorfismo de seis marcadores microssatélites.

2.2 Objetivos Específicos:

Analisar a frequência alélica nos seis *loci* microssatélites, para obtenção da diversidade entre as populações e estrutura populacional.

Realizar análise estatística dos parâmetros genéticos populacionais que definem a estrutura de população. Analisar a diferenciação alélica e genotípica e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Aquicultura no Rio Grande do Sul

Segundo dados da FAO – Food and Agriculture Organization of United Nations (2008), o crescimento da aquicultura nos três maiores produtores Latino Americanos (Chile, Brasil e México), nos últimos 10 anos, foi muito superior a média mundial. Na América Latina, o Chile é o principal produtor, seguido pelo Brasil, ocupando a 17ª posição mundial (Tabela 1).

Tabela 1 – Produção da aquicultura no mundo.

Local	1996 (ton.)	2002 (ton.)	2005 (ton.)	Prod. Mundial 2005 (%)	Cresc. nos últimos 10 anos (%)	Cresc. nos últimos 4 anos (%)
Mundo	26592071	40388872	48149792	-	81,07	19,21
China	17714570	27767251	32414084	67,32	82,98	16,73
Índia	1758739	2187189	2837751	5,89	61,35	29,74
Vietnã	299288	703041	1437300	2,98	380,24	104,44
Chile	217903	545655	698214	1,45	220,42	27,96
Brasil	77690	242590	257783	0,53	231,81	6,26
México	31339	73675	117514	0,24	274,98	59,50

Fonte: FAO, 2008.

Em 2006, observou-se no Brasil um crescimento na produção pesqueira total na ordem de 4,1% em relação a 2005. A pesca marinha apresentou um crescimento de 3,9% e a pesca continental 3,2%. A maricultura apresentou um crescimento de 3,2% e a aquicultura continental se destaca com um crescimento de 6,4% em relação ao ano de 2005 (IBAMA, 2008).

A aquicultura continental, com uma produção de 191.183,5 toneladas, representa 18,2% da produção de pescado total do Brasil. O valor estimado foi de R\$ 715.227.400,00 (Tabela 2) (IBAMA, 2008).

Tabela 2 – Produção pesqueira, por modalidade, de 2005 a 2006.

Produção (ton.)	2005	2006	Crescimento relativo (%)
Pesca extrativa marinha	507.858,5	527.871,5	+ 3,9
Pesca extrativa continental	243.434,5	251.241,0	+ 3,2
Maricultura	78.034,0	80.512,0	+ 3,2
Aquicultura continental	179.746,0	191.183,5	+ 6,4
Total	1.009.073,0	1.050.808,0	+ 4,1

Fonte: IBAMA, 2006.

Porém o crescimento produtivo da piscicultura vinha ocorrendo de forma contínua até 2001, sendo impulsionado, em 1935, pela técnica de indução da desova por hipofiseação, abandonando-se o hábito de coleta pós-larva na natureza. Nos últimos quatro anos analisados praticamente não ocorreu aumento na produção (BALDISSEROTTO, 2009).

Políticas estabelecidas para o setor, através de planos definidos pelo Ministério da Pesca e Agricultura (MPA), relacionam uma série de metas objetivando promover o desenvolvimento da aquicultura no Brasil. Desta forma o MPA, junto ao projeto Aquabrazil, elegem espécies com potencial de alavancar de forma mais rápida a atividade, justificando a escolha na grande possibilidade de absorção de seus produtos pelo mercado e domínio de sua tecnologia de cultivo, com a definição de políticas de ordenamento pesqueiro para o setor.

Apesar das atividades que as instituições de pesca vêm desenvolvendo nos setores de incubação e propagação para intensificar o cultivo de peixes, a piscicultura no Brasil ainda não alcançou importância econômica. Estima-se que seja produzido anualmente no Brasil, ao redor de 200 milhões de alevinos. Sendo que somente 30% desses peixes comercializados serão abatidos com peso médio de um quilograma.

Por apresentar grandes reservas de água e terras de baixo custo, aliado ao melhoramento de espécies nativas de animais aquáticos, o Brasil tem potencial de expansão da piscicultura. A aquicultura continental apresentou crescimento nas regiões Norte de 12,1%, Nordeste de 2,1%, Sudeste de 13,2%, Sul de 6,1% e Centro-Oeste de 1,3% em 2006. As principais espécies de peixes utilizadas na aquicultura dessas regiões são: tilápia, carpa, tambaqui, tambacu e curimatã (*Prochilodus scrofa*) (IBAMA, 2008).

A região Sul produziu 62.823,5 ton. de pescado em 2006 com um valor total estimado de R\$ 247.038.050,00 e continua contribuindo com a maior parcela na produção nacional com 32,9%. A carpa e a tilápia são as espécies mais representativas, tendo suas maiores produções concentradas nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná (Tabela 3) (IBAMA, 2008).

A espécie nativa com maior presença na piscicultura continental no Estado do Rio Grande do Sul é o jundiá, mas até 2005 sua produção havia caído drasticamente de 7,6% para 1,5% do total (CAMARGO e POUHEY, 2005).

O Rio Grande do Sul, em especial, tem uma situação privilegiada para esta prática, pois apresenta reservatórios naturais de água doce (Laguna dos Patos, Lagoas Mirim e Mangueira) e artificiais (4.000 açudes e cerca de 15 barragens). Além disso, dispõe ainda de mais de 2.000.000 hectares de terras de várzeas sistematizadas para o arroz irrigado, dos quais aproximadamente 1.000.000 são cultivados anualmente, além de a fauna ictiológica apresentar espécies potencialmente promissoras para a piscicultura (CAMARGO e POUHEY, 2005).

Tabela 3 – Produção da aquicultura continental no Brasil.

Regiões e Unidades de federação	Total (t)	Peixes (t)	Crustáceos (t)	Moluscos (t)	Anfíbios (t)
Brasil	191.183,5	190.161,5	373,0	0,0	649,0
Norte	22.100,0	22.090,0	0,0	0,0	10,0
Rondônia	4.980,0	4980,0	0,0	0,0	0,0
Acre	2.003,0	1.993,0	0,0	0,0	10,0
Amazonas	6.163,0	6.193,0	0,0	0,0	0,0
Roraima	2.341,0	2.341,0	0,0	0,0	0,0
Pará	2.187,0	2.187,0	0,0	0,0	0,0
Amapá	426,0	426,0	0,0	0,0	0,0
Tocantins	4.000,0	4.000,0	0,0	0,0	0,0
Nordeste	36.049,0	35.975,0	67,0	0,0	7,0
Maranhão	781,0	781,0	0,0	0,0	0,0
Piauí	1.996,0	1996,0	0,0	0,0	0,0
Ceará	17.180,0	17.177,0	0,0	0,0	3,0
Rio Grande do Norte	105,0	105,0	0,0	0,0	0,0
Paraíba	357,0	357,0	0,0	0,0	0,0
Pernambuco	1.105,0	1.048,0	57,0	0,0	0,0
Alagoas	4.345,0	4.345,0	0,0	0,0	0,0
Sergipe	2.242,0	2.232,0	10,0	0,0	0,0
Bahia	7.938,0	7.934,0	0,0	0,0	4,0
Sudeste	36.279,0	35.488,0	306,0	0,0	485,0
Minas Gerais	6.059,0	5.998,0	0,0	0,0	61,0
Espírito Santo	3.405,0	3.079,0	285,0	0,0	41,0
Rio de Janeiro	5.584,0	5.459,0	21,0	0,0	104,0
São Paulo	21.231,0	20.952,0	0,0	0,0	279,0
Sul	62.823,5	62.823,5	0,0	0,0	0,0
Paraná	16.687,0	16.687,0	0,0	0,0	0,0
Santa Catarina	21.891,0	21.891,0	0,0	0,0	0,0
Rio Grande do Sul	24.245,0	24.245,0	0,0	0,0	0,0
Centro-Oeste	33.932,0	33.785,0	0,0	0,0	147,0
Mato Grosso do Sul	7.758,0	7.758,0	0,0	0,0	0,0
Mato Grosso	16.827,0	16.827,0	0,0	0,0	0,0
Goiás	8.749,0	8.617,0	0,0	0,0	132,0
Distrito Federal	598,0	598,0	0,0	0,0	15,0

Fonte: IBAMA, 2008.

3.2 Peixe-Rei no Sul do Rio Grande do Sul

O peixe-rei é um representante da ordem atheriniformes, que inclui peixes encontrados em águas doces, marinhas, tropicais e temperadas de todo mundo. Dentro dos atheriniformes o peixe-rei é um exemplar da subfamília atherinopsinae, que são compostos por seis gêneros em dois grupos antitropicais: Atherinopsini na América do Norte (*Atherinops*, *Atherinopsis*, *Colpichthys*, *Leuresthes*) e Sorgentinini na América do Sul (*Basilichthys*, *Odontesthes*) (Figura 1) (BRIAN, 2006).

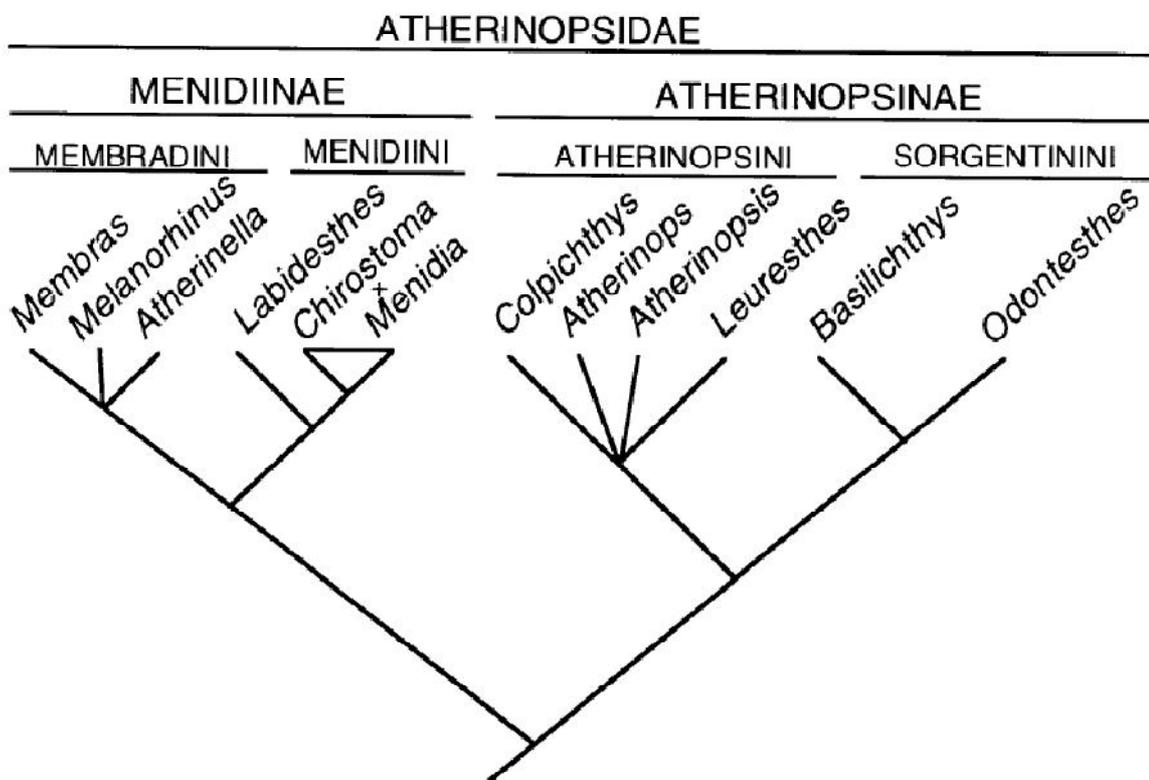


Figura 1 – Relações filogenéticas entre o gênero Atherinopsidae.
Fonte: BRIAN, 2006.

O *Odontesthes* é o gênero com a maioria das espécies (Figura 2), e mais amplamente distribuída, sendo encontrada em águas costeiras marinhas e lagoas de água doce da América do Sul (Figura 3) (BEMVENUTI, 2006; BRIAN, 2006). Ao longo dos anos ocorreu frequentes mudanças na classificação das espécies de peixe-rei, baseadas em dados morfológicos insuficientes para sua caracterização. Sendo realizada uma osteologia comparada entre espécies de peixes-rei *Odontesthes* do sistema lagunar Patos-Mirim, no extremo sul do Brasil, demonstrando diferenças marcantes, entre *O. argentinensis*, *O. bonariensis*, *O.*

humensis, *O. incisa*, *O. mirinensis*, *O. perugiae* e *O. retropinnis*, nas características osteológicas cranial, esqueleto axial e esqueleto apendicular (BEMVENUTI, 2005).

