

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

UNESP Campus Bauru/ Faculdade de Ciências

Trabalho de Conclusão de Curso

Yasmin Garcia

BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE *Astyanax lacustris*:

AVALIAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL EM CULTIVO

BAURU 2019

Yasmin Garcia

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE *Astyanax lacustris*:
AVALIAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL EM CULTIVO.**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado
à Universidade Estadual Paulista (UNESP),
como parte das exigências para a obtenção do
título de bacharel em Ciência Biológicas.

Orientador: Prof. Assoc. Fabio Porto-Foresti

BAURU 2019

G216b Garcia, Yasmin
Biologia reprodutiva e genética de *Astyanax lacustris*: avaliação da razão sexual em cultivo. / Yasmin Garcia. -- Bauru, 2019
40 p. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências, Bauru
Orientadora: Fabio Porto-Foresti

1. Genética de peixes. 2. Marcadores moleculares. 3. piscicultura.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da U Biblioteca da Faculdade de Ciências, Bauru. Dados fornecido autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

BAURU 2019



Laboratório de
Genética de Peixes
Unesp Bauru



Yasmin Garcia

**BIOLOGIA REPRODUTIVA E GENÉTICA DE *Astyanax lacustris*:
AVALIAÇÃO DA RAZÃO SEXUAL EM CULTIVO.**

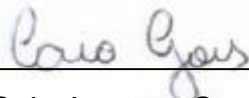
Trabalho de conclusão de Curso
apresentado à Universidade Estadual
Paulista (UNESP), como parte das
exigências para a obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Data de aprovação: Bauru-SP, 02 de dezembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Assoc. Fabio Porto-Foresti
(Universidade Estadual Paulista)



Mestre Caio Augusto Gomes Goes
(Universidade Estadual Paulista)



Dra. Fernanda Dotti do Prado
(Universidade Paulista)

“O Aprendizado é o significado mais límpido da vida, pois já mais se termina uma existência sem que se aprenda algo.”

- Maria Clara Fraga Lopes

“Pode-se encontrar a felicidade mesmo nas horas mais sombrias, se a pessoa se lembrar de acender a luz.”

- Harry Potter

Agradecimentos

Agradeço imensamente aos meus pais, João e Luciane, que me deram todo o suporte emocional e financeiro durante esses quatro anos, sempre ao meu lado, vocês são meu alicerce. Dedico esse trabalho a vocês. Ao meu irmão Eto, que sempre me deu apoio, bem como a todos os meus familiares e amigas de Jaú (Fernanda, Jéssica, Kayra e Maria Isabel).

Agradeço ao João Vitor, que esteve ao meu lado durante toda essa caminhada, me dando suporte e apoio. Independentemente de qualquer coisa, você foi imprescindível, obrigada por tudo.

Às minhas melhores amigas da graduação, Mariana e Beatriz, que me ajudaram em cada prova, cada momento difícil, cada surto e cada momento bom também.

Às minhas amigas de apartamento, Camila e Débora, que foram minha família durante esses anos (e continuarão sendo), aguentando meus desabafos, minhas histórias, meus choros, desmaios (hahaha) e cada momento bom (que foram inúmeros). Obrigada. E ao Gabriel: obrigada parza.

Ao Biopikudos, que esteve presente nos quatro anos de graduação, todo dia, toda festa, todo trabalho, toda prova, todo momento. Obrigada.

A todo mundo do LAGENPE, Fernanda, Tarja, Papiro, Diego, Pedrão, Júlia, Rafa, Milan, Léo, Ana Carolina, Gabriela, Ana Luiza. Em especial ao Caio Felipe, que me ajudou muito quando entrei no laboratório, me ensinando grande parte das práticas que sei hoje, além de colega de profissão você se tornou meu amigo. Ao Caio Goes, pela ajuda nas coletas, no laboratório e pela amizade. A Lilian, por ter se tornado uma amiga incrível no meu crescimento pessoal. Ao Cahique e ao Raul, que me alegravam com as piadas idiotas e me distraíam não importa o momento difícil que eu passava. Ao Zeni por todas as caronas (hahaha) e por ter sido meu veterano fiel, que realmente me auxiliou com conselhos e conhecimento desde quando entrei na graduação. Vocês tornaram meus dias mais leves, engraçados e enriqueceram meu aprendizado, obrigada.

Ao meu orientador, Fabio Porto-Foresti, que me acompanhou nesses dois anos me dando suporte no laboratório e na vida, quando precisei. Obrigada por todo o apoio.

Ao CEPTA e todos seus representantes, que disponibilizaram o Centro e os alunos para me auxiliar nas coletas e reproduções dos peixes.

A CNPq, que me proporcionou a oportunidade de desenvolver essa pesquisa durante a iniciação científica.

RESUMO

Em 2018, o Brasil produziu cerca de 722.560 toneladas de peixes, sendo 74 toneladas correspondentes ao gênero *Astyanax*, o qual apresenta grande importância, devido às suas propriedades como bioindicador da qualidade do ambiente e a sua aplicabilidade em estudos, como os populacionais. Dentre as espécies, *Astyanax lacustris*, popularmente conhecida como lambari do rabo amarelo, ganha destaque pela facilidade de manejo em cativeiro e rápida reprodução. Para estudos genéticos em espécies de peixes, os microssatélites são marcadores moleculares altamente aplicados devido a sua codominância e alto grau de polimorfismo, resultando em eficientes pesquisas como a de paternidade e parentesco. O objetivo do estudo foi entender a biologia reprodutiva da espécie, testando cruzamentos em diferentes proporções sexuais e analisar quantos machos e fêmeas contribuem na reprodução, bem como as condições que influenciam os machos, para assim viabilizar e otimizar a produção de *A. lacustris* na piscicultura. As proporções selecionadas foram de 5:1, 4:2 e 3:3 machos: fêmeas, respectivamente, utilizando o método de reprodução seminatural. Concluiu-se que o número de machos que participam gerando descendentes é variável, pois as condições do espermatozoide como motilidade e concentração influenciam significativamente na capacidade reprodutiva, enquanto o padrão de fêmeas é de apenas uma reproduzindo, independente de quantas são utilizadas. Dessa forma, deve-se utilizar um número maior de machos para aumentar as chances de reprodução, e apenas uma fêmea, que será responsável pela geração de todos os descendentes.

