

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” –

UNESP

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS- IBB

Milena Vieira de Freitas

**Análise do DNA mitocondrial como subsídio para o pré-
melhoramento genético do pacu *Piaractus mesopotamicus***

Botucatu, São Paulo

2017

Milena Vieira de Freitas

**Análise do DNA mitocondrial como subsídio para o pré-
melhoramento genético do pacu *Piaractus mesopotamicus***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (A.C. Zoologia), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Botucatu, São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Freitas, Milena Vieira de.

Análise do DNA mitocondrial como subsídio para
pré-melhoramento genético do pacu *Piaractus mesopotamicus*
/ Milena Vieira de Freitas. - Botucatu, 2017

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Diogo Teruo Hashimoto

Capes: 20406002

1. Pacu (Peixe). 2. Análise de DNA. 3. Aquicultura.
4. Melhoramento genético.

Palavras-chave: Aquicultura; Conservação; Região
controladora; Variabilidade genética.

Milena Vieira de Freitas

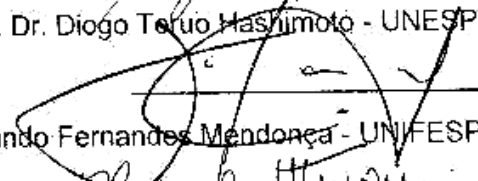
Análise do DNA mitocondrial como subsídio para o pré-
melhoramento genético do pacu *Piaractus mesopotamicus*

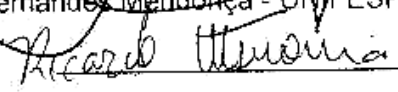
Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (A.C. Zoologia), Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho", Campus de Botucatu, como parte dos requisitos para obtenção do título
de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto

Comissão Examinadora:


Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto - UNESP


Prof. Dr. Fernando Fernandes Mendonça - UNIFESP


Prof. Dr. Ricardo Utsunomia - UNESP

Botucatu, 21 de Julho de 2017.

Aos meus pais, Tereza F. Vieira e Luiz Paulo de Freitas.

A minha irmã Fabiana V. de Freitas

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter ajudado a trilhar todo o meu caminho e por ter sido a minha âncora nos momentos mais difíceis.

A minha mãe Tereza, que sempre esteve ao meu lado, me apoiando me encorajando e sempre sendo positiva, agrago a Deus por ter colocado uma mãe tão maravilhosa em meu caminho.

A minha irmã e todos os meus familiares que sempre ajudaram com incentivos e orações, muito obrigada!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Diogo Teruo Hashimoto pelo mestrado, por ter confiado em mim, e por todo o apoio durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao grupo de pesquisa da Dr. Silvia Arranz (Vanina, Felipe e Juan), pela contribuição no trabalho e por toda a ajuda quando estive na Argentina.

Ao professor Fábio Porto Foresti por ter me aceitado em seu laboratório como aluna de iniciação. E a Rosangela por ter se dedicado a ensinar tudo o que eu sei hoje.

A todos os meus colegas do LaGeAC (Natália, Raquel, Ricardo, Valéria e Vito) muito obrigada por todos os momentos de descontração, pela companhia nos experimentos, e por terem feito parte deste momento da minha vida.

As minhas eternas amigas de faculdade Júlia e Giovana, que mesmo estando longe me ajudaram muito com conselhos, risadas e acima de tudo com a amizade!! Adoro vocês!!

Aos meus amigos, Xina, Thiago, Raquel, Mari, Laiza e Bruna muito obrigada pela companhia nestes anos, pelas festas, churrascos, açaís, e outras gordices deliciosas!!

Muito obrigada a todos !!!!

Nossas dúvidas são traidoras e nos fazem perder o que, com frequência, poderíamos ganhar, por simples medo de arriscar.

William Shakespeare

APOIO FINANCEIRO

A FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pelo auxílio da bolsa concebida (Proc. FAPESP 2015/14185-8).

RESUMO

FREITAS, M.V. **Análise do DNA mitocondrial como subsídio para o pré-melhoramento genético do pacu *Piaractus mesopotamicus***. 2017. Dissertação de mestrado – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