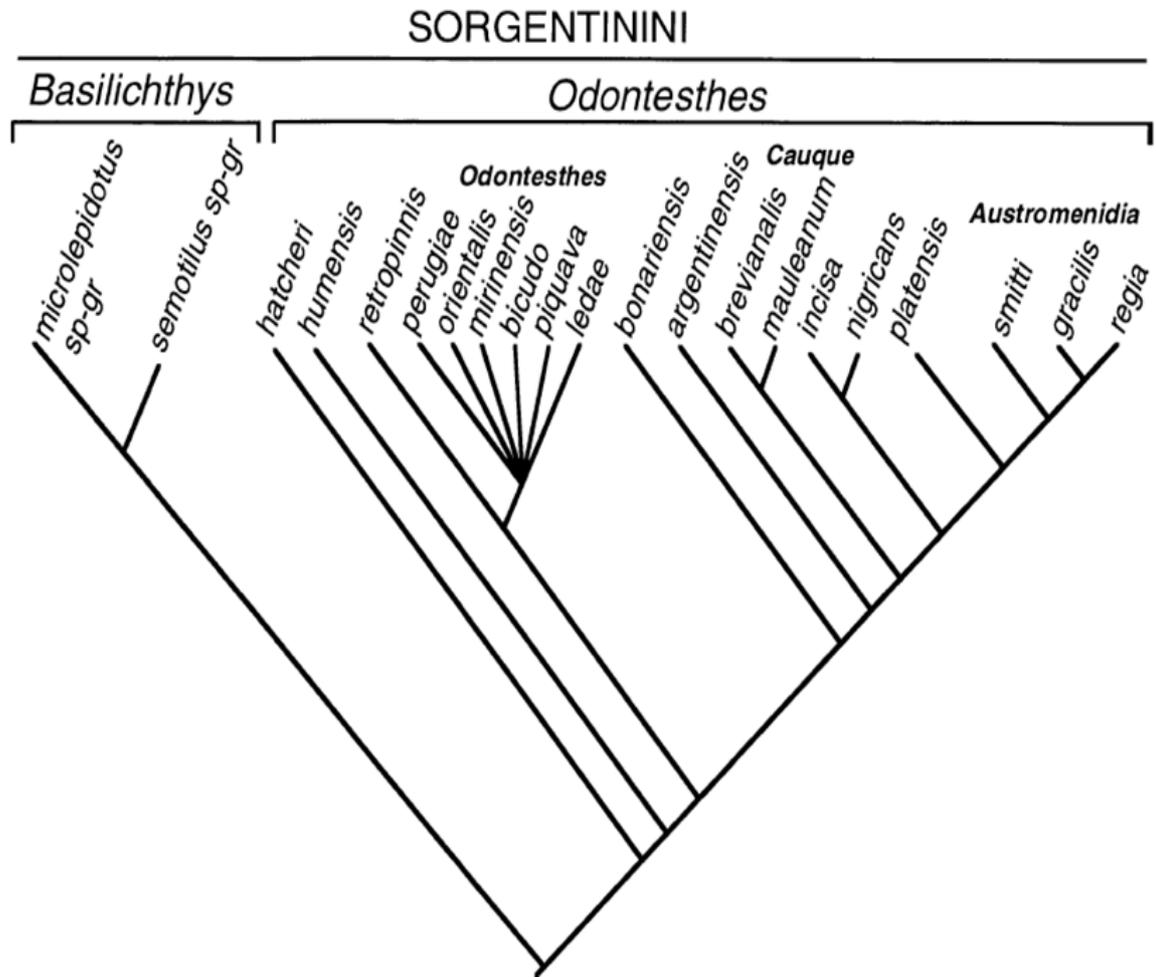


Figura 2 – Relações filogenéticas entre a espécie Sorgentinini.
Fonte: BRIAN, 2006.

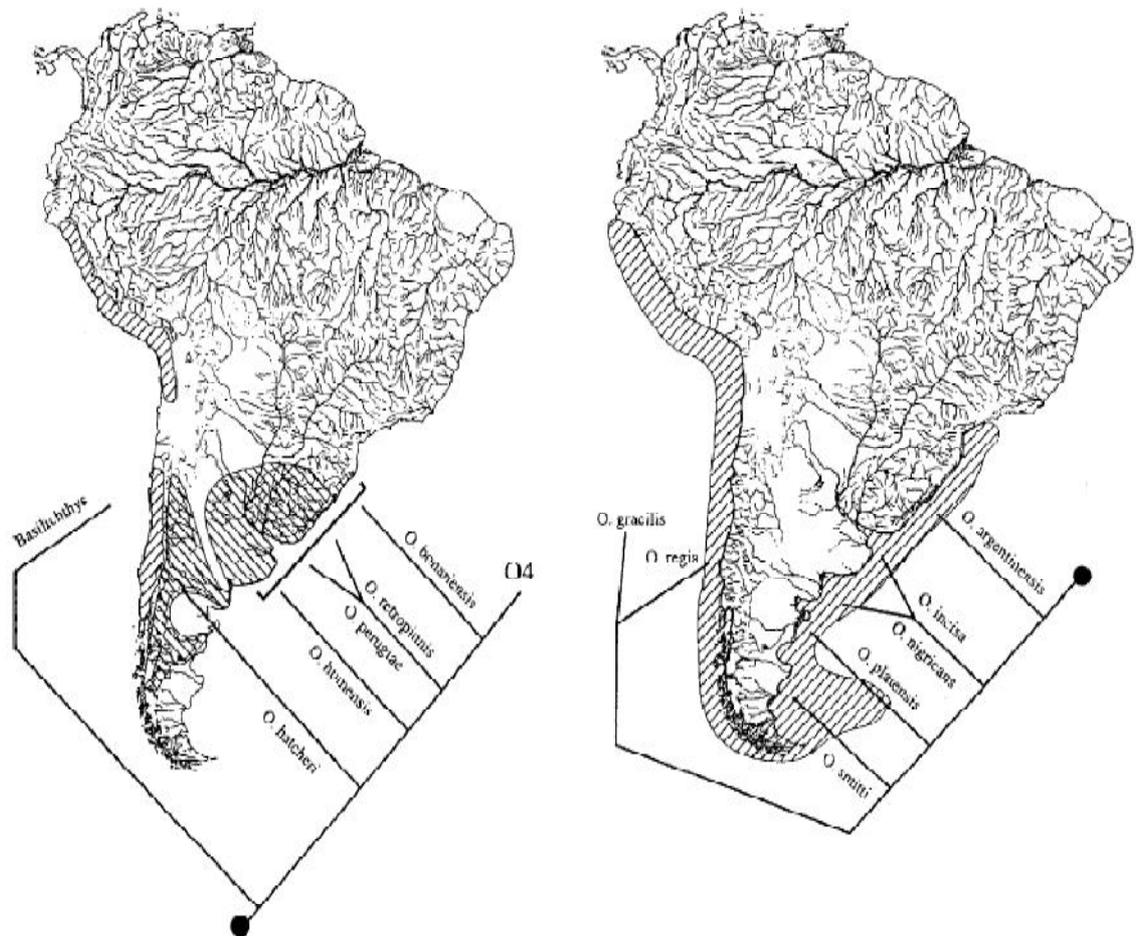


Figura 3 – Mapa de distribuição das espécies, marinhas e água doce, de Sorgentinini.

Fonte: BRIAN, 2006.

A espécie *Odontesthes bonariensis* apresenta corpo fusiforme, cabeça fortemente óssea na parte superior e boca projetada. Possui duas nadadeiras dorsais, sendo a primeira pequena com raios flexíveis e a segunda mais larga com um raio flexível, as nadadeiras ventrais não possuem serras nem espinhos. Estas características tornam o peixe um veloz nadador. Coloração prateada com listras levemente azuladas e uma banda brilhante sobre o flanco. Larga faixa prateada com azul escuro acima da margem peitoral. Uma faixa prateada larga com uma margem azul escura correndo acima da base da nadadeira peitoral até a base da nadadeira caudal, ao longo do corpo. Superfície superior da cabeça, peitoral e nadadeiras caudais prateadas (Figura 4).



Figura 4 - Peixe-rei – *Odontesthes bonariensis*

A espécie é nativa da América do Sul: sudeste da Argentina e rio de La Plata e extremo sul do Brasil. No Brasil é encontrado na zona sul do estado do Rio Grande do Sul, Lagoas Mirim e Mangueira. Habitat são zonas pelágicas, de águas doce, salobra ou salgada com profundidade média de um metro, com temperatura de conforto térmico em torno de 17°C. (Figura 5) (BENVENUTI, 2006; BRIAN, 2006; BAIGUN et al., 2009).

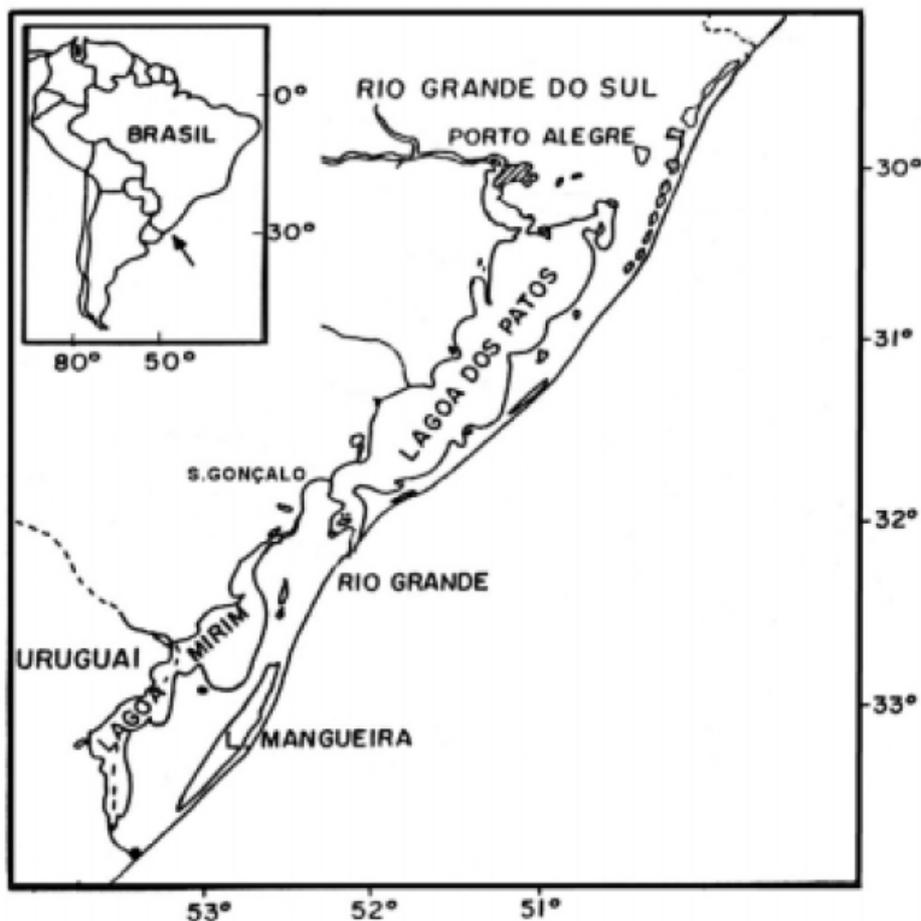


Figura 5 – Habitat do *Odontesthes bonariensis* no extremo sul do Brasil. Fonte: BEMVENUTI, 2006.

A alimentação varia com o tamanho e ambiente. Estudos com peixes adultos e juvenis foram observados tendo como parte de suas dietas moluscos, copépodos, camarão de água doce e peixes. De acordo com Piedras et al. (2004a) e Benvenuti (2006) os juvenis se alimentam basicamente de copépodos adultos, através da filtração dos zooplânctons.

Piedras e Pouey (2005) observaram que os principais itens alimentares registrados na lagoa Mangueira foram: 65% de crustáceos (Isopoda), 15% de moluscos (Bivalvia e Gastropoda), 10% de insetos (Diptera e Trichoptera) e 10% de outros organismos. Na lagoa Mirim os principais alimentos registrados foram: 70% de moluscos (Bivalvia e Gastropoda), 10% de insetos (Diptera), 10% de crustáceos (Isopoda) e 10% de outros organismos. Organismos planctônicos foram pouco representativos nos dois locais estudados.

Um ponto fundamental para o cultivo de forma intensiva de espécies nativas é o desenvolvimento de dietas apropriadas as suas características alimentares, que permitem crescimento satisfatório em relação aos custos, ao tempo de cultivo e a qualidade do produto final. Estudos realizados por Piedras et al. (2004c) mostram que a suplementação de metionina em dietas à base de farinha de peixe, farelo de soja e milho, para alevinos de peixe-rei, resulta em melhor desempenho e os ingredientes farinha de peixe, farelo de soja e milho suprem as necessidades de lisina para alevinos de peixe-rei.

Na Província de Buenos Aires o peixe-rei mostra um período intenso de desova natural durante a Primavera, a partir do final de agosto ao início de dezembro. Miranda et al. (2006) observaram o mesmo período reprodutivo em animais criados em cativeiro, porém esta estação pode ser estendida.

A aquicultura desta espécie iniciou-se nos lagos de Chascomus, Argentina, em 1904 (BRIAN, 2006). No Rio Grande do Sul, esta espécie vem sendo cultivada, de forma extensiva, principalmente como atividade de lazer e/ou subsistência. A qualidade de sua carne desperta interesse para o cultivo comercial, que somente será viabilizado com desenvolvimento de tecnologias próprias (PIEDRAS et al., 2004b).

3.3 Melhoramento Genético

O homem ao longo de toda sua história tem domesticado e usado para alimentação diversas espécies de animais e plantas. As altas produtividades alcançadas pela agricultura e pecuária são o reflexo de uma série de aprimoramentos tecnológicos que tem sido conquistado graças à aplicação de métodos e conhecimentos científicos, destacando as técnicas de melhoramento genético.

O melhoramento animal tem por finalidade aperfeiçoar a produção dos animais que apresentam interesse para o homem. Sabe-se que o fenótipo de um indivíduo nada mais é que o produto da interação entre o genótipo e o meio ambiente. Apesar de ter a fundamentação teórica desenvolvida há anos, tem recentemente, recebido grandes contribuições que são, com a necessidade de melhoria genética imposta pelo mercado, as principais responsáveis tanto pela expansão quanto pelos progressos genéticos que tem sido observado nas mais diferentes espécies de animais explorados comercialmente.