Palavras-chave: piscicultura; reprodução; lambari

ABSTRACT

In 2018, Brazil produced about 722,560 tons of fish, 74 tons corresponding to the genus *Astyanax*, which is of great importance due to its properties as a bioindicator of environmental quality and its applicability in population studies. Among its species, *Astyanax lacustris*, popularly known as yellow-tailed lambari, stands out for its ease of captive management and rapid reproduction. For genetic studies in fish species, microsatellites are highly applied molecular markers due to their codominance and high degree of polymorphism, resulting in efficient research such as paternity and kinship. The aim of this study was to understand the reproductive biology of the species, testing crossing in different sexual proportions and to analyze how many males and how many females contribute to reproduction, as well as the conditions that influence males, thus enabling and optimizing *A. lacustris* production in the species pisciculture. The selected proportions were 5:1, 4:2 and 3:3 males: females, respectively, using the semi-natural reproduction method. It was concluded that the number of males participating in breeding offspring is variable, as sperm conditions such as motility and concentration significantly influence reproductive capacity, while the female pattern is only one reproducing, regardless of how many are used. Thus, a larger number of males should be used to increase the chances of reproduction, and only one female, which will be responsible for the generation of all offspring.

Key-words: pisciculture; reproduction; lambari

SUMÁRIO

1 Introdução.....	1
1.1 Panorama atual da piscicultura	1
1.2 Gênero <i>Astyanax</i>	2
1.3 Marcadores moleculares microssatélites	4
1.4 Análise de parentesco	6
2 Objetivos	8
3 Material e Métodos	9
3.1 Coleta e cruzamentos	9
3.2 Extração de DNA	12
3.3 Amplificação dos loci através do PCR.....	12
3.4 Teste de paternidade e maternidade	15
4 Resultados	16
5 Discussão	19
6 Conclusão	21
7 Referências	23

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 1: Tanques que abrigam os espécimes e coleta com rede de arrasto	10
Figura 2: Aquários com os espécimes alocados e fêmea abaulada apta para a reprodução	11
Figura 3: Representação dos cruzamentos 1, 2 e 3, representando diferentes relações de machos/fêmeas por cruzamento.	11

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 1: <i>Loci</i> microssatélites analisados na espécie	14
Tabela 2: Sequência dos <i>primers</i> utilizados na amplificação.....	14

SUMÁRIO DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Resultado do C1 e condições dos espermatozoides	17
Gráfico 2: Resultado do C2 e condições dos espermatozoides	17
Gráfico 3: Resultado do C3 e condições dos espermatozoides	18

1 INTRODUÇÃO

1.1 Panorama atual da piscicultura

O Brasil é considerado o maior país neotropical, com a mais diversa ictiofauna do mundo. Heterogeneidade e abrangência na distribuição das bacias hidrográficas são características que contribuem com essa biodiversidade (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2003; LANGEANI et al., 2007).

A importância das espécies nativas leva a piscicultura à um crescimento gradativo, gerando uma alta demanda de produção para suprir a comercialização e evitar a possível extinção de espécies por interferência antrópica nos habitats naturais (PORTO-FORESTI et al., 2001).

O cultivo de peixes em cativeiro tem a finalidade de produção para consumo, comércio, ou para fins de pesquisa relacionada à biologia e ecologia. De acordo com a FAO (Food and agriculture organization of the United Nations), o grupo mais produzido em 2018 na aquicultura mundial foram os peixes, com 54,1 milhões de toneladas. Dados publicados no ano anterior pela Associação Brasileira da Piscicultura, PEIXE BR, mostraram que o país produziu cerca de 691.700 toneladas de peixes, resultando em um aumento de 8% em comparação ao cultivo de 2016. Segundo o Anuário publicado em 2019 pela Associação, o estado de São Paulo ocupa o segundo lugar na produtividade de peixes no Brasil. O avanço na produção ano a ano pode ser justificado pelo aumento da preferência por peixes na alimentação, que cresceu mais do que a por carne bovina, segundo a FAO.

Cerca de 74 toneladas de lambaris, pertencentes ao gênero *Astyanax*, são produzidas por ano atualmente (GONÇALVES, 2017). Segundo o Censo Agropecuário do IBGE publicado em 2017, existem mais de 23 mil pisciculturas que produzem lambaris. Praticamente 100% da produção desses indivíduos é destinada ao mercado de isca viva para pesca, seja esportiva ou amadora, uma vez que a atividade que vem crescendo exponencialmente anualmente. (SÃO PAULO, 2015).

Esses dados apontam um imenso potencial zootécnico e uma gama de biodiversidade na piscicultura que abriga essas espécies e diminui o extrativismo. Dessa forma, conhecer e estabelecer adequadamente os parâmetros reprodutivos, como proporção sexual dos espécimes envolvidos por cruzamento pode contribuir no seu manejo e produção.

1.2 Gênero *Astyanax*

As espécies pertencentes ao gênero *Astyanax* (BAIRD & GIRARD, 1854), ordem Characiformes (família Characidae), ocorrem na América do Sul e Central, e formam o que é atualmente chamado de “complexo de espécies” (MOREIRA et al., 2007), das quais 155 já foram descritas. Seu sucesso evolutivo se deve à variabilidade de habitats que esses peixes podem abrigar, variando de regiões montanhosas à ambientes lênticos, lóticos, nascentes e afluentes (BENNEMANN et al., 2005).

As espécies provenientes desse complexo atuam ecologicamente como bioindicadores, devido à resistência a mudanças bruscas, com grande

tolerância a sólidos dissolvidos totais, temperatura e pH da água (MIQUELARENA; MENNI, 2005), além disso, servem de alimento para outros peixes sendo importantes na cadeia trófica aquática. Todavia, a importância econômica (DE SOUZA ANDRADE; DA COSTA ARAÚJO, 2011; JUNHO, 2008) e comercial do gênero também é muito relevante, visto que o lambari é utilizado como isca na pesca esportiva e como fonte de alimento (PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005).

Astyanax lacustris (LÜTKEN, 1875; LUCENA; SOARES, 2016), popularmente conhecida como lambari-do-rabo-amarelo, anteriormente chamada de *Astyanax altiparanae* (GARUTTI; BRITSKI, 2000), é uma das espécies de lambaris mais produzidas e reproduzidas em cativeiro atualmente no Brasil (ORSI; CARVALHO; FORESTI, 2004). A espécie apresenta ciclo de vida curto, atingindo na vida adulta cerca de até 12 centímetros de comprimento (JATOBÁ, 2018; PORTO-FORESTI; CASTILHO-ALMEIDA; FORESTI, 2005). As fêmeas são maiores e possuem corpo arredondado, enquanto os machos são mais alongados e no período reprodutivo apresentam a nadadeira anal áspera ao toque (PORTO-FORESTI et al., 2001). Entretanto, as informações sobre a biologia reprodutiva da espécie, bem como os esforços de manejo e conservação, são limitadas (ESCHMEYER; FRICKE; VAN DER LAAN, 2017; SÚAREZ; SILVA; VIANA, 2017).