A aquicultura brasileira tem passado por um crescimento significativo nos últimos anos. Entretanto, o potencial de produção do país certamente será mais bem aproveitado com a utilização de produtos resultantes de melhoramento genético. O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes, Serrasalminidae), é um peixe de ocorrência na bacia do rio Paraná-Paraguai e uma das principais espécies nativas utilizadas para a produção em aquicultura. A utilização de marcadores moleculares na piscicultura tem se mostrado fundamental, pois podem auxiliar no monitoramento genético das populações e em programas de pré-melhoramento. O objetivo deste trabalho foi realizar a análise da variabilidade genética de lotes selvagens e cultivados de *Piaractus mesopotamicus*, utilizando marcador molecular mitocondrial (Região Controladora - CR). De forma geral, os índices de diversidade se apresentaram com valores moderados ($H_{d_{sel}} = 0,692$ e $H_{d_{pisc}} = 0,711$; $\pi_{sel} = 0,0045845$ e $\pi_{pisc} = 0,00660$) e foi observada similaridade entre esses valores nas populações selvagens e cultivadas. Além disso, foi observada alta estruturação genética entre as populações selvagens e cultivadas ($F_{ST} = 0,14404$). Os baixos valores de diversidade encontrados em algumas das populações selvagens juntamente com os desvios de equilíbrio (D Tajima $p < 0,05$) podem estar relacionados a diversos fatores antrópicos que vêm influenciando as populações de pacu ao longo dos anos, tais como pressões de pesca e barramentos para geração de energia elétrica. Em relação aos lotes cultivados, alguns estoques apresentaram índices inferiores de variabilidade, que podem estar associados às diferentes técnicas de manejo nas pisciculturas, muitas vezes utilizando poucos indivíduos e endogâmicos para a formação dos plantéis. Os resultados obtidos neste trabalho aumentam as informações acerca das populações de pacu, sendo fundamentais para o desenvolvimento de futuros programas de melhoramento genético para esta espécie.

Palavras-chave: Região Controladora, Variabilidade genética, Aquicultura, Conservação

ABSTRACT

FREITAS, M.V. **Analysis of the mitochondrial DNA as subsidy for genetic pre-breeding of pacu *Piaractus mesopotamicus***. 2017. Master's dissertation - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

The Brazilian aquaculture has experienced significant growth in recent years. However, the national potential of production will certainly be better explored with the use of products resulting from breeding programs. The pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes, Serrasalminidae), is a fish of occurrence in the Paraná-Paraguay River Basin and it is one of the main native species used for production in aquaculture. The use of molecular markers in fish farming has been shown to be essential, especially for genetic monitoring of populations and pre-breeding programs. The mitochondrial molecular markers (mtDNA) have a higher rate of mutations and exclusively maternal inheritance, being useful for monitoring the genetic variability of a population and generate information about the founder stock. The objective of this study was to analyze the genetic variability of wild and cultivated stocks of *Piaractus mesopotamicus* using mitochondrial molecular marker (Control Region). In general, the diversity indexes presented moderate values ($Hd_{wild} = 0.692$ and $Hd_{farm} = 0.711$; $\pi_{wild} = 0.0045845$ and $\pi_{farm} = 0.00660$) and similarity was observed between these values in the wild and cultivated populations. In addition, high genetic structuring was observed among wild and cultivated populations ($F_{ST} = 0.14404$). The low values of diversity found in some of the wild populations together with the equilibrium deviations ($D_{Tajima} p < 0.05$) may be related to several anthropic factors that have been influencing pacu populations over the years, such as fishing pressures and hydroelectric power dams. In relation to cultivated stocks, the lower indices of variability may be associated with different management techniques in fish farms, often using few and inbreeding individuals for the formation of the broodstock. The results obtained in this work increase the information about the populations of pacu and they are fundamental for the development of future breeding programs for this species.

Key Word: Control Region, genetic variability, aquaculture, conservation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1 - Análise da diversidade e estruturação genética em populações selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando o DNA mitocondrial

Figura 1 – Áreas das populações de *Piaractus mesopotamicus*29

Figura 2 – Rede de haplótipos das populações selvagens de *P. mesopotamicus*.....33

Figura 3 – Árvore *Neighbor Joining* ao longo dos haplótipos de *Piaractus mesopotamicus*.....34

Capítulo 2 – Análise da diversidade genética em estoques cultivados de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando a região controle do DNA mitocondrial

Figura 1 – Rede de haplótipos das populações cultivadas de *P. mesopotamicus*.....57

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 - Análise da diversidade e estruturação genética em populações selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando o DNA mitocondrial

Tabela 1 – Amostragem e parâmetros de diversidade dos indivíduos selvagens de *Piaractus mesopotamicus* 31

Tabela 2 – Matriz de F_{ST} par-a-par32

Capítulo 2 – Análise da diversidade genética em estoques cultivados de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando a região controle do DNA mitocondrial

Tabela 1 – Número amostral dos indivíduos cultivados de *P. mesopotamicus*.....51