Melhoramentos genéticos dirigidos efetuados com peixes têm mostrado um potencial de ganho na taxa de crescimento, em média, de 15% por geração, como foi observado na tilápia GIFT (Genetically Improved Farming Tilápia), salmão do Pacífico (*Oncorhynchus spp.*) e do Atlântico (*Salmo salar*), truta arco-íris e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). O principal benefício do melhoramento genético para taxa de crescimento é a redução dos custos fixos e custos de produção, devido ao menor requerimento para a manutenção. No programa Norueguês, o qual supre hoje mais de 70% do mercado de ovos geneticamente melhorados de salmão do Atlântico e truta arco-íris, há uma taxa de custo/benefício de 1/15, ou seja, para cada real investido, há um retorno esperado (HULATA, 2001; RESENDE et al., 2008).

Os últimos anos surgiram novos métodos de análise de proteínas, DNA e RNA, devido ao avanço tecnológico da área de biologia molecular. Estes métodos tornaram-se promissores, sendo de fácil aplicação para auxiliar o melhoramento genético animal (REGINATO, 2001).

3.4 Marcadores Moleculares

Diversos marcadores genéticos têm sido desenvolvidos com base na sua herança e padrão de evolução. O uso de classes de marcadores moleculares dirigidas para fluxo gênico e estrutura populacional, tem sido difundido principalmente por técnicas que possibilitam a detecção de polimorfismo genético através de múltiplos *loci* gênicos.

Marcadores moleculares em espécies de peixes neotropicais estão sendo utilizados na identificação da diversidade e também na exploração de característica de interesse econômico e preservação de unidades significativas para a manutenção dessa biodiversidade (TORRES et al., 2004).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou *loci* VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microsatélite (SSR - *Simple Sequence Repeats*); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (JOHN et al, 1996; NEFF et al, 2000; WOLF et al., 2000; ALI et al, 2005; MALDINI et al, 2006; ARANEDA et al, 2009). As tecnologias de marcadores moleculares estão evoluindo rapidamente e modificações já existem para algumas das técnicas acima mencionadas.

Beheregarray e Sunnucks (2000) desenvolveram marcadores moleculares do tipo microsatélites a partir de *O. argentinensis* e *O. perugiae* e testaram em outras espécies de peixe-rei, no sentido de buscar entendimento dos cenários biogeográficos recentes e históricos que moldaram a evolução no gênero *Odontesthes*.

Outros *loci* de microsatélites, desenvolvidos a partir de *Odontesthes bonariensis* foram clonados pelo Dr. Sakamoto (Tokyo University). Estes *loci* foram disponibilizados a partir de 2008 pelo National Center for Biotechnology Information.

Mais recentemente Eriko Koshimizu et al. (2009) construíram um mapa genético e desenvolveram marcadores de DNA ligados ao *locus* de determinação do sexo em peixe-rei da Patagônia (*Odontesthes hatcheri*) através de marcadores AFLP.

3.5 Marcadores Microssatélites

Microssatélites, também chamados de repetições curtas em *tandem* (STRs) ou simples sequências repetidas (SSRs), em que o número de repetições da sequência, de dois a seis pares arranjadas em *tandem*, pode ser alterado devido à troca entre sequências homólogas de DNA satélite durante a mitose ou meiose, ou devido aos eventos de deslizamento, da enzima de polimerização, durante a replicação do DNA. Suas variações de tamanho podem ser de poucas até várias centenas de pares de bases, porém suas sequências flanqueantes permanecem relativamente conservada. Microssatélites tem sido amplamente utilizado em genética e melhoramento animal e vegetas (NEFF et al, 2000; XIAO-GU et al., 2006; MOREIRA et al., 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Aplicações dos SSRs para estudo de genética e reprodução de peixes apareceram no início de 1990. Goff et al. (1992) relataram que SSRs são abundantes em Zebrafish (*Danio rerio*) e são altamente polimórficos, sendo a taxa de mutação estimada em $10^{-2} - 10^{-6}$ por *locus* por geração. Este polimorfismo tem consequências importantes, como a geração de alelos polimórficos que podem ser utilizados em estudos genéticos populacionais, em sistemática e no mapeamento genômico.

Estes marcadores mostraram que são úteis para construção de mapas genéticos e apresentam grande potencial de aplicação na biologia e genética de peixes em aquicultura. A aplicação tem sido utilizada em outras áreas de estudo: genética de populações, ecologia molecular e melhoramento molecular para a gestão dos recursos hídricos.

Os microssatélites apresentam como características um comportamento codominante, que possibilita a detecção de alelos dominantes e recessivos em um

dados *locus*, alto grau de informação de polimorfismo por *locus* gênico, distribuição aleatória por todo o genoma podendo estar associado a regiões expressas, alta conservação entre espécies relacionadas e dependentes de pouca quantidade de DNA na amostra (FERREIRA e CRATTAPAGLIA, 1996; XU et al., 2001; BUSO et al., 2004).

Esta classe de marcadores pode ser classificada conforme a composição das sequências repetidas em: repetições perfeitas, quando não apresentam interrupção (ATATATATATATATATA); repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo (ATATATAGGATATATA); repetições compostas, quando duas ou mais repetições estão dispostas adjacentes (ATATATATATACGCGCGCGCGCGCGCGC). Também são classificados conforme a unidade repetida em: mononucleotídica (A)_n; dinucleotídica (AT)_n; trinucleotídica (ATG)_n; Tetranucleotídica (ATGA)_n; Pentanucleotídica (ATGC)_n; e hexanucleotídica (ATGCT)_n (OLIVEIRA et al., 2006; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Para desenvolvimento de marcadores microssatélites, várias estratégias estão sendo utilizadas, entre elas a construção de bibliotecas genômicas enriquecidas e radioativadas para motivos repetidos (YESBECK e KALAPOTHAKIS, 2007). Esta técnica consiste na extração do DNA genômico da espécie de interesse, seguido por uma digestão do DNA com enzimas específicas. Os fragmentos gerados são ligados a plasmídeos. Após ocorre a transformação e seleção de colônias bacterianas, onde os plasmídeos das colônias positivas sofrem o processo de hibridização através da exposição à membrana de nylon marcada com sondas radioativas, que se liga a SSRs. Os plasmídeos positivos, na etapa de hibridização, são novamente clonados em bactérias e sequenciados, sendo obtido a sequência de nucleotídeos referente ao microssatélite marcado. Estas sequências são analisadas através de programas computacionais e *primers* específicos são desenhados. A próxima etapa é utilização da técnica de PCR (Reação de polimerização em cadeia), onde o fragmento específico de SSR é amplificado. Para análise de polimorfismo desta sequência é necessário a utilização de géis de alta definição, como gel de poli-acrilamida e mais recentemente o Spreadex[®] (*Elchrom Scientific*) (BRINEGAR et al., 2007), ou através do sequenciamento automático.

Em peixe os marcadores microssatélites estão sendo largamente aplicados. Em biologia pesqueira são utilizados para avaliar o tamanho efetivo da população de um estoque (N_e), identificação de populações, níveis de endogamia, estrutura populacional e fluxo gênico, parentesco e características quantitativas (NEFF et al., 2000; MELO et al., 2006).

Yesbeck e Kalapothakis (2007) descrevem cinco *loci* de microssatélites para espécie *Prochilodus lineatus*, endêmica na América do Sul e de extrema importância comercial e pesca artesanal. Os marcadores demonstraram fornecer ferramentas úteis no monitoramento da estrutura genética da população e diversidade genética desta espécie.

Trabalhos de variabilidade genética estão sendo realizados em plantéis de tilápia submetidas a programas de melhoramento genético, em sistema intensivo de cultivo, por meio de marcadores microssatélites (MOREIRA et al., 2007; MELO et al., 2008).

Em peixe-rei Beheregarray e Sunnucks (2000) desenvolveram doze *loci* de microssatélite a partir de *O. argentinensis* e *O. perugiae*, apresentando altos níveis de polimorfismo e heterozigosidade. Estes *loci* também foram testados em várias outras espécies de peixe-rei, onde todos os conjuntos de iniciadores foram testados e apresentaram extenso polimorfismo, indicando que estes marcadores são potencialmente úteis para uma ampla gama de estudos de populações de espécies selvagens e de cativeiro.

3.6 Variabilidade Genética no Melhoramento Genético

A obtenção de linhagens melhoradas, através do melhoramento genético, é uma alternativa para atender a demanda crescente da aquicultura. Para o sucesso do melhoramento é necessário a utilização da seleção, que tem como requisito inicial a existência da variabilidade genética das populações. Uma segunda etapa envolve a identificação das famílias e as características fenotípicas desejadas (BENTSEN et al., 1998; VIEIRA, 2005; BARRERO et al., 2008a).

A variabilidade genética confere aos peixes a capacidade adaptativa às mudanças ambientais, resistência às doenças e ainda pode afetar o crescimento e a reprodução. Portanto, a manutenção destes parâmetros é fundamental para qualquer estratégia de melhoramento e de conservação genética. (POVH et al., 2009)

As práticas de manejo, em aquicultura, devido à alta produção, podem levar à diminuição da variabilidade genética presente em reprodutores, seja por falta de planejamento dos programas de seleção genética ou pelo uso de número reduzido de indivíduos como reprodutores, o que aumenta a probabilidade de endocruzamento (SOUSA et al., 2006; MOREIRA et al., 2007). Podendo com isso trazer problema de impacto genético de introdução de peixes cultivados em populações naturais (LIDANI et al., 2006).

Um ponto fundamental para consolidação de um programa de melhoramento genético é o monitoramento da variabilidade genética animal, sendo possível através da utilização de marcadores moleculares microssatélites, medindo vários parâmetros como polimorfismo, heterozigose observada, diversidade alélica e distancia genética.

Trabalho realizado por Melo et al. (2006) de caracterização genética de plantéis de tilápias da região “Sudeste” do Brasil, através de marcadores microssatélites, verificaram diferenças genéticas entre os plantéis, e de modo geral, está ocorrendo perda de heterozigose nos grupos.

Costa et al. (2006) avaliaram o polimorfismo em *loci* de microssatélites, em peixes migradores de água doce (*Prochilodus costatus*), sendo detectados de dois a 21 alelos por *locus*, demonstrando que estes marcadores fornecem ferramentas eficientes para estudar a estrutura genética da população destes peixes.

Blanck et al. (2009) investigaram a associação de polimorfismo no gene do hormônio de crescimento (GH) às características corporais, em linhagens de tilápiado-nilo, constatando a associação do polimorfismo do gene com as características de desempenho de linhagens desse peixe, onde a associação verificada pode ocorrer em razão do efeito direto da regulação do próprio gene GH.

3.7 Análise da Variabilidade Genética

3.7.1 Polimorfismo

Polimorfismo genético é a ocorrência, em um conjunto de indivíduos, de dois ou mais alelos num *locus*, cada com apreciável frequência. A taxa de polimorfismo corresponde ao número de *loci* polimórficos, relativamente ao número de *loci* analisados, sendo, pois um índice sujeito à dimensão da amostra.

3.7.2 Heterozigose

A heterozigose observada de um *locus* é a proporção de indivíduos heterozigóticos observados nesse *locus*. A heterozigose média observada é a heterozigose observada ponderada pelo número de *loci* estudados.

3.7.3 Diversidade Alélica

Para comparar genótipos diferentes e diferentes populações é necessário existir uma medida quantitativa da variação genética, sendo quantificada utilizando os conceitos de frequência alélica que são a medida da variação genética e de frequência genotípica que indicam unicamente o modo de organização dos alelos em genótipos.

3.7.4 Estatística F

Estatística F introduzida por Whight (1951) para descrever a estrutura de populações, através dos parâmetros F_{st} , F_{it} e F_{is} . O F_{is} mede a redução de heterozigose de um indivíduo devido à reprodução não casual dentro de uma subpopulação, seu valor implica um nível considerável de consanguinidade.

O Fit mede a redução da heterozigose de um indivíduo relativamente ao total da população e reflete o efeito da consanguinidade e deriva genética. E o Fst mede a redução de heterozigose devido à deriva genética dentro de subpopulações, refletindo a diferenciação genética entre subpopulações. Seus valores variam de zero a um, sendo que um valor de Fst alto corresponde a uma diferenciação genética considerável entre populações.

3.7.5 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Descreve a influencia da reprodução ao acaso nas frequências alélicas e genotípicas numa população infinitamente grande. Em uma população, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações. Independentemente de um gene ser raro ou frequente, sua frequência permanecerá a mesma com relação aos outros desde que essas condições sejam mantidas (EDWARDS, 2008).

4 Material e Métodos

4.1 Local de Desenvolvimento do Projeto

O experimento foi desenvolvido em parceria entre o Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e o Laboratório de Engenharia Genética Animal do Centro de Biotecnologia, ambos da Universidade Federal de Pelotas – RS, no período de março de 2008 a março de 2010.