O lambari é considerado por alguns autores um peixe “oportunista”, ou seja, adapta-se facilmente ao ambiente e aceita uma variedade vasta de alimentos (PORTO-FORESTI et al., 2001). Sua importância econômica cresce quando é considerado ainda o aumento de vários nichos de mercado, como o de petiscos para consumo humano e o de peixe forrageiro em lojas de

aquariofilia e aquários públicos para enriquecimento ambiental (FAVARO, 2002). A espécie apresenta elevada taxa de sobrevivência obtida para larvas e juvenis, rápido crescimento e chegam a maturidade sexual com quatro meses de idade, o que facilita o manejo de lambaris e faz seu cultivo aumentar significativamente.

A espécie *Astyanax lacustris* é muito utilizado em estudos genéticos populacionais e citogenéticos devido a essas vantagens ecológicas, resultando em dados e pesquisas eficientes. Sua utilização é diversificada, quer para a produção de conservas, de massa proteica para a fabricação de rações ou pelo interesse crescente e como iscas vivas na pesca esportiva (PORTO-FORESTI et al., 2001).

A reprodução dos *A. lacustris* pode ocorrer por método natural, seminatural ou induzida. Na reprodução natural, os indivíduos se reproduzem sem influência antrópica. Na reprodução seminatural ocorre indução hormonal nos peixes, e na induzida, além da indução hormonal, ocorre extrusão do sêmen e fecundação manipulada com os ovócitos da fêmea (SILVA JUNIOR, 2019). Em ambas a solução de hormônio é aplicada duas vezes, na primeira aplicação é feita uma injeção na musculatura dorsal apenas das fêmeas, a segunda aplicação é ocorre após 12 horas, em ambos os sexos (PORTO- FORESTI et al., 2001).

1.3 Marcadores moleculares microssatélites

Borém (2005) define marcador molecular como sendo um seguimento cromossômico que pode ser utilizado para detectar diferenças genéticas entre

dois ou mais indivíduos (GASQUES; BELONI; DE OLIVEIRA, 2013). Os marcadores moleculares, portanto, são utilizados, entre diversas funções, para avaliar a diversidade genética dos organismos com base no nível de polimorfismo que está presente em sua molécula de DNA (HOSHINO et al., 2012) sendo essenciais ainda para o monitoramento genético (POVH et al., 2009) e muito utilizados para identificar populações, naturais ou cultivadas (OLIVEIRA et al., 2005), na análise de *pedigree* e endogamia, na identificação genética do sexo, na análise de distância genética e reconstrução de relações filogenéticas, na identificação de indivíduos híbridos e aplicações para reconstrução de genealogias (BOREM, 2006; FALEIRO, 2007; POVH et al., 2008). Dentre os marcadores moleculares mais utilizados na conservação da diversidade e estrutura genética de populações naturais de peixes estão os microssatélites (GOPALAKRISHNAN et al., 2004).

Os marcadores moleculares microssatélites ou repetições de sequências simples (SSRs) são compostos de um a seis pares de bases repetidos em *tandem* (TAUTZ, 1989) e vem sendo considerados ideais para aplicação em estudos de genética molecular, genética forense, análises de diversidade, análises de parentesco e testes de paternidade, já que utiliza-se apenas uma pequena parte da nadadeira do peixe e esse material pode ser armazenado e utilizado em estudos futuros (SELKOE; TOONEN, 2006). O sucesso dos microssatélites na utilização de análises genéticas se deve alto grau de polimorfismo desse marcador, além da codominância que amplia as possibilidades de estudos genéticos que podem ser realizados a respeito da ecologia da espécie (CHISTIYAKOV; HELLEMANS; VOLCKAERT, 2006).

1.4 Análises de parentesco

A proporção sexual atualmente empregada nos cruzamentos varia de acordo com a espécie e a metodologia da piscicultura. Diversas proporções já foram aplicadas para diferentes espécies do gênero, como de 4:3 machos para fêmeas (REZENDE et al., 2005), 8: 16 (CAVALLI et al., 2018), 5:4 (FIGUEIREDO-ARIKI, 2019), e a mais empregada comumente 10:5 (BRAMBILA-SOUZA et al., 2019). No livro *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*, publicado em 2015, a razão sexual mais efetiva é de 3:1. No entanto, as proporções aplicadas nos estudos mencionados não comprovam hipóteses testadas (SILVA JUNIOR, 2019). Como observado, existem incertezas sobre como aplicar a metodologia reprodutiva e esse é um dado essencial para otimizar a produção dessa espécie.

Silva Junior (2019) afirma que ainda são pouco explorados os estudos sobre as diferentes proporções macho: fêmea no que diz respeito ao desempenho reprodutivo, principalmente em sistema seminatural. A razão sexual é um dado importante, pois com ela pode-se definir uma proporção mais eficaz, capaz de gerar uma maior prole para possível continuação da reprodução endogâmica. Se estudos de paternidade forem realizados nas larvas resultantes de cruzamentos controlados em diferentes proporções de machos para fêmeas, é possível identificar quantos machos e quantas fêmeas realmente contribuem para a reprodução e qual proporção utilizada é de fato adequada para o gênero. Dessa forma, pode-se alterar a proporção de indivíduos, aumentando a produção dos peixes e viabilizando um manejo mais controlado dos indivíduos (GARUTTI, 2003), levando em consideração ainda

as variáveis que interferem na reprodução, como motilidade e concentração de esperma do macho e ecologia dos peixes.

Além do teste de paternidade e maternidade, o estudo da reprodução e do cortejo de lambaris para o cruzamento é muito importante, pois sabe-se que fatores comportamentais de dominância social dentro de uma população, afetam todo o organismo animal e podem comprometer o crescimento, e o sistema imune (CABRAL, 2018; WEDEMEYER, 1969), bem como sua sobrevivência.

2 OBJETIVOS

Frente à importância do gênero *Astyanax* no meio ecológico e econômico e a escassez de estudos direcionados à reprodução e proporção adequada de indivíduos que contribuem de fato para os cruzamentos realizados em cultivo, o objetivo geral desse estudo foi analisar quantos machos e quantas fêmeas são capazes de gerar descendentes em um cruzamento, para assim viabilizar próximos cruzamentos na piscicultura, em destaque a neotropical. Como objetivos específicos buscamos:

- . Analisar outras possíveis influências que os machos podem apresentar no processo reprodutivo, como condições gerais dos espermatozoides liberados.

- . Analisar a participação das fêmeas no processo reprodutivo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta e cruzamentos

Os espécimes de *A. lacustris* foram provenientes do Centro Nacional de Pesquisa e Conservação da Biodiversidade Aquática Continental (CEPTA), ICMBio, Pirassununga, SP, onde foram realizadas as reproduções.

Os indivíduos foram coletados nos tanques do CEPTA (figura 1) utilizando rede de arrasto no dia 04 de fevereiro de 2019 e os cruzamentos foram direcionados até o dia 07 de fevereiro. Cada proporção de peixes por cruzamento foi direcionada em um aquário (figura 2) anteriormente higienizado com correção de pH. Os peixes foram alocados em seus aquários, sempre selecionando as fêmeas mais aptas para a reprodução, analisando se estavam abauladas e próximas da desova (figura 2).

As três proporções para o desenvolvimento teste do estudo foram de 5:1 chamado neste trabalho de cruzamento 1 (figura 3a), 4:2 correspondente ao cruzamento 2 (figura 3b) e 3:3 sendo o cruzamento 3 (figura 3c) de machos/fêmeas por cruzamento, respectivamente.

Posteriormente, ocorreu o processo de reprodução seminatural. Foi realizada a primeira injeção de hormônio hipofisário, na proporção de 4mg de hipófise diluídas em 6ml de soro fisiológico, apenas nas fêmeas. A segunda dose hormonal foi injetada com um intervalo de 6 horas da primeira, dessa vez em todos os parentais, machos e fêmeas e, após mais 6 horas, a maioria das fêmeas estavam prontas para desova, segundo protocolo. Como *Astyanax*

lacustris possui desova parcelada, algumas outras fêmeas desovaram horas depois.

Os ovos foram retirados do aquário para evitar a predação por seus progenitores, já que *Astyanax* são onívoros. As larvas do cruzamento de 5:1 eclodiram um dia após a desova e os restantes foram coletados os ovos, antes da eclosão. Além disso, um fragmento da nadadeira caudal dos parentais (supostos pais e mães) também foi coletado para realização posterior do teste de paternidade e maternidade. Todos os espécimes foram fixados com álcool 100% em microtubos de 1,5ml para conservação do material biológico, etiquetados com o número do cruzamento e sexo do indivíduo (pai e mãe) para diferenciá-los nas análises. O sêmen dos machos foi fixado e analisado ainda no CEPTA, para melhor compreensão das influências reprodutivas.



Figura 1. Tanques que abrigam os espécimes e coleta com rede de arrasto.



Figura 2. Aquários com os espécimes alocados e fêmea abaulada apta para a reprodução.

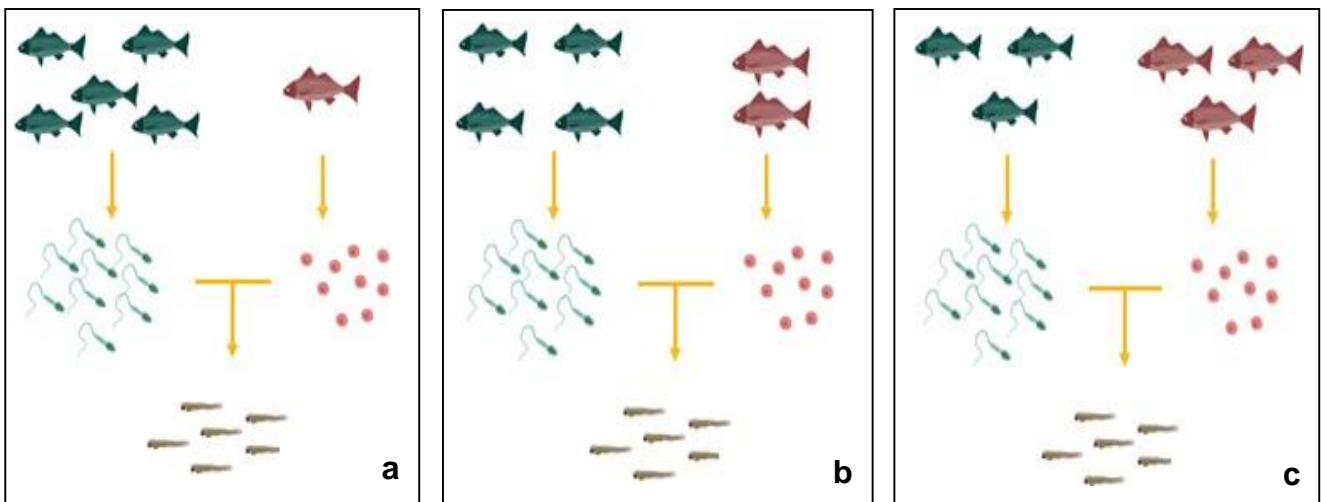


Figura 3. Representação dos cruzamentos 1, 2 e 3, representando diferentes relações de machos/fêmeas por cruzamento.

3.2 Extração de DNA

Após as amostras serem levadas para o Laboratório de Genética de Peixes, UNESP Bauru, foi realizada a extração de DNA do material coletado utilizando o kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, seguindo o protocolo iniciando com 300ul de *nuclei lysis solution* e 4ul de *proteinase K*. O conteúdo foi levado a banho maria à 60°C por 2h, posteriormente, 2,5ul de *RNAse* foram adicionadas e levou-se ao segundo banho a 37°C por 30min. Após, adicionou-se 200ul de *protein precipitation solution* levando ao gelo por 20 minutos e centrifuga por 4 minutos a 13.000 rpm, transferiu-se o sobrenatante para uma segunda série de microtubos contendo 600ul de isopropanol que foi centrifugado novamente. Ao retirar, o sobrenatante foi descartado e adicionou-se 600ul de etanol 70% e foi lavado o material para a última centrifugação.

O DNA foi reidratado 24h depois com 25ul de *DNA rehydration solution*. A integridade e a quantidade de DNA presente nas amostras foram analisadas através da realização de eletroforese em gel de agarose 1% corado com corante fluorescente GelRed™ 1X (Uniscience) e visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (Loccus Biotecnologia). Todo o material obtido foi mantido desde o início no banco de dados do laboratório, pertencente ao Departamento de Ciências Biológicas da universidade.