4.2 Amostras

Foram analisados 85 animais de duas populações de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*), 40 animais coletados na lagoa de Chascomús, localizado na Província de Buenos Aires, Argentina e 45 animais coletados na barragem do Chasqueiro localizado no município de Arroio Grande, estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

A lagoa de Chascomús está localizada na região nordeste da Província de Buenos Aires, Argentina (35° 35´S, 58° 02´O). Tem uma superfície total de 3012,9Ha com volume total de 47015300m³, profundidade média de 2,20 m, superfície coberta por juncos (*Schoenocleprus californicus*) e temperatura média de 14°C. O corpo da água é abastecido por seis afluentes e um emissário. É considerada uma lagoa oligohalina (<5 g/L de sólidos dissolvidos totais), alcalina (pH médio de 8,6) apresentando uma permanente circulação vertical que determina uma saturação de oxigênio dissolvido próximo ao fundo, uma alta concentração de material em suspensão que afeta a transmissão de luz na coluna de água. Corpo de água eutrófico, pois a concentração de nutrientes (média de nitrogênio total de 1,56 mgN/l

e fósforo total de 249 ugP/l) e pigmentos (média de clorofila a 24,3 ug/l) são elevados (CAPÍTULO e FREYRE, 1995; BERASAIN et al., 2005).

As primeiras tentativas de domesticação e cultura do peixe-rei foram realizadas na Argentina no início do século 20. No entanto, foi somente após a instalação de uma incubadora provisória de peixe-rei na cidade de Chascomús, Província de Buenos Aires, em 1925 que estas tentativas ganharam impulso. A atividade desta incubadora, juntamente com inúmeros pedidos de ovos fertilizados e de larvas para introdução em corpos d'água públicos e privados levou à construção de um novo centro de incubação chamado de Río III, Província de Córdoba, e com a realocização e ampliação da incubadora de Chascomús, na sua atual localização. Estas incubadoras foram particularmente úteis em algumas regiões como a Província de Buenos Aires, onde o sistema hidrológico é extremamente afetado por secas e inundações ou por se tornar inadequada ciclicamente (por exemplo, hipersalinidade). Costuma-se argumentar que a força motriz para os esforços de propagação, introduções e programas de repovoamento, historicamente foi a importância social da pesca recreativa e o fato de que o acesso e a distribuição de ovos, larvas e juvenis foram os instrumentos de influência política. No entanto, esses programas foram realizados muitas vezes em precárias condições, com pouco apoio e limitados a lotação de embriões ou larvas recém-eclodidas sem gerenciamento dos corpos d'água (SOMOZA, et al., 2008).

A Barragem do Chasqueiro localizada no Município de Arroio Grande (32° 10'S 53° 00'O) foi construída no final da década de 1970, dentro do Programa da Bacia da Lagoa Mirim (PROMIRIM), sob responsabilidade do Ministério do Interior, através da Superintendência de Desenvolvimento da Região Sul – SUDESUL e entrou em operação em 1984, estando atualmente sob administração da Universidade Federal de Pelotas - UFPel. A barragem possui um sistema de canais com cerca de 50Km, e infra-estrutura física adequada para a produção (irrigação, estradas e outros serviços) contribuindo com a produção agrícola regional. Com 1.900ha de lamina de água é reconhecida como área de grande produção pesqueira e desperta interesse de comunidades pesqueiras da região, que pretendem usufruir da produção de peixes do local. A região apresenta clima subtropical, sendo que a

temperatura da água varia entre 11 e 27°C, o pH de 6,8 a 7,4 e alcalinidade de 30 a 45 mg/L.

As espécies de peixes que ocorrem no local são as mesmas da bacia hidrográfica da Lagoa Mirim, com predominância de traíra (*Hoplias malabaricus*), jundiá (*Rhamdia quelem*), pintado (*Pimelodus maculatus*), tambica (*Oligossarcus robustus* e *O. jeninsea*) e uma grande variedade de labaris (*Astyanax spp.*). A presença do peixe-rei *Odontesthes spp.* deve-se a introduções realizadas pela Agência da Lagoa Mirim, com o propósito de incrementar a produção pesqueira do local, já que esta espécie não ocorre naturalmente em reservatórios artificiais. De acordo com informações pessoais do Prof. Sérgio Piedras, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel da UFPEL, que foi responsável técnico pela produção dos alevinos introduzidos na barragem, foram feitas três povoamentos entre os anos de 1980 e 1985. Em 1980, antes de a barragem ser fechada para enchimento, foi realizado o povoamento de um açude com área de 1,0ha, existente na bacia de acumulação da barragem. O açude foi limpo, recebeu calagem e adubação química e então povoado com 5.000 alevinos de peixe-rei, com cerca de 2,0cm. Em 1984, já com a bacia de acumulação em seu nível máximo, foi construído um pequeno açude, com cerca de 0,5ha, na margem direita a montante da barragem, que após calagem e adubação foi povoado com 3.000 alevinos e após três meses, quando os alevinos apresentavam 5,0cm, foram liberados no corpo da barragem. Em 1985 foi realizado o terceiro e último povoamento com 2.500 juvenis de peixe-rei, medindo entre 8 e 12cm, que foram liberados no corpo da barragem. As espécies liberadas foram oriundas de fertilizações artificiais com peixes capturados na Lagoa Mangueira, predominantemente *Odontesthes bonariensis* e *O. humensis*, sendo muito provável que tenha ocorrido também a introdução de animais cruzados com machos de *O. humensis* e fêmeas de *O. bonariensis*, já que as fertilizações eram realizadas por várias pessoas, de maneira que o controle sobre o procedimento não era total.

4.3 Extração do DNA

Diversas técnicas de biologia molecular estão sendo utilizadas na pesquisa de sequências de DNA, requerendo quantidades e boa qualidade de DNA, para isto torna-se necessário a busca por métodos de extração eficazes para cada espécie e tecido animal, de baixo custo e produto com mínimo de resíduos e degradação.

A fonte de DNA pode ser de vários tipos de tecidos como pele, músculo, espermatozoides, sangue, restos celulares, fluidos corpóreos, que possam ser guardados através de congelamento, fixação em parafina, álcool e formol.

O material coletado foi de fragmentos de músculo e nadadeira caudal (aproximadamente 200–300mg), sendo armazenados em etanol 95% e preservados a -20°C. Após a coleta foram submetidos a três protocolos diferentes: Fenol – Clorofórmio (BARDAKCI e SKIBINSKI, 1994); Cloreto de Sódio (BARRERO et al., 2008b) e Acetato de Amônia (Cloreto de Sódio modificado).

4.3.1 Protocolo Fenol – Clorofórmio

É um protocolo que demanda tempo para ser realizado, sendo utilizados para a purificação do DNA as substâncias fenol e clorofórmio, consideradas tóxicas para o organismo humano.

As amostras foram colocadas em microtubos, e em seguida, adicionou-se 500µL de tampão de lise (100mM de Tris-HCL pH 7,4, 10mM de EDTA, 400mM de NaCl e 1% de SDS, 40µg/ml de RNase e 0,2% de SDS) e 3µL de proteinase K (200µg/ml). Estas foram incubadas em banho-maria a 40°C *overnigh*. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-clorofórmio e uma com clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de volume de etanol absoluto onde permaneceu incubado por 24 horas a -20°C. Posteriormente o álcool absoluto foi retirado e adicionado álcool etílico 70%, centrifugado a 12000 rotações por minuto (rpm) e colocado em estufa a 40°C para evaporar o restante do etanol. Em seguida o DNA foi hidratado com água ultra-pura e estocado a -20°C.

4.3.2 Protocolo Cloreto de Sódio

O Protocolo de extração usando sal (NaCl) é uma alternativa simples, fácil, rápido e não contaminante para a obtenção de DNA de boa qualidade em quantidades suficientes.

Amostras de tecido de peixes foram colocados em microtubos com 550 μ L de tampão de lise (50mM Tris-HCl, pH 8,0, 50mM EDTA, 100mM NaCl), contendo 1% SDS e 7 μ L de 200 μ g.mL⁻¹ de proteinase K. Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 50°C por 12 horas. Em seguida, 600 μ L de NaCl 5M foram adicionados a cada amostra, antes de serem centrifugadas por 10 minutos a 12000rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde o DNA foi precipitado com 700 μ L de etanol absoluto gelado e posteriormente incubadas a -20°C por 2 horas. As amostras de DNA foram centrifugadas, lavadas com 700 μ L de etanol 70% e ressuspensos com 50 μ L em tampão TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA), tratados com 30 μ g.mL⁻¹ de RNase, e incubadas em banho-maria durante 40 minutos a 37°C. O DNA obtido foi mantido a -20°C.

4.3.3 Protocolo Acetato de Amônia

Este protocolo utiliza o mesmo princípio do protocolo com NaCl.

Pedaços de tecido foram colocados em microtubos com 900 μ L de tampão de lise (10mM Tris-Base, 10mM EDTA, 2% SDS, pH 8,0), sendo adicionado 6 μ L de 200 μ g.mL⁻¹ de proteinase K. Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 55°C *overnight*. Em seguida foi adicionada 4 μ L de RNase, agitados rapidamente no vortex e incubados a 37°C por uma hora. Após foi adicionado 300 μ L de acetato de amônia 7,5M e agitados em vortex por 10 segundos. Os microtubos foram resfriados em gelo por aproximadamente 15 minutos e centrifugados a 13500rpm por três minutos. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde o DNA foi precipitado com 900 μ L de isopropanol. As amostras de DNA foram centrifugadas, lavadas com 500 μ L de etanol 70% e ressuspensos com 50 μ L de água ultra-pura. O DNA obtido foi mantido a -20°C.

A integridade do DNA extraído, dos três protocolos, foi checada em gel de agarose 0,6%, corados com GelGreenTM (Biotium) (0,2µL/mL) e visualizada sobre radiação ultravioleta. A eletroforese do gel foi conduzida em 140 volts por 30 minutos em cuba horizontal 20 x 20cm, usando tampão TBE 0,5x (500mM de Tris-HCL, 60mM de ácido bórico e 83mM de EDTA)

4.4 Busca de Sequência de Microssatélites e Desenho de *Primers*

A busca por sequência de nucleotídeos relacionados com microssatélites em peixe-rei foi realizada na interface para recuperação de informação de bancos de dados (BD) biológico online “*National Center for Biotechnology Information*” (NCBI). As bases de dados em biologia molecular são importantes principalmente para proporcionar à comunidade científica (e a quem mais interessar) uma forma de tornar os dados produzidos em todo o mundo acessíveis de forma mais fácil, rápida e inteligente.

O NCBI foi criado em 1988 como uma base de dados robusta para armazenar a explosão de sequências geradas pelos pesquisadores, em consequência dos sequenciamentos em larga escala. O Sistema *Entrez* do NCBI relacionamento lógico pré-existente entre as entradas individuais encontradas em diversos BD públicos. A existência desta conexão permite uma pesquisa de informação sem a necessidade de visitar sequencialmente BD distintos.

Para espécie *Odontesthes bonariensis* foram encontrados 23 *loci* de microssatélites, desenvolvidos pelo Dr. Sakamoto (Tokyo University). Para este estudo foram selecionados seis *loci* (Tabela 4).

Tabela 4 – Marcadores microssatélites em *Odontesthes bonariensis*.

<i>Locus</i>	Tamanho	Repetição/tamanho	Nº de acesso (<i>GenBank</i>)
Obo19TUF	510pb	CA/16pb	AB375413.1
Obo21TUF	346pb	GT/30pb	AB375414
Obo64TUF	285pb	GT/20pb	AB375424.1
Obo71TUF	542pb	CA/40pb	AB375426.1
Obo77TUF	495pb	CA/28pb	AB375428.1
Obo79TUF	568pb	CA/16pb	AB375429.1

pb= pares de bases.

Para uma reação ser bem sucedida o desenho de *primers* é um passo crucial, sendo um procedimento simples quando a sequência de DNA é conhecida, porém para a amplificação de um gene em diferentes espécies de mesmo gênero, este processo torna-se complicado. Vários programas de bioinformática são conhecidos para desenho de *primers*.

A eficiência do *primer* só será alcançada seguindo alguns passos:

- Tamanho: 15 a 30 pares de base;
- Concentração de 40-50% de CG (Citosina e Guanina) distribuídos aleatoriamente na sequência;
- Reduzida regiões de *dímeros* e *hairpins* (auto anelamento);
- Temperatura de anelamento (Tanel) em torno de 55°C.

O tamanho do *primer* está ligado diretamente com sua especificidade, quanto maior o oligonucleotídeo, maior será a especificidade do *primer*. A probabilidade de uma sequência específica de 20 pares de base ocorrer em um genoma é de uma vez a cada 4^{10} ($\sim 10^{12}$) nucleotídeos.

A Temperatura de anelamento é importante para evitar anelamento inespecífico do *primer*, isto é, ocorrer amplificação de regiões inesperadas. Na teoria o cálculo utilizado é pela fórmula $T_{anel} = T_m$ (Temperatura *melting*) – 4°C, onde a $T_m = 4(G + C) + 2(A + T)^\circ C$, mas existem programas que calculam esta temperatura com maior precisão.

Desenvolvimento de *primers* foi realizado através do programa computacional *Vector NTI 10.0*[®] (*Invitrogen corporation*), com ajustes manuais (Tabela 5).

Tabela 5 – Sequência e temperatura de anelamento dos *primers* e tamanho do fragmento esperado.

<i>Locus</i>	Sequência primers (5'-3')	Produto do PCR	T _m
Obo19TUF	F: TACTCAGCCTACCCTAATGCG R: TTGTGTGTTTGTGTGTGGAGG	223pb	55°C
Obo21TUF	F: TGTGGGTTGTAATCTCCTGCC R: TTGTGTGTTTGTGTGTGGAGG	174pb	56°C
Obo64TUF	F: GGAAGTGACCAGATAGGCAGC R: TGCTGCCATTTCTTCCTG	134pb	55°C
Obo71TUF	F: TCCTCCCTTTCTGTCTGTTTCC R: TTAGGACACCAGAGCCCAAAG	192pb	56°C
Obo77TUF	F: TCAGAGACGGATACACACTTGGC R: TCTACCAAATCGGGGAAGG	164pb	58°C
Obo79TUF	F: GCGGTGACAGGACAATTTTC R: GGGATGTTTTTCAGTGGTGTTCAG	98pb	56°C

pb = pares de bases, T_m = temperatura *melting*.