3.3 Amplificação dos *loci* através do PCR

Para a amplificação dos microssatélites foi empregada a técnica de reação em Cadeia da Polimerase (PCR), através do uso de pares de *primers*

foward (F) e *reverse* (R) (Tabela 2). Através das características de cada *locus*, sistemas de genotipagem foram realizados, levando-se em consideração o tamanho (pb) de cada *locus*. Os *primers foward* (F) foram marcados na posição 5' com um dos seguintes fluorocromos: PET™, FAM™, NED™ e VIC™ (Applied Biosystems) como mostra a tabela 3.

A amplificação dos *loci* microssatélites foi conduzida em duas reações diferentes com apenas um par de *primers foward* (F) e *reverse* (R) separadamente. A reação para os *loci Asty 04, Asty 15, Asty 16 e Asty 23* tiveram volume final de 20 ul com as seguintes concentrações: 1,4X Buffer; 94 uM de dNTPs; 3,12 mM de MgCl₂; 205 mM de cada *primer*; 0,25 U de Taq e 10-30 ng de DNA. A reação para os *loci Asty 12, Asty 26 e Asty 27* tiveram um volume final de 25 ul, com as concentrações: 1X de Buffer; 150 uM de dNTPs; 1,5 mM de MgCl₂; 2 mM de cada *primer*; 0,2 U de Taq e 10-30 ng de DNA.

Para o estudo, foram utilizados sete *loci* microssatélites previamente descritos para gênero na literatura (LOPES ZAGANINI et al., [s.d.]) no primeiro cruzamento e seis *loci* no segundo e no terceiro. Todos os *loci* foram amplificados no termociclador *Veriti 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems), seguindo as condições de desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos que inclui desnaturação a 95° C por 30 segundos, temperatura de anelamento variando de 55 a 60° C por 30 segundos e desnaturação a 72° C por 5 segundos e extensão final a 72° C por 5 minutos.

As amostras amplificadas foram genotipadas utilizando o sequenciador automático *ABI 3730xl DNA Analyzer* (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados no programa *GeneMapper* versão 4.0 (Applied Biosystems).

Tabela 1. *Loci* microssatélites analisados na espécie.

Loci	Tamanho (pb)	TA (° C)	Fluorocromo	SET ABI
Asty 04	200	55	FAM	I
Asty 15	163	55	VIC	I
Asty 16	212	55	PET	I
Asty 23	165	60	NED	I
Asty 12	160	60	PET	II
Asty 26	150	60	FAM	II
Asty 27	200	60	NED	II

Tabela 2. Sequência dos *primers* utilizados na amplificação.

Loci	Sequência de cada primer	Repetição	Tamanho (pb)	Ta (° C)
Asty 04	GGTCACTGGAGGACAGATGTT GGCATGTGCTTGAATGGA	(AC)17	200	56
Asty 12	AGACACAATCAGCCGCGAAAT G ATCCCCTCTCCACAACCCAACA CA	(GT)8	163	58
Asty 15	CAACTTTTACTTAAAACCTGC ATGGGTCTTTACTGCTGAATGTA T	(AC)17 – (CT)6	212	56
Asty 16	AAAGTAAAGGGCATCTGTGGAG AA AGAGGGCATCATTGTACATTTTT G	(AC)10	165	52
Asty 23	TCAATGGAACCTATGGACAAC GTGGGAAGTAGCCTAATAAATA	(CA)12	150	58
Asty 26	CCCATTGATCCTGCCTCTAA CAGTCCTGACACAGAGAT	(GT)8	160	56
Asty 27	GCATTGTTTCAAGTTGGGTCT AAACGTGGTGAGAGGGAGTG	(GT)8	190	58

3.4 Teste de paternidade e maternidade

O software utilizado foi o Colony Version 2.0.6.4 Copyright © Jinliang Wang (ZSL) 2008. A tabela gerada foi utilizada para análise e a confiabilidade do estudo aplicada foi de 95%. Além disso, analisou-se as condições do espermatozoide de cada macho, para compreensão da possível ausência de participação nos cruzamentos correspondentes.

4 RESULTADOS

O primeiro cruzamento resultou na participação de três dos cinco machos para uma fêmea (gráfico 1). No segundo cruzamento, dois machos e uma fêmea geraram descendentes (gráfico 2). Entretanto, no cruzamento 3, houve a reprodução de apenas um macho e uma fêmea (gráfico 3).

No C1, foi atribuída paternidade e maternidade para trinta larvas, sendo quinze descendentes do macho 4, sete larvas descenderam do macho 3 e oito do macho 2. Os machos 1 e 5 não geraram gametas. Todos os machos provenientes desse cruzamento detinham alta motilidade, no entanto, os machos 1 e 5, tinham baixa concentração de espermatozoide no sêmen, com é apontado no gráfico (gráfico 1).

No C2, foi atribuída paternidade para vinte e cinco embriões, sendo vinte e três do macho 3 e dois do macho 4. Os machos 1 e 2, não contribuíram gerando gametas. Apresentaram baixa motilidade dos espermatozoides, mas todos com considerável concentração (gráfico 2).

No C3, por sua vez, apenas um macho e uma fêmea alocados no aquário geraram descendentes. Neste cruzamento, observou-se que as condições espermáticas eram positivas em relação às concentrações, mas apenas o macho 1 detinha alta motilidade (gráfico 3).

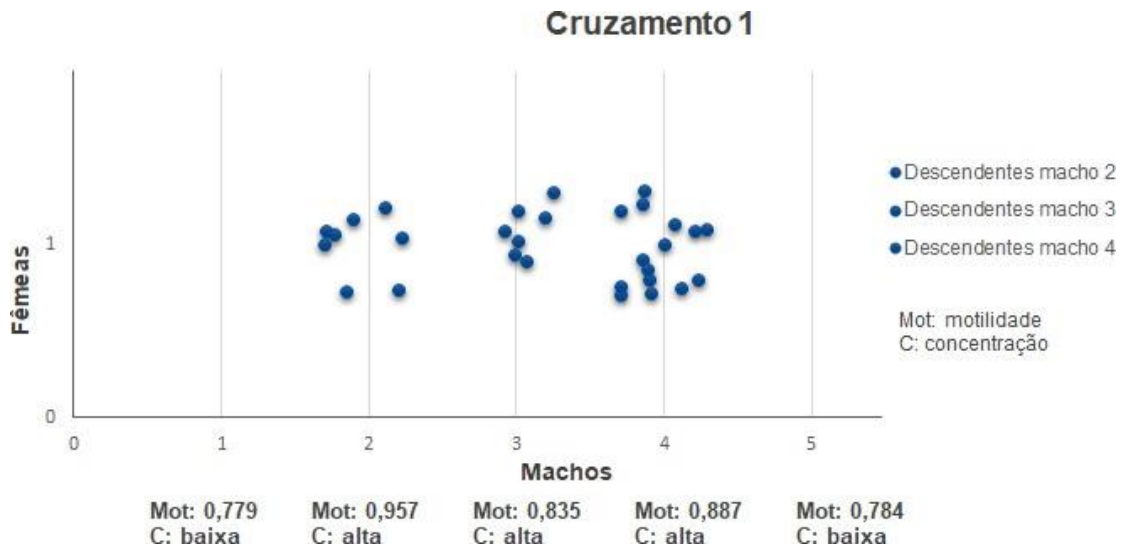


Gráfico 1. Resultado do cruzamento 1, com condições do espermatozoide dos machos.

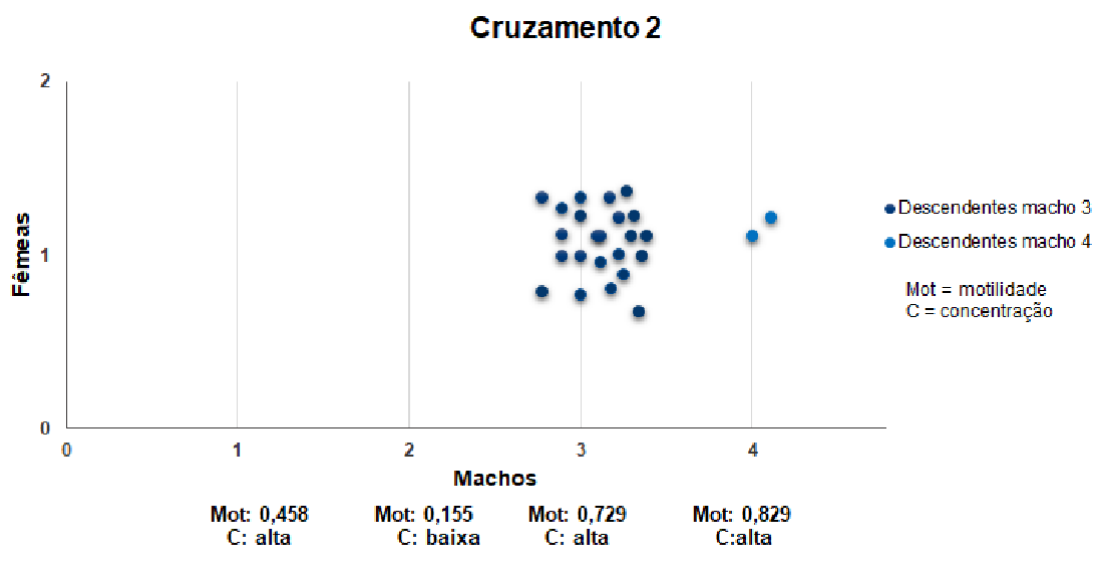


Gráfico 2. Resultado do cruzamento 2, com condições do espermatozoide dos machos.

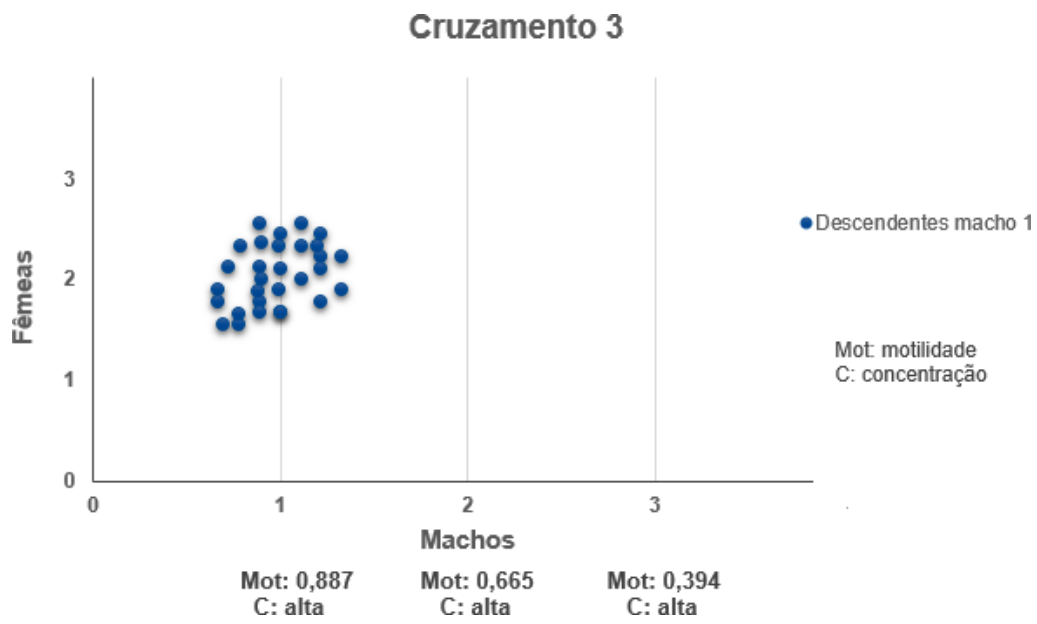


Gráfico 3. Resultado do cruzamento 3, com condições do espermatozoide dos machos.

5 DISCUSSÃO

As análises genéticas resultantes do estudo, permitiram avaliar que as condições espermáticas influenciam no desempenho reprodutivo dos machos, atuando a concentração e a motilidade em conjunto. Portanto, mesmo a concentração sendo alta, se a motilidade dos espermatozoides estiver insatisfatória no sêmen, a reprodução dificilmente ocorrerá, bem como o inverso: a motilidade pode estar adequada, mas se os espermatozoides estiverem em baixas concentrações, a chance de que a reprodução ocorra é diminuta.