4.5 Amplificação dos Microssatélites

A tecnologia da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi concebida por Kary Mullis em meados da década de 80, causando uma revolução na biologia tanto na pesquisa como em áreas aplicadas envolvendo diagnósticos e melhoramento genético de plantas e animais domésticos (VIEIRA, 2007). A facilidade, rapidez, versatilidade e sensibilidade da PCR, a torna particularmente poderosa para estudos genéticos e moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA genômico, 0,5µL de cada *primer* (10pmol), 2,5µL de 1X *buffer* de PCR (10mM Tris HCl, 1,5mM MgCl₂ e 50mM KCl), 1,5µL MgCl₂ (25mM), 0,5µL de dNTP (100µM), 0,2µL de *Taq DNA polimerase*[®] (*Fermentas Life Sciences*) e 18,3µL de

água livre de nuclease. O controle negativo (reação sem a presença de DNA) foi utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação.

As reações foram realizadas em um termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient*[®] (*Eppendorf*). A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada *primer* (Tabela 4) por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, terminando com uma extensão final de 8 minutos a 72°C.

A checagem da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 0,6% tingido com corante *GelGreen*[™]. Após a eletroforese os produtos foram analisados em transluminador sob luz UV e registrados digitalmente.

4.6 Análise do Polimorfismo

Para análise do polimorfismo, os produtos de PCR foram separados em gel *Spreadex EL 600 Wide Mini S-2x25*[®] (*Elchrom Scientific*), utilizando o equipamento de eletroforese *ORIGINS*[®] (*Elchrom Scientific*), com tampão de corrida de TAE 1X (40mM de Tris, 20mM de ácido acético e 1mM de EDTA) (Figura 6).



Figura 6 – Cuba de eletroforese *ORIGINS*[®] para gel *Spreadex*[®].
Fonte: *Elchrom Scientific*.

Cada gel, com capacidade para 50 amostras, foi carregado com 44 amostras contendo em cada dois *loci* de tamanhos distintos do mesmo animal, totalizando 88 análises por gel. Para as amostras foram utilizados 2 μ L de *loading buffer* (5x), 1 μ L de PCR de cada *locus* e 6 μ L de água ultra-pura.

Para criar uma grade de tamanho molecular pela qual foram estimados os tamanhos dos alelos de microssatélites amplificados, cada gel incluía seis marcadores, sendo dois *M3 Marker*[®] (*Elchorn Scientific*), e quatro *50pb DNA Ladder*[®] (*Fermentas Life Sciences*).

Inicialmente os géis foram submetidos à eletroforese, sem circulação do tampão, com voltagem constante de 60V por 4,5 minutos, após a voltagem foi elevada para 120V, resultando em uma miliamperagem de 245mA, por um período de 360 minutos. A temperatura permaneceu constantemente a 20°C.

Para revelação dos géis utilizou-se banho com corante *GelGreen*[®] (10 μ L de corante e 2000 μ L de TAE 1X) diluído em 200 ml de água ultra-pura, por um tempo de 40 minutos. Após os géis sofreram um banho de 30 minutos em água ultra-pura e foram analisados sob luz ultravioleta e fotografados digitalmente.

4.7 Análise dos Dados

Os alelos dos *loci* foram discriminados através de observação direta no gel. Baseando-se na presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo *locus*).

A diversidade genética dentro das populações foi caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada, diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por *locus*, porcentagem de *loci* polimórficos e índice de fixação de Wright, estimativas obtidas pelo uso do programa *Genepop 4.0*.

5 Resultados e Discussão

5.1 Qualidade do DNA

O protocolo Fenol - Clorofórmio apresentou visualmente a melhor qualidade e quantidade de DNA extraído, sem degradação e contaminação por proteína. Os protocolos Cloreto de sódio e Acetato de amônia apresentaram quantidades satisfatórias de DNA, porém o protocolo Cloreto de sódio apresentou aparentes níveis de degradação de DNA e o protocolo Acetato de Amônia aparente quantidade de RNA (Figura 7abc).

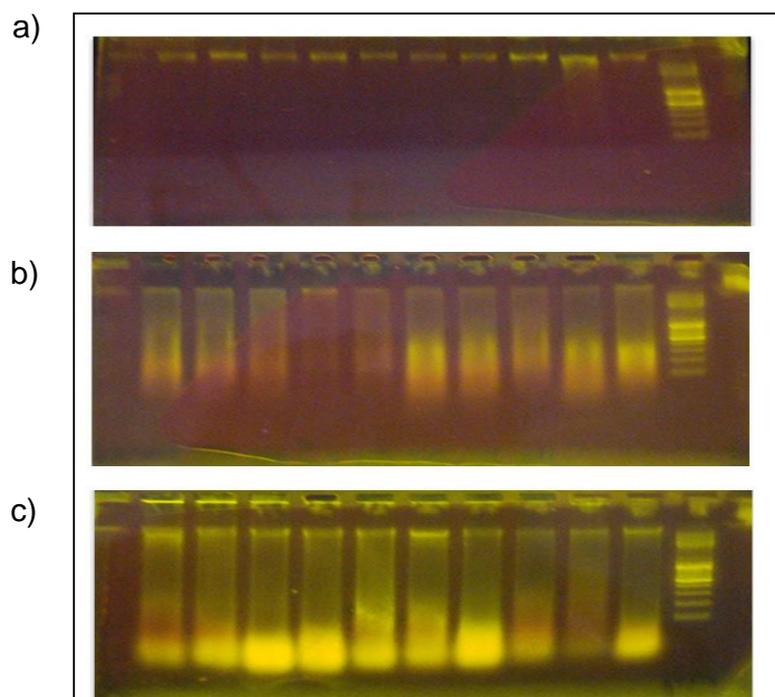


Figura 7 – Análise da extração de DNA em gel de agarose 1%. a) Protocolo Fenol – Clorofórmio, b) Protocolo Cloreto de Sódio e c) Protocolo Acetato de Amônia.

Parpinelli e Ribeiro (2009) analisaram três protocolos de extração de DNA (Fenol - Clorofórmio, NaCl e Brometo de cetiltrimetilamônio - CTAB) em três diferentes tipos de tecido de tilápia do Nilo (Nadadeira caudal, músculo e brânquias), concluindo que dentro dos mesmos tecidos os melhores resultados quanto a concentração de DNA foram para a extração de DNA de brânquias e nadadeiras. Em relação à pureza do DNA, o método de extração através do protocolo Fenol - Clorofórmio, para os tecidos de nadadeira, músculo e brânquias, parece ser o recomendado para estudos moleculares em peixes, por apresentar um grau de pureza considerado ideal.

Estudo realizado por Barerro et al. (2008) mostra que a extração de DNA, de nadadeira de peixe, com protocolo de extração usando sal (NaCl) obteve uma maior quantidade de DNA em comparação com o protocolo de extração de Fenol - Clorofórmio. Concluindo que este procedimento de extração de DNA constitui uma alternativa e um eficiente substituto para os protocolos anteriores, melhorando os estudos moleculares em peixes.

Viloria et al. (2005) obtiveram dificuldades para extração de DNA de larvas de peixes marinhos, armazenados em formalina por um longo período de tempo. Porém conseguiram amplificação de DNA por PCR de larvas armazenadas por um curto período de tempo (menos de 48h).

Foi realizado um PCR com as amostras obtidas das extrações, onde todas apresentaram amplificação. Os resultados demonstram a validade dos três protocolos para a extração do DNA total de tecido de peixes, mas as metodologias devem ser melhoradas para uma melhor qualidade do produto extraído.

5.2 Polimorfismo

Análise de polimorfismo de microssatélites é bastante difícil, pois o aparecimento de bandas extras pode dificultar a avaliação do tamanho e tipo de banda, outro fator a se considerar é a possibilidade de existir a sobreposição de dois conjuntos de bandas, mascarando o estado heterozigoto, ou seja, um único agrupamento de bandas representaria um único alelo, sendo avaliado como

homozigoto (XU et al., 2001; TAUTZ, 1989). Para este estudo considerou-se como padrão de banda a com maior intensidade e os alelos foram nomeados de acordo com o número de pares de bases determinado por comparação com marcadores de pesos conhecidos.

Outras limitações que pode ocorrer estão relacionados ao preparo dos géis, equipamentos, tempo de corrida e revelação dos géis, podendo ocorrer erros de análise nas corridas de microssatélites.

Os microssatélites analisados apresentaram alto polimorfismo. Os números de alelos variam de 4 a 15. Para todas as amostras foi obtido um total de 49 alelos, com uma média de 8,16 alelos por *locus*.

O *locus* Obo21TUF foi o que apresentou maior número de alelos, 15 no total, sendo os *loci* Obo64TUF e Obo79TUF os que apresentaram uma quantidade menor de alelos, 4 em cada *locus* (Tabela 6). Porém o *locus* Obo64TUF, como observado na tabela 6 e figura 8, não apresentou amplificação consistente, amplificando parte das amostras de animais da Argentina e não amplificando as amostras do Brasil, podendo ser resultado de mutação nas regiões flanqueantes.

Tabela 6 – Número de alelos encontrados por *locus*.

<i>Locus</i>	Tamanho dos alelos (pb)*	Número de indivíduos	Número de alelo/ <i>locus</i>
Obo19TUF	215-237	80	5
Obo21TUF	160-200	79	15
Obo64TUF	132-152	21	4
Obo71TUF	170-208	76	12
Obo77TUF	158-186	69	9
Obo79TUF	94-100	78	4

*Pares de bases

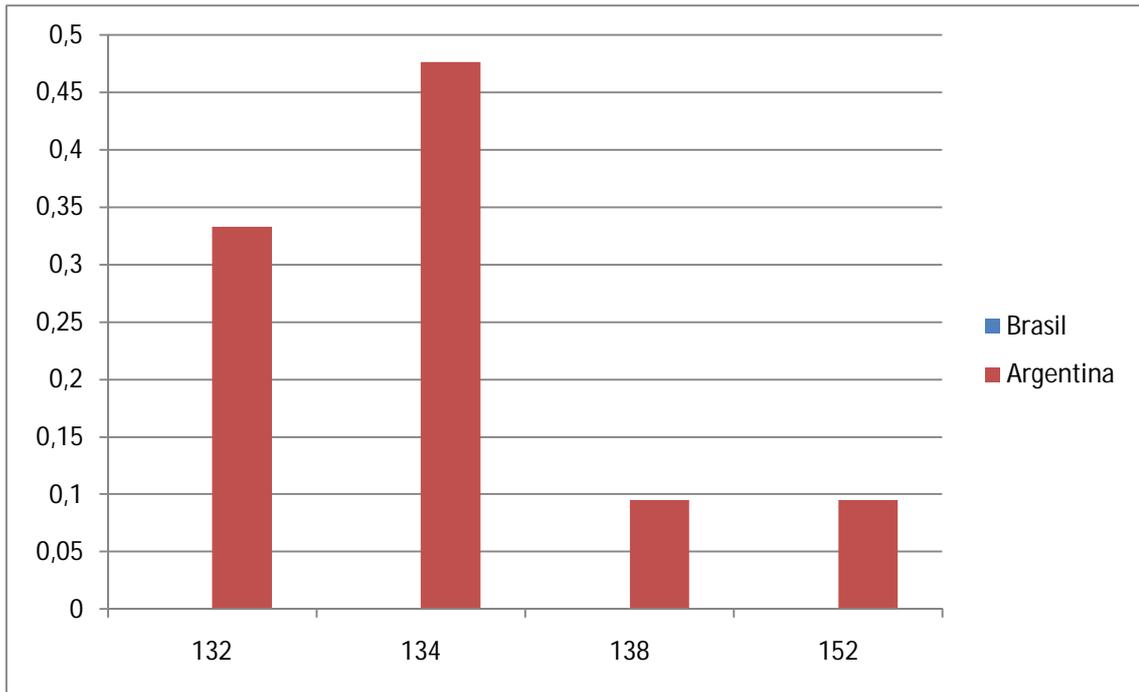


Figura 8 – Frequências dos alelos do *locus* Obo64TUF nas populações do Brasil e Argentina.

Para o *locus* Obo19TUF, o alelo 233 apresentou maior frequência (0,625) na população do Brasil e não apresentou amplificação na população da Argentina, que apresentou o alelo 215 como mais freqüente (0,5) (Figura 9).