Os machos 1 e 5 do cruzamento 1, por exemplo, detinham baixa concentração quando comparado aos demais, portanto, mesmo apresentando motilidade adequada, não conseguiram reproduzir durante o cruzamento. Os machos do cruzamento 2 apresentaram comportamento contrário: apesar de a concentração se mostrar promissora, a motilidade do esperma dos machos 1 e 2 foi baixa, não conseguindo, dessa forma, realizar a fecundação. E, novamente, no cruzamento 3, a motilidade pode ter sido determinante para a reprodução, classificando apenas o macho 1 como apto.

De forma geral, os machos alocados nos aquários comumente apresentam problemas nas condições de seus espermatozóides, esse fator pode ser corrigido realizando uma análise prévia dos indivíduos antes de serem escolhidos para a reprodução. No entanto, esse método pode ser inviável quando se utiliza a reprodução seminatural, visto que ao coletar o peixe e extrair o sêmen, já existe um quadro de estresse do animal que aumenta

quando ele é novamente coletado para a injeção hormonal, podendo levá-lo à morte antes da possível reprodução. Contudo, o método atual (reprodução seminatural) se mostra eficaz por ter menos interferência antrópica quando comparado a reprodução induzida (LOPERA-BARRERO et al., 2010).

Todas as fêmeas utilizadas no estudo foram pesadas antes e depois da reprodução para verificar se desovaram e propor suposições sobre a participação das mesmas. Todas desovaram, no entanto, em todos os cruzamentos prevaleceu apenas uma fêmea reproduzindo em cada. Esse fato pode ser entendido como resultado da desova parcelada que é característica de muitos membros do gênero, bem como da espécie (AGOSTINHO et al, 1984) (SETOGUCHI, 2017) . Dessa forma, as fêmeas ficam aptas para se reproduzir em momentos diferentes do dia mesmo com a injeção hormonal, portanto, quando os machos realizam a fecundação externa na primeira fêmea que desova, não há mais machos e, conseqüentemente, espermatozoides disponíveis para fecundar a segunda fêmea posteriormente. Assim, quando as próximas fêmeas desovam, provavelmente não há mais machos aptos para reproduzir.

Contudo, há mais uma variável que pode influenciar a aplicabilidade da proporção sexual: a razão sexual operacional, conhecida como RSO. Trata-se da razão de machos sexualmente ativos para de a de fêmeas fertilizáveis. Esse dado é considerado determinante na intensidade da seleção sexual (EMLEN; ORING, 1977; SILVA JUNIOR, 2019).

6 CONCLUSÃO

Apesar de alguns autores com trabalhos recentemente publicados, como Rezende et al., Figueiredo-Ariki et al. e Brambila-Souza et al., utilizarem proporções variadas de “lambaris do rabo amarelo” na reprodução, nota-se neste estudo que existem mais variáveis que influenciam além da autonomia reprodutiva dos peixes, tais como temperatura da água, ápice reprodutivo, salinidade, pH, oxigenação (SETOGUCHI, 2017) e disponibilidade de alimento (NIKOLSKY, 1961).

Portanto, observa-se em *A. lacustris* paternidade múltipla, mas maternidade única, já que apenas uma fêmea gera descendentes, mesmo todas estando aptas para a reprodução. Dessa forma, concluiu-se que o número de machos envolvidos nos processos reprodutivos na piscicultura é variável, já que a análise da qualidade espermática é realizada depois do cruzamento e as condições espermáticas exercem grande influência na reprodução. Entretanto, o número de machos não pode ser alto, pois aumenta o nível de competição pela fêmea, conseqüentemente de estresse e morte desses peixes (JIROTKUL, 1999; RUHL; MCROBERT; CURRIE, 2009; SILVA JUNIOR, 2019), isso leva ainda a uma diminuição no sucesso da fertilização (CLARK; GRANT, 2010; SILVA JUNIOR, 2019; SPENCE; SMITH, 2005).

Para as fêmeas, no entanto, é recomendável utilizar apenas uma por aquário, já que a primeira que desovar, será a parental que liberará os gametas primeiro, reproduzindo com os machos que liberam espermatozóides no sêmen. Essas conclusões corroboram em maior conformidade com a

proporção sexual recomendada pelos autores do livro Espécies nativas para piscicultura no Brasil, que sugere 3 : 1, devido ao número de fêmea, ou de Silva Junior, que recomenda 1:1.

Assim sendo, os experimentos deste trabalho se mostraram com grande potencial como base para desenvolvimentos práticos na reprodução em cultivo, podendo ser adaptado conforme a variação das características das espécies, mas havendo a possibilidade de ser viável também para outras espécies do mesmo gênero. Conhecer a biologia reprodutiva da espécie é importante não apenas para o conhecimento científico, mas para a produção aquícola e para a conservação das espécies (SILVA JUNIOR, 2019). Novos estudos devem ser realizados para comprovar a participação de fêmea única no cultivo, e os outros parâmetros presentes no espermatozoide dos machos, que podem influenciar no processo reprodutivo, para viabilizar e otimizar a produção de *A. lacustris* em cultivo.

7 REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, C. A. et al. Ciclo reprodutivo e primeira maturação sexual de fêmeas de lambari, *Astyanax bimaculatus* (Osteichthyes - Characidae) do rio Ivaí, Estado do Paraná. **Revista Brasileira de Biologia**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 31-36. 1984.

ANUÁRIO PEIXE BR DA PISCICULTURA 2018. **Associação Brasileira da Piscicultura**, 2019.

BENNEMANN, S. T. et al. Ocorrência e ecologia trófica de quatro espécies de *Astyanax* (Characidae) em diferentes rios da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. **Iheringia. Série Zoologia**, v. 95, n. 3, p. 247–254. 2005.

BOREM, A. **Marcadores moleculares**. UFV. 2006.

BRAMBILA-SOUZA, G. et al. Thermal manipulation and GnRHa therapy applied to the reproduction of lambari-do-rabo-amarelo, *Astyanax altiparanae* females (Characiformes: Characidae) during the non-breeding season. **General and Comparative Endocrinology**, v. 279, p. 120–128. 2019.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil. 2003.

CABRAL, E. M. DA S. Efeito do contato macho-fêmea no desenvolvimento testicular e mortalidade de *Astyanax altiparanae* (Characiformes, Characidae). 2018.