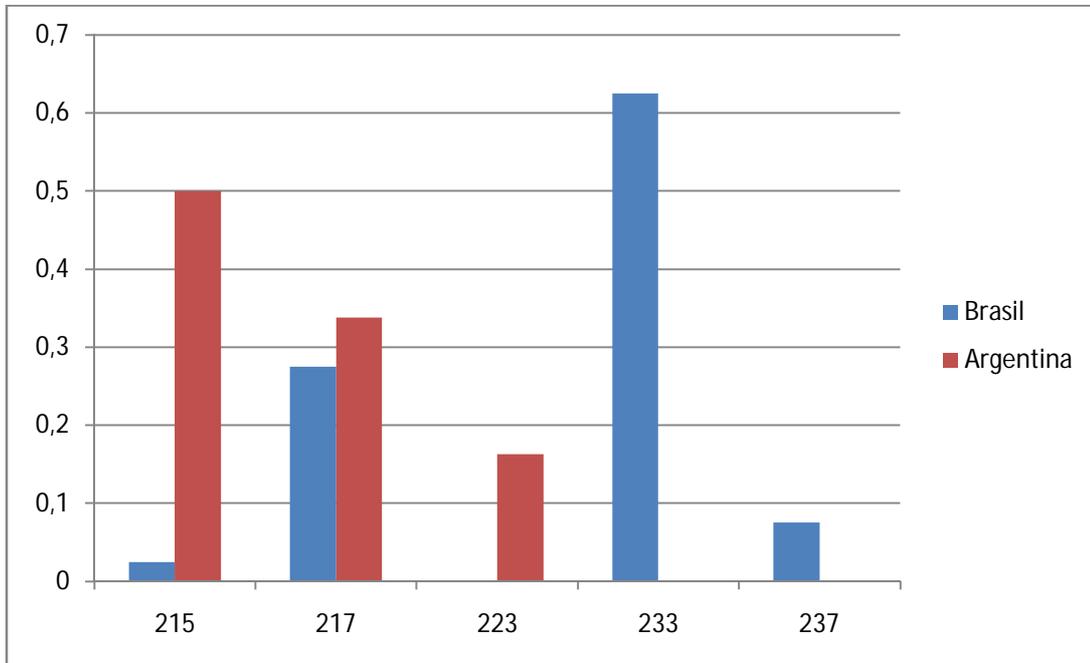


Figura 9- Frequências dos alelos do *locus* Obo19TUF nas populações do Brasil e Argentina.

Os *loci* Obo21TUF, Obo71TUF, Obo77TUF foram os mais expressivos apresentando respectivamente 15, 12 e 9 alelos por *locus*. Na figura 10 podemos verificar a alta taxa de alelos encontrado dentro das duas populações no *locus* Obo21TUF. O alelo 170 apresentou a maior frequência na população do Brasil (0,282) e na população da Argentina o alelo 178 foi o mais freqüente (0,188). Para o *locus* Obo71TUF foram encontrados sete alelos para população do Brasil e nove para população da Argentina (Figura 11). No *locus* Obo77TUF foram encontrados cinco alelos na população do Brasil e nove na população da Argentina (Figura 12).

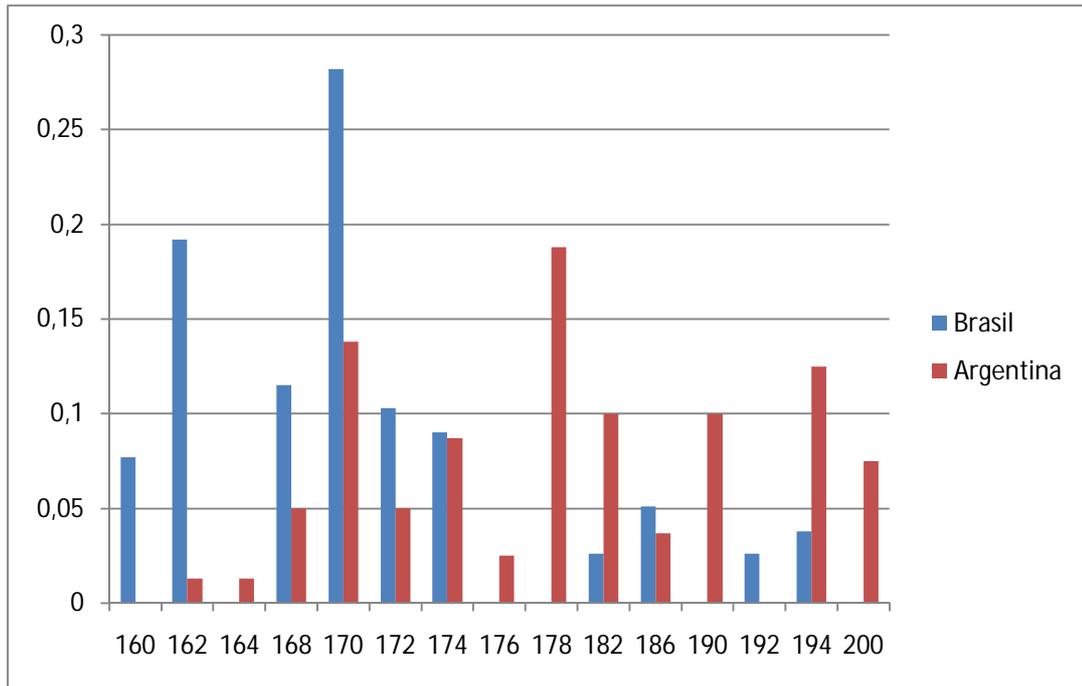


Figura 10 - Frequências dos alelos do *locus* Obo21TUF nas populações do Brasil e Argentina.

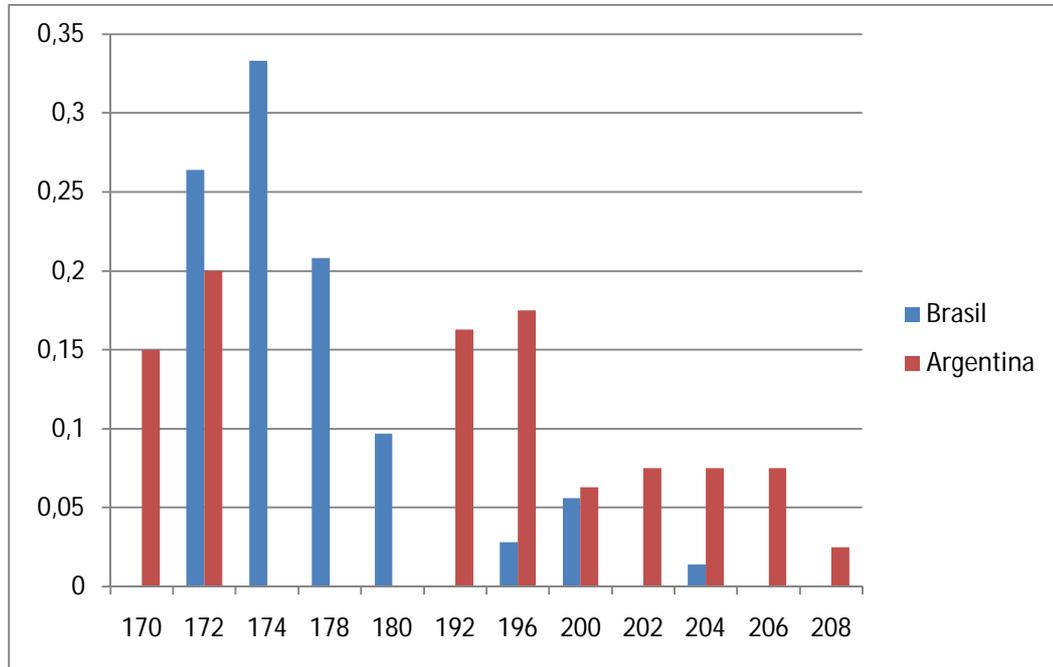


Figura 11 - Frequências dos alelos do *locus* Obo71TUF nas populações do Brasil e Argentina.

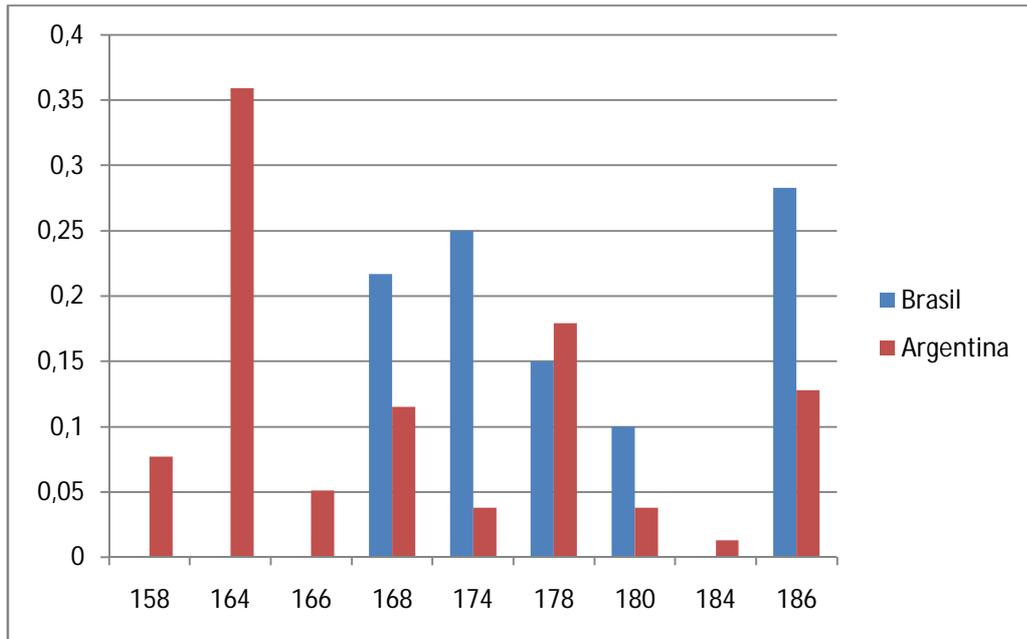


Figura 12 - Frequências dos alelos do *locus* Obo77TUF nas populações do Brasil e Argentina.

O *locus* Obo79TUF demonstrou uma distribuição dos alelos mais uniforme, onde apresenta quatro alelos em ambas as populações, sendo o alelo 98 mais frequente na população do Brasil (0,313) e o alelo 96 mais frequente na população da Argentina (0,382) (Figura 13). Esta característica mostra que este *locus* está sofrendo uma baixa taxa de mutação.

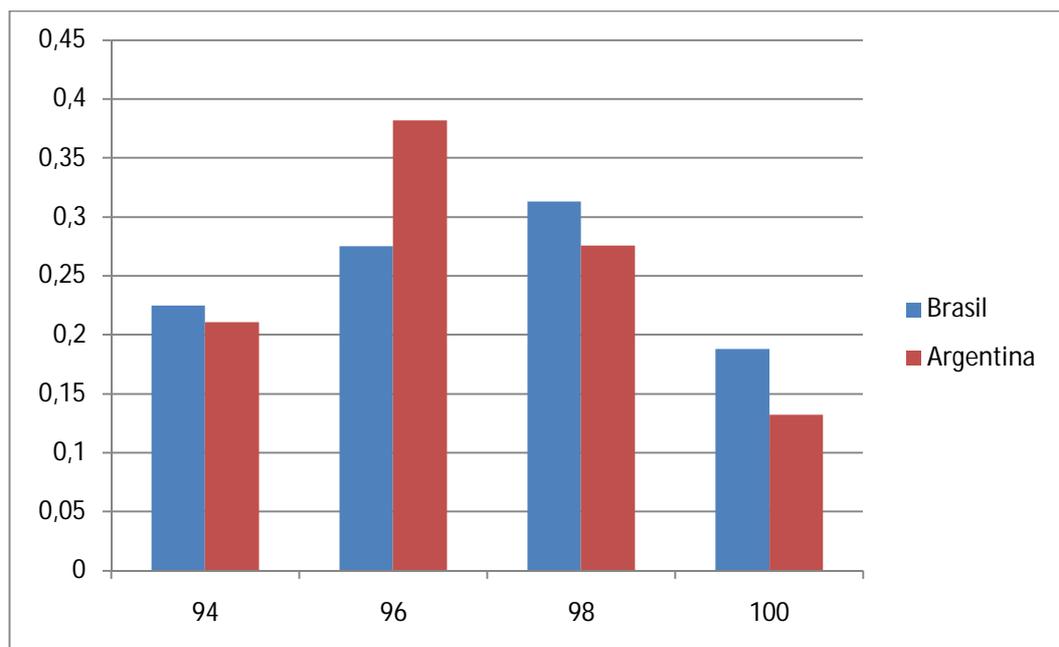


Figura 13 - Frequências dos alelos do *locus* Obo79TUF nas populações do Brasil e Argentina.

Beheregarray e Sunnucks (2000) analisaram 12 *loci* de microssatélites, em peixe-rei das espécies *O. argentinensis* e *O. perugiae*, amplificando com sucesso e apresentando altos níveis de polimorfismo (6 a 33). Também foram testados estes mesmos *loci* em 15 amostras de *O. bonariensis*, mostrando a amplificação de 2 a 11 alelos por *locus*. Guilemaud (2000) caracterizou em *Coris julis* 10 *loci* de microssatélites demonstrando um número de alelos variando de 2 a 23. Estes dados assemelham aos encontrados neste estudo (4 a 15).

As altas taxas de mutação em sítios de microssatélites geram o alto número de alelos por *locus* (FORBES et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2006). Outros mecanismos são propostos podendo agir em conjunto: *Crossing-over* desigual durante a meiose e deslizamento da fita molde durante a replicação (LEVISON e GUTMAN, 1987).

5.3 Índices de Fixação

A heterozigose esperada (H_e) variou de 0,534 no *locus* Obo19TUF da população do Brasil, a 0,90 no *locus* Obo21TUF da população da Argentina. A heterozigose observada (H_o) variou de 0,25 no *locus* Obo19TUF da população do Brasil, a 0,85 no *locus* Obo21TUF da população da Argentina (Tabela 4).