CAVALLI, D. et al. Update on the ichthyofauna of the piquiri river basin, paraná,

- Brazil: A conservation priority area. **Biota Neotropica**, v. 18, n. 2. 2018.
- CHISTIYAKOV, D. A.; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. **Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics** *Aquaculture*. 2006.
- CLARK, L.; GRANT, J. W. A. Intrasexual competition and courtship in female and male Japanese medaka, *Oryzias latipes*: Effects of operational sex ratio and density. **Animal Behaviour**, v. 80, n. 4, p. 707–712. 2010.
- DE SOUZA ANDRADE, E.; DA COSTA ARAÚJO, J. Medidas mitigadoras dos impactos ambientais causados por usinas hidrelétricas sobre peixes. **REDVET. Revista electrónica de Veterinaria**, v. 12, n. 3, p. 1–30. 2011.
- EMLEN, S. T.; ORING, L. W. Ecology, sexual selection, and the evolution of mating systems. **Science**, v. 197, n. 4300, p. 215–223. 1977.
- ESCHMEYER, W. N.; FRICKE, R.; VAN DER LAAN, R. Catalog of fishes: genera, species, references. 2017.
- FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrados Planaltina. 2007.
- FAO – Food and agriculture organization the United Nations. SOFIA, 2018.
- FÁVARO, T. 2002 .Lambari ganha mercado, na pesca e na mesa: de isca viva a petisco, peixe deixa de ser praga em tanques para se tornar fonte de renda. São Paulo: Suplemento Agrícola do Estadão. 2002
- FIGUEIREDO-ARIKI, D. G. Protocolos de indução hormonal com extrato bruto

de hipófises de carpa e o perfil da prostaglandina F2 α durante a maturação final e ovulação em *Astyanax altiparanae*. 2019.

GARUTTI, V. **Piscicultura ecológica**. Unesp. 2003.

GARUTTI, V.; BRITSKI, H. A. Descrição de uma espécie nova de *Astyanax* (Teleostei: Characidae) da bacia do alto rio Paraná e considerações sobre as demais espécies do gênero na bacia. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Série Zoologia**, v. 13, p. 65–88. 2000.

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

GONÇALVES, F. H. A. DOS S. Sustentabilidade dos sistemas de produção do lambari-do-rabo-amarelo. 2017.

GOPALAKRISHNAN, A. et al. Microsatellite DNA markers to assess population structure of red tailed barb *Gonoproktopterus curmuca*. 2004.

HOSHINO, A. A. et al. Microsatellites as tools for genetic diversity analysis. In: **Genetic diversity in microorganisms**. IntechOpen. 2012.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Pesquisa Industrial de Inovação Tecnológica 2000**. 2016.

JATOBÁ, A. Viabilidade de diferentes taxas de alimentação para o cultivo de *Astyanax bimaculatus*. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v. 17, n. 3, p. 450–453. 2018.

- JIROTKUL, M. Population density influences male-male competition in guppies. **Animal Behaviour**, v. 58, n. 6, p. 1169–1175. 1999.
- JUNHO, R. A. C. **Migrações ascendentes de peixes neotropicais e hidrelétricas: proteção a jusante de turbinas e vertedouros e sistemas de transposição.** Universidade de São Paulo. 2008.
- LANGANI, F. et al. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 3, p. 181–197. 2007.
- LOPERA-BARRERO, N. M. et al. Caracterização genética de *Brycon orbignyanus* utilizando o sistema seminatural. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 2010.
- LOPES ZAGANINI, R. et al. **Variabilidade genética de duas populações de *Astyanax altiparanae* da bacia do alto rio Paraná.** 2012.
- MIQUELARENA, A. M.; MENNI, R. C. *Astyanax tumbayaensis*, a new species from northwestern Argentina highlands (Characiformes: Characidae) with a key to the Argentinean species of the genus and comments on their distribution. **Revue suisse de Zoologie**, v. 112. 2005.
- MOREIRA, A. A. et al. Genetic variability of two Nile tilapia strains by microsatellites markers. **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v. 42, n. 4, p. 521–526. 2007.
- NIKOLSKY, G. V. **The ecology of fishes.** Academic Press. 1961.
- OLIVEIRA, C. et al. Análise genética de populações selvagens de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e lambari (*Astyanax altiparanae*) do rio

Parapanema, utilizando marcadores de RAPD, v. 25. 2005.

ORSI, M. L.; CARVALHO, E. D.; FORESTI, F. Biologia populacional de *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski (Teleostei, Characidae) do médio Rio Parapanema, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 21, n. 2, p. 207–218. 2004.

PORTO-FORESTI, F. et al. Cultivo do Lambari: Uma espécie de pequeno porte e grandes possibilidades. **Panorama da Aquicultura**, v. 11, n. 67, p. 15–19. 2001.

PORTO-FORESTI, F.; CASTILHO-ALMEIDA, R. B.; FORESTI, F. Biologia e criação do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**, v. 2, p. 101–116. 2005.

POVH, J. A. et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e investigación agraria**, v. 35, n. 1. 2008.

POVH, J. A. et al. Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Parapanema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 5, p. 1191–1195. 2009.

REZENDE, C. F. et al. **A disponibilidade de recursos alimentares influencia a reprodução de peixes em florestas de igapó**. 2005.

RUHL, N.; MCROBERT, S. P.; CURRIE, W. J. S. Shoaling preferences and the effects of sex ratio on spawning and aggression in small laboratory

- populations of zebrafish (*Danio rerio*). **Lab animal**, v. 38, n. 8, p. 264. 2009.
- SELKOE, K. A.; TOONEN, R. J. **Microsatellites for ecologists: A practical guide to using and evaluating microsatellite markers**. Ecology Letters. 2006.
- SETOGUCHI, P. M. Sistema de reprodução do lambari-do-rabo-amarelo (*Astyanax altiparanae*) em hapas no Vale do Ribeira, SP. 2017.
- SILVA JUNIOR, A. DA. Efeito da proporção sexual e da densidade de estocagem sobre o desempenho reprodutivo do lambari *Astyanax altiparanae* (Characiformes: characidae) em sistema semi-natural. 2019.
- SPENCE, R.; SMITH, C. Male territoriality mediates density and sex ratio effects on oviposition in the zebrafish, *Danio rerio*. **Animal Behaviour**, v. 69, n. 6, p. 1317–1323. 2005.
- SÚAREZ, Y. R.; SILVA, E. A.; VIANA, L. F. Reproductive biology of *Astyanax lacustris* (Characiformes: Characidae) in the southern Pantanal floodplain, upper Paraguay River basin, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 100, n. 7, p. 775–783. 2017.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463–6471. 1989.
- WEDEMEYER, G. Stress-induced ascorbic acid depletion and cortisol production in two salmonid fishes. **Comparative Biochemistry And Physiology**, v. 29, n. 3, p. 1247–1251. 1969.