O índice de endogamia com valores positivos sugere um déficit de heterozigotos para todos os *loci* analisados nas duas populações. Para população do Brasil somente o *locus* Obo77TUF apresenta-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Na população da Argentina os *loci* Obo19TUF, Obo64TUF e Obo79TUF estão em equilíbrio (Tabela 7).

Tabela 7 – Análise da variação genética para os seis *loci* microssatélites nas duas populações de *O. bonariensis*. N, número de amostras; A, número de alelos por *locus*; Ho, heterozigosidade observada; He, Heterozigosidade esperada; Fis, coeficiente de endogamia; HWE, desequilíbrio de Hardy-weinberg.

Locus	Brasil	Argentina
Obo19TUF		
N	40	40
A	4	3
Ho	0,25	0,525
He	0,534	0,617
Fis	0.5352	0.1513
HWE	0.0071*	0.1925
Obo21TUF		
N	39	40
A	10	13
Ho	0,615	0,85
He	0,829	0,90
Fis	0.2796	0.0572
HWE	0.0112*	0.0156*
Obo64TUF		
N	-	21
A	-	4
Ho	-	0,523
He	-	0,659
Fis	-	0.2101
HWE	-	0.1938
Obo71TUF		
N	36	40
A	7	9
Ho	0,5	0,675
He	0,773	0,869
Fis	0.3565	0.2263

HWE	0.0093*	0.0278*
<hr/>		
Obo77TUF		
N	30	39
A	5	9
Ho	0,7	0,692
He	0,7909	0,8078
Fis	0.1168	0.1126
HWE	0.1518	0.0184*
<hr/>		
Obo79TUF		
N	40	38
A	4	4
Ho	0,625	0,605
He	0,7573	0,725
Fis	0.1688	0.1681
HWE	0.0433*	0.0700

*Significativo (P<0,05)

Ao contrario deste estudo, Beheregarray e Sunnucks (2001) não encontraram diferença na heterozigosidade observada e esperada, em nove microssatélites analisados em peixe-rei coletados de regiões do sul do Brasil, Argentina e Uruguai. Também todos os *loci* analisados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

No estudo realizado por Costa et al. (2006), indicou que 4 de 6 microssatélites, analisados em *Prochilodus costatus*, apresentaram desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo um significativo déficit de heterozigotos para estes *loci*. Sugere ainda que este déficit possa ser causado pela estratégia de amostragem, que inclui indivíduos de diferentes locais de coleta, onde se eles representam subpopulações, o padrão de déficit pode surgir devido ao efeito de Wahlund, ou seja, uma mistura física das populações, com diferentes frequências alélicas. Porém no caso de uma única população pode ser devido a alelos nulos.

Karlsson e Mork (2005) analisaram o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e instabilidade temporal das frequências alélicas em *loci* microssatélites em uma população de bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), observando em dois *loci* de

microssatélites um alto polimorfismo, com 33 e 22 alelos e heterozigosidade esperada de 0,707 e 0,861 respectivamente. Também foi observado um déficit de heterozigotos em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg em ambos os *loci*, podendo ser resultado do efeito Wahlund ou causadas pela seleção natural, acasalamento fenotípico, endogamia e ou alelos nulos.

Em estudo realizado com microssatélites isolados de Piraputanga (*Brycon hilarii*), foram analisados sete *loci* e encontrados de três a oito alelos por *locus*. A heterozigose esperada foi de 0,31 a 0,81 e um *locus* apresentou déficit de heterozigotos indicando a ocorrência de alelos nulos, amostragem não aleatória ou consanguinidade (SANCHES e GALETTI JR., 2006).

Alelos nulos são os que não amplificam, geralmente devido a mutações em certos *loci* ou por causa de uma amplificação de um alelo em heterozigose de menor tamanho, de modo que se este alelo heterozigoto for definido como um alelo nulo poderia indicar a presença de homozigoto inadequadamente (WARD, 1990).

O déficit de heterozigoto mais acentuado na população da barragem do Chasqueiro (Brasil) pode ser explicado devido à população não ser natural, ou seja, é uma população introduzida, onde foi submetida ao efeito fundador. Por haver poucos fundadores, existe a possibilidade de quebra acentuada da variabilidade genética da nova população em relação à população originária. Existe também uma elevada probabilidade de ocorrer endogamia.

A constatação da causa do déficit de heterozigotos para estas duas populações analisadas é necessária a relação com outras populações de locais diferentes.

5.4 Diferenciação Genética

O valor de F_{st} entre as duas populações foi de 0,1303, ou seja, as populações apresentam moderada diferenciação genética ($P < 0,05$).

Beheregarray e Sunnucks (2001) encontraram divergência genética entre populações de *O. argentinensis* localizadas em estuários e populações marinhas próximas. A divergência genética não foi correlacionada com a distância geográfica, pois amostras coletadas com menos de 20km de distância apresentavam diferenciação genética maior que populações separadas por mais de 500km. Também observaram que uma ausência de barreiras geográficas e fisiológicas para o fluxo de genes, juntamente com os tamanhos de populações e a recente formação dos ambientes estuarinos sugere que a deriva genética sozinha não pode explicar a divergência genética observada. Sustentando que a mudança da vida marinha para a estuarina tem promovido rápida divergência adaptativa e isolamento reprodutivo dos peixes estuarinos.

Em estudo com carpas (*Ctenopharyngodon idella*) de populações selvagens e populações cultivadas da China e Malásia, apresentou F_{st} variando de 0,004 para 0,273, onde as populações cultivadas foram significativamente diferenciadas de populações selvagens, com alta diversidade genética. Em uma análise global a população da Malásia diferiu geneticamente da população da China, sendo causada pela separação geográfica, através do impedimento do fluxo de genes (LIU et al., 2009). Esta pode ser a causa da diferenciação genética encontrada neste estudo.

6 Conclusão

A perda da variabilidade genética reduz a capacidade que uma população possui para se adaptar a diferentes condições ambientais, sendo de extrema importância para programas de reprodução seletiva. No entanto, a variação genética é difícil de estimar sem marcadores genéticos polimórficos. Através do alto polimorfismo analisados nos seis *loci* microssatélites, estes fornecem uma ferramenta eficiente para estudo da variação genética de *O. bonariensis*.

O déficit de heterozigotos observado na população do Brasil pode ser consequência do efeito fundador e acasalamentos não aleatórios.

A diferenciação genética significativa nas populações analisadas pode fornecer a base para futuros programas de melhoramentos genéticos, através da combinação de material das populações divergentes para o desenvolvimento de linhagens ou execução de um programa de seleção.

7 Considerações Finais

Novas tecnologias surgem para trazer benefícios a todos que a utilizam, porém frustrações comumente ocorrem devido à falta de resultados esperados. A utilização do equipamento *ORIGINS*[®] não apresentou desempenho esperado, onde vários ajustes foram realizados para a obtenção consistente e aceitável de polimorfismo dos alelos. Outro problema encontrado foi a falta de assistência técnica no Brasil, onde defeitos tiveram que ser solucionados por profissionais não capacitados.

O gel *Spreadex EL 600 Wide Mini S-2x25*[®], demonstrou ser um bom substituto para outros géis de alta resolução, mas sua aquisição se torna inviável devido à burocracia e ao tempo que demanda para importação.

Contudo a realização deste trabalho foi considerada satisfatória, onde os resultados apontados mostram que a superação dos problemas demanda paciência, persistência e inovação através de idéias novas.

8 Referências Bibliográficas

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**, v. 14, p. 443-453, 2005.

ANDRADE, D.R.; YASUI, G.S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 27, n. 2, p. 166-172, 2003.

AQUABRASIL. Bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil: Disponível em <<http://www.macroprograma1.cnptia.embrapa.br/aquabrasil>>. Acesso em: 06 jan, 2010.

ARANEDA, C.; LAM, N.; DÍAZ, N.F.; CORTEZ, S.; PÉREZ, C.; NEIRA, R.; ITURRA, P. Identification, development, and characterization of three molecular markers associated to spawning date in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). **Aquaculture**, v. 296, p. 21-26, 2009.

ARRANZ, S.E.; SCIARA A. A.; BOTTA P.; CERUTTI P.; TOBIN M.; SOMOZA, G.M. Growth hormone-insuline-like growth factor-I system in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, p. 01-07, 2008.

AUNG, O.; NGUYEN, T.T.T.; POOMPUANG, S.; KAMONRAT W. Microsatellite DNA markers revealed genetic population structure among captive stocks and wild populations of mrigal, *Cirrhinus cirrhosus* in Myanmar. **Aquaculture**, v. 299, p. 37–43, 2010.

BAIGÚN, C.R.M.; COLAUTTI, D.C.; GROSMAN F. Assessment of condition in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) populations: which index works best? **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 439-446, 2009.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species e subspecies identification. **Heretity**, v. 73, p. 117-123, 1994.

BARRERO, N.M.L.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; MANGOLIN, C.A.; BOSO, K.M.O.; 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. **Bioscience Journal**, v. 24, n. 4, p. 86-93, 2008a.

BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES T.S. Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v. 35, n. 1, p. 65-74, 2008b.

BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P. Microsatellite loci isolated from *Odontesthes argentinensis* and the *O. Perugia* species group and their use in other South American silverside fish. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 629–644, 2000.

BEHEREGARAY, L.B.; SUNNUCKS, P. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2849-2866, 2001.

BEMVENUTI, M.A. Osteologia comparada entre as espécies de peixes-rei *Odontesthes* Evermann & Kendall (osteichthyes, Astherinopsidae) do sistema lagunar Patos-Mirim, no extremo sul do Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 2, p. 293-305, 2005.

BEMVENUTI, M.A. Silversides in South Brasil: Morphological and ecological aspects. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 111-118, 2006.

BENTSEN, H.B.; EKNATH, A.E.; VERA, M.S.P.; DANTING, J.C.; BOLIVAR, H.L.; REYES, R.A.; DIONISIO, E.E.; LONGALONG, F.M.; CIRCA, A.V.; TAYAMEN, M.M.; GJERD, B. Genetic improvement of farmed tilapias: growth performance in a complete diallel cross experiment with eight strains of *Oreochromis niloticus*. **Aquaculture**, v. 160, n. 1/2, p. 145-173, 1998.

BERASAIN, G.E.; COLAUTTI, D.C.; LENICOV, M.R.; VELASCO, C.A. Variaciones estacionales e historicas de las especies ícticas de la laguna chascomús. **Biología Acuática**, n. 22, p. 47-58, 2005.

BLANCK, D.V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R.P.; MARQUES, D.S. Polimorfismo no gene GH1-PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia-do-nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 6, p. 599-604, 2009.

BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores Moleculares**. 2.ed. Viçosa: Editora Folha de Viçosa, 2009. 532p.

BRIAN, S.D.H. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.

BRINEGAR, C.; BRUNO D.; KIRKBRID R.; GLAVAS, S.; UDRANSZKY I. Applications of Redwood Genotyping by Using Microsatellite Markers. **USDA Forest Service Gen. Tech. Rep.**, v. 194, p. 47-55, 2007.

BUSO, G.S.C.; CIAMPI, A.Y.C.; MORETZSOHN, M.C.; AMARAL, Z.P.S.; BRONDANI, R.V. Marcadores Microssatélites em espécies vegetais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 46-50, 2003.

CAMARGO, S.G.O.; POUHEY, J.L.F.R. Aquicultura – Um mercado em expansão. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 11, n. 4, p. 393-396, 2005.

CAPÍTULO, A.R.; FREYRE, L.R. Demografía de palaemonetes argentinus nobili (decapoda natantia) en la laguna chascomus, buenos aires, argentina. Supervivencia, migraciones, biomasa y fecundidad. **Lirnnética**, v. 11, n. 1, p. 39-47, 1995.

COLAUTTI, D. C.; LENICOV, M.R.; BERASAIN, G.E. A standard weight equation to assess the body condition of pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 131-135, 2006.

COSTA, L.F.C.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 818–819, 2006.

EDWARDS, A.W.F. A. H. Hardy (1908) and Hardy–Weinberg Equilibrium. **Genetics**, v. 179, p. 1143–1150, 2008.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department, Roma, 2009. 196p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa. 2.ed. Brasília: Embrapa-CENARGEN, 1996. 220p.

FORBES, S.H.; HOGG, J.T, BUCHANAN F.C.; CRAWFORD, A.M.; ALLENDORF, F.W. Microsatellite evolution in congeneric mammals: domestic and bighorn sheep. **Molecular of Biology Evolution**, v. 12, n. 6, p. 1106-1300, 1995.

FRASER, D.J.; LIPPÉ, C.; BERNATCHEZ, L. Consequences of unequal population size, asymmetric gene flow and sex-biased dispersal on population structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). **Molecular Ecology**, v. 13, p. 67–80, 2004.

GOFF, D.J.; GALVIN, K.; KATZ, H.; WESTERFIELD, M.; LANDER, E.S.; TABIN, C.J. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish. **Genomics**, v. 14, p. 200-202, 1992.

GU, Z.X.; GOU, T.J.; XI X.B. Applications of microsatellite markers in studies of genetics and breeding of fish. **Chinese Journal of Agricultural Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 83–87, 2006.

GUILLEMAUD, T.; STREIFF, R.; SANTOS, R.S; AFONSO, P.; MORATO, T.; CANCELA, M.L. Microsatellite characterization in the rainbow wrasse *Coris julis* (Pisces: Labridae). **Molecular Ecology**, v. 9, p. 631–632, 2000.

HAMOY, I.G.; SANTOS, E.J.M.; SANTOS, S.E.B. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 1, p. 29-32, 2008.

HULATA, G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. **Genetica**, v. 111, p. 155-173, 2001.

IBAMA. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 2008. 174p.

JOHN, M.V.; PARWEZ, I.; SIVARAMA, M.V.S.; MEHTA, S.; MARWAHA, N.; ALI, S. Analysis of VNTR loci in fish genomes using synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. **Gene**, v. 172, p. 191-197, 1996.

KARLSSON, S.; MORK, J. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. **ICES Journal of Marine Science**, v. 62, p. 1588-1596, 2005.

KOSHIMIZU, E.; STRÜSSMANN C.A.; OKAMOTO. N.; FUKUDA, H.; SAKAMOTO, T. Construction of a Genetic Map and Development of DNA Markers Linked to the Sex-Determining Locus in the Patagonian Pejerrey (*Odontesthes hatcheri*). **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 3, 2009.

KUBITZA, F.; ONO, E.A.; CAMPOS, J.L. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil: Uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, p. 14-23, 2007.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology of Evolution**, v. 4, n. 3, p. 203-210, 1987.

LIDANI, K.C.F.; LIMA, J.R.; TORRES, R.A.; GABRIEL, J.E.; MADEIRA, H.M.F.; CARNEIRO, P.C.F. Variabilidade genética de um estoque cativo de jundiá (*Rhamdia quelen*). **Revista Acadêmica**, v. 4, n. 3, p. 47-53, 2006.

LIU, F.; XIA, J.H.; BAI, Z.Y.; FU, J.J.; LI, J.L.; YUE, G.H. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis. **Aquaculture**, v. 297, p. 51–56, 2009.

LIU, Y.G.; CHEN, S.L.; LI, J.; LI, B.F. Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) populations revealed by ISSR markers. **Aquaculture**, v. 255, p. 565–572, 2006.

LOPES, T.S.; RIBEIRO, R.P.; BARRERO, N.M.L.; SIROL, R.N.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; VARGAS, L. Caracterização genética de estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizados em programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 9, n. 4, p. 652-661, 2008.

MAGALHÃES, A.L.B.; JACOBI, C.M. Ornamental exotic fish introduced into Atlantic Forest water bodies, Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 3, n. 2, p. 73-77, 2008.

MALDINI, M.; MARZANO, F.N.; FORTES, G.G.; PAPA, R.; GANDOLFI, G. Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. **Aquaculture**, v. 26, p. 487-494, 2006.

MANCINI, M.; RODRIGUEZ, C.; PROSPERI, C.; SALINAS, V.; BUCCO, C. Main diseases of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in central Argentina **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 205-210, 2006.

MEEKER, N.D.; HUTCHINSON, S.A.; HO, L.; TREDE, N.S. Method for isolation of PCR-ready genomic DNA from zebrafish tissues. **BioTechniques**, v. 43, p. 610-614, 2007.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, C.S.; SOUSA, A.B., COELHO, E.G.A.; CREPALDI, D.V.; TEIXEIRA, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; SEERIG, A.; CARVALHO, D.C. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 4, p. 220-224, 2008.

MIRANDA, L.A.; BERASAIN, G.E.; VELASCO, C.A.M.; SHIROJO, Y.; SOMOZA, G.M. Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 157-162, 2006.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V.; SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

NEFF, B.D.; FU, P.; GROSS, M.R. Microsatellite Multiplexing in Fish. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 129, p. 585-593, 2000.

OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA, R.C. O panorama da aquicultura no Brasil: A prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009.

PARPINELLI, R. St.; RIBEIRO, R.P. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science and Technology**, v. 2, n. 1, p. 22-33, 2009.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F. Alimentação de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) com dietas naturais e artificiais. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1203-1206, 2004a.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F.; RUTZ, F. Efeito de metionina e/ou lisina no crescimento e na sobrevivência de alevinas de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 6, p. 1366-1371, 2004b.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F.; RUTZ, F. Efeitos de diferentes níveis de proteína bruta e de energia digestível na dieta sobre o desempenho de alevinos de peixe-rei. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 10, n. 1, p. 97-101, 2004c.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F. Alimentação de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*, Atherinopsidae) nas lagoas Mirim e Mangueira, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Zoologia**, v. 94, n. 2, p. 117-120, 2005.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F.; Moraes P.R.R. Comportamento alimentar e reprodutivo de peixes exóticos e nativos cultivados na zona sul do rio grande do sul. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 12, n. 3, p. 341-344, 2006.

POVH, J.A.; RIBEIRO R.P.; BARRERO N.M.L.; GOMES P.C.; BLANCK D.V.; VARGAS L.; JACOMETO C.B.; LOPES T.S. Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1191-1195, 2009.

RESENDE, E.C.; RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P.; BENITES, C. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. **ADM – Artigo de divulgação na mídia**, v. 130, p. 1-4, 2008.

RIZZO, E.; SATO, Y.; BARRETO, B.P.; GODINHO, H.P. Adhesiveness and surface patterns of eggs in neotropical freshwater teleosts. **Journal of Fish Biology**, v. 61, p. 615–632, 2002.

SANDRE, L.C.G. Melhoramento genético: Atualidades na piscicultura. **Revista Formação e Informação em Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SANCHES, A.; GALETTI JR., P.M. Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilari*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1045–1046, 2006.

SMARTT, J. A possible genetic basis for species replacement: preliminary results of interspecific hybridisation between native crucian carp *Carassius carassius* (L.) and introduced goldfish *Carassius auratus* (L.). **Aquatic Invasions**, v. 2, p. 59-62, 2007.

SOMOZA G. M.; MIRANDA L. A.; BERASAIN G. E.; COLAUTTI D.; LENICOV M. R.; STRÜSSMANN C. A. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 784-793, 2008.

SOUSA, A.B.; CARVALHO, D.C.; MELO, D.C.; SEERIG, A.S.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, E.A.; CREPALD, D.V.; FARIA, P.M.C. A utilização de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p. 100-104, 2006.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 7, p. 6463-6471, 1989.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia molecular de peixes neotropicais. **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 10, n. 2, p. 27-37, 2004.

TSUZUKI, M.Y.; OGAWA, K.; STRÜSSMANN, C.A.; MAITA, M.; TAKASHIMA F.; MELO, C.M.R. The significance of cortisol on acclimation to salinity in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 59, n. 5, p. 1301-1307, 2007.

VIEIRA, V.P.; RIBEIRO, R.P.; VARGAS, L.; MOREIRA, H.L.M.; POVH, J.A.; BARRERO, N.M.L. Avaliação da variabilidade genética de linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com o uso de marcadores de RAPD. **Revista Acadêmica**, v. 3, n. 3, p. 41-49, 2005.

VIEIRA, D.P. Técnicas de PCR: Aplicação e padronização de reações. Disponível em <<http://www.credesh.ufu.br>>. Acesso em: 20 nov, 2009.

VILORIA, N.D.; VELASCO, L.S.; ENRIQUEZ, R.P. Inhibition of DNA amplification in marine fish larvae preserved in formalin. **Journal of Plankton Research**, v. 27, n. 8, p. 787-792, 2005.

XU, Z.; PRIMAVERA, J.H.; DE LA PENA, L.D.; PETTIT, P.; BELAK, J.; WARREN, A.A. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, v. 199, p. 13-40, 2001.

YAZBECK, G.M.; KALAPOTHAKIS E. Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). **Genetics and Molecular Research**, v. 6, n.4, p. 1026-1034, 2007.

YUE, G.H.; ZHU, Z.Y.; LO L.C. A, WANG, C.M.; LIN G.; FENG, F.; PANG, H.Y.; LI, J.; GONG, P.; LIU, H.M.; TAN, J.; CHOU, R.; LIM, H.; ORBAN, L. Genetic variation and population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region. **Aquaculture**, v. 293, p. 22-28, 2009.

WARD, R.D. Biochemical genetic variation in the genus *Littorina* (*Prosobranchia: Mollusca*). **Hydrobiology**, v. 193, p. 53-59, 1990.

WOLF, C.; BURGNER, M.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. PCR-RFLP Analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 33, n. 2, p. 144-150, 2000.

Anexos

Anexo A:

Tabela 8 – Frequências gênicas dos seis *loci* de microssatélites nas duas populações analisadas.

<i>Locus</i>	Alelo (pb)*	Brasil	Argentina
Obo19TUF	215	0.025	0.500
	217	0.275	0.338
	223	-	0.163
	233	0.625	-
	237	0.075	-
Obo21TUF	160	0.077	-
	162	0.192	0.013
	164	-	0.013
	168	0.115	0.050
	170	0.282	0.138
	172	0.103	0.050
	174	0.090	0.087
	176	-	0.025
	178	-	0.188
	182	0.026	0.100
	186	0.051	0.037
	190	-	0.100
	192	0.026	-
	194	0.038	0.125
200	-	0.075	
Obo64TUF	132	-	0.333
	134	-	0.476
	138	-	0.095
	152	-	0.095
Obo71TUF	170	-	0.150
	172	0.264	0.200
	174	0.333	-

	178	0.208	-
	180	0.097	-
	192	-	0.163
	196	0.028	0.175
	200	0.056	0.063
	202	-	0.075
	204	0.014	0.075
	206	-	0.075
	208	-	0.025
Obo77TUF	158	-	0.077
	164	-	0.359
	166	-	0.051
	168	0.217	0.115
	174	0.250	0.038
	178	0.150	0.179
	180	0.100	0.038
	184	-	0.013
	186	0.283	0.128
Obo79TUF	94	0.225	0.211
	96	0.275	0.382
	98	0.313	0.276
	100	0.188	0.132

*pares de base

Anexo B:

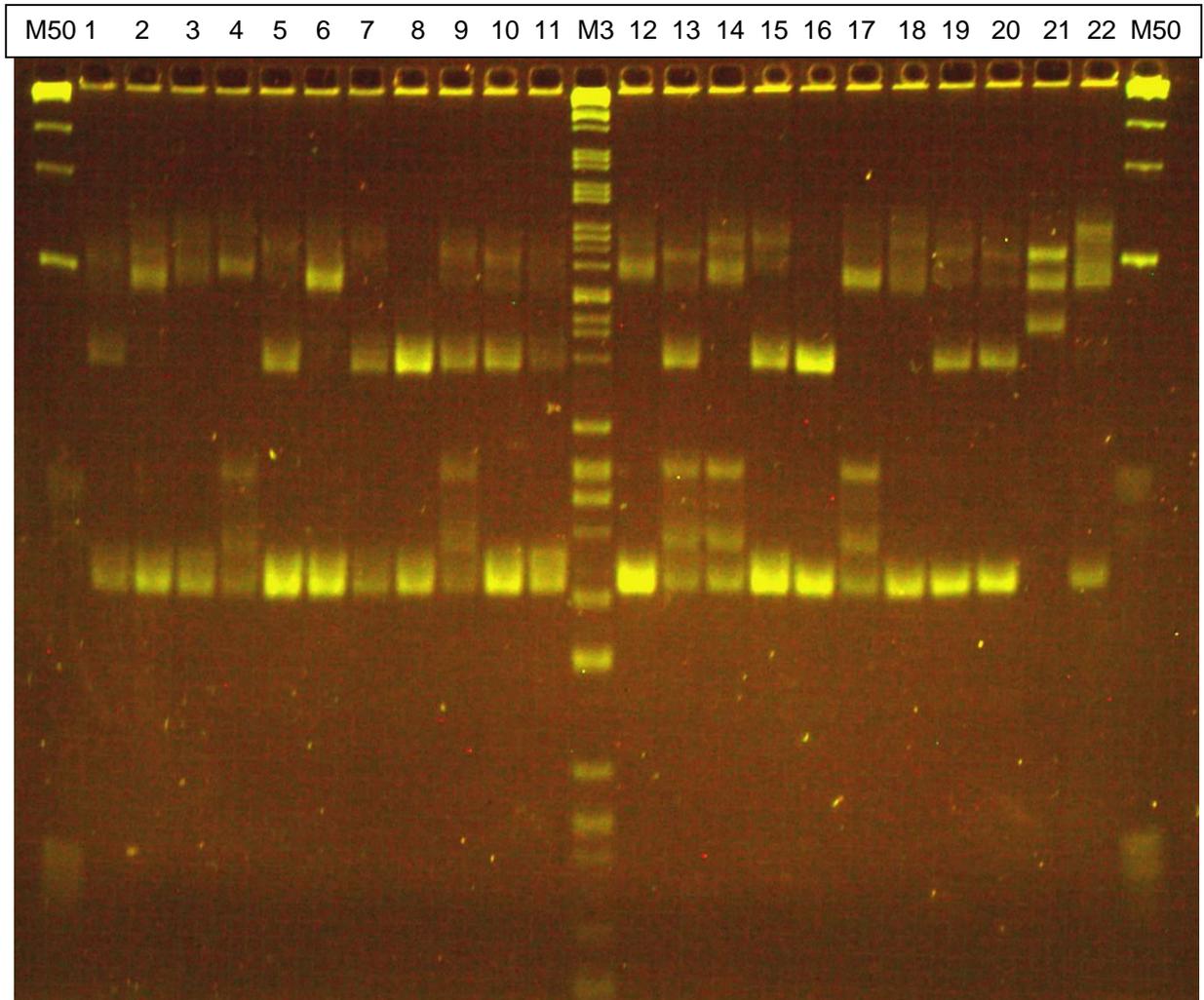


Figura 14 – Gel *Spreadex EL 600 Wide Mini S-2x25*[®]. M50, marcador DNA de 50 pares de base; 1 ao 22, amostras; M3, marcador *Elchorn Scientific*.