Tabela 2 – Distribuição haplotípica ao longo dos indivíduos cultivados.....54

Tabela 3 – Índices de diversidade genética.....55

Tabela 4 – Análise de variância molecular (AMOVA)56

Tabela 5 – Matriz de F_{ST} entre os estoques cultivados.....56

Tabela 6 – Tabela de F_{ST} entre estoques cultivados e localidades selvagens57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
1.1	Aquicultura e produção do pacu <i>Piaractus mesopotamicus</i>	11
1.2	Caracterização da espécie <i>Piaractus mesopotamicus</i>	12
1.3	Marcadores moleculares	14
1.3.1	Marcadores mitocondriais	14
1.4	Referências.....	17
2	OBJETIVOS.....	22
2.1	Objetivo Geral.....	22
2.2	Objetivos Específicos	22
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
3.1	Capítulo 1.....	24
3.1.1	INTRODUCTION	26
3.1.2	MATERIAL AND METHODS.....	28
3.1.3	RESULTS	31
3.1.4	DISCUSSION.....	35
3.1.5	REFERENCES	38
3.2	Capítulo 2.....	46
3.2.1	INTRODUÇÃO.....	48
3.2.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	50
3.2.3	RESULTADOS	52
3.2.4	DISCUSSÃO	58
3.2.5	REFERÊNCIAS	61
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	66

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aquicultura e produção do pacu *Piaractus mesopotamicus*

Durante as últimas cinco décadas, a oferta mundial de pescado para o consumo humano teve um aumento de 3,2% (FAO, 2016). No Brasil, a média de consumo em 2013 foi em torno de 14,4 kg/ha/ano, o que já atende a recomendação da *Food and Agriculture Organization* (FAO). O aumento do consumo de pescado pode estar relacionado ao aumento da produção, redução de desperdício, melhor utilização, melhor distribuição do comércio internacional, aumento da renda e urbanização (FAO, 2016).

Em 2015, o país teve a estimativa de produção de pescado de 483.241 kg, aumento de 1,88% em relação ao ano de 2014 (IBGE, 2016). Atualmente, o Brasil conta com mais de um milhão de pescadores. Entretanto, é na aquicultura que tem mostrado sua alta capacidade e potencialidade. Segundo a FAO, a produção do Brasil poderá atingir 20 milhões kg em 2030, o que faz do país um dos maiores produtores do mundo. A fim de consolidar o Brasil como um potencial produtor de pescado, uma série de políticas públicas e investimentos foi adotada pelo extinto Ministério da Pesca e Aquicultura, como o Plano Safra da Pesca e Aquicultura, com investimento de aproximadamente 4 bilhões no setor (MPA, 2014).

No Brasil, cada região possui a sua tendência produtiva de mercado. Por exemplo, a região Norte tem como foco o tambaqui *Colossoma macropomum* e pirarucu *Arapaima gigas*; a região Nordeste, a tilápia *Oreochromis* ssp. e o camarão marinho *Litopenaeus vannamei*; o Sudeste, a tilápia e pacu *Piaractus mesopotamicus*; o Sul, carpas *Cyprinus* ssp., tilápias e mexilhões; e, por fim, a região Centro Oeste, o tambaqui, pacu e pintado *Pseudoplatystoma* ssp. (MPA, 2015). Dentre as espécies mais cultivadas, destaca-se a tilápia e o tambaqui, que somam 73.5% da produção do país.

Porém, o cultivo de outras espécies merece destaque na produção, como é o caso do tambacu, das carpas e do pacu, que juntos representam 18.5% do total produzido.

O pacu, juntamente com o seu híbrido com a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) (patinga), ocupam a sexta posição no *ranking* de produção brasileira e tiveram uma produção de 13. 276 kg em 2015 (IBG 2016). O pacu é a segunda espécie nativa mais representativa nas unidades produtivas, com 2.212 ocorrências. Na região Sul, a sua produção representou 92% do total de peixes redondos (tambaqui, pacu, pirapitinga e híbridos) (MPA, 2008). O destaque desta espécie não se limita no cenário nacional, pois em outros países da América Latina (Argentina) e Ásia (China, Mianmar, Tailândia e Vietnã) também possuem uma parcela significativa na produção desta espécie (Flores Nava, 2007; Honglang, 2007; FAO 2010). Na Argentina o pacu é a principal espécie produzida, correspondendo a 50% da produção total do país, onde o cultivo ocorre principalmente em regiões de clima subtropical, que inclui as províncias de *Misiones, Chaco, Formosa, Corrientes, Santa Fe, Entre Ríos* e *Tucumán* (Schenone *et al.*, 2011; Panné Huidobro, 2015; Valladão *et al.*, 2016)

Os principais incentivos para a produção desta espécie estão relacionados ao seu valor comercial e também a sobrepesca dos estoques naturais. O pacu foi considerado como uma espécie criticamente em perigo no Estado SP do Brasil (Decreto Estadual – Nº 56.031). Na Argentina, a pesca do pacu está proibida no rio Paraná e nas províncias de Santa Fe e *Entre Ríos* devido ao declínio da pesca. Logo, o cultivo desta espécie pela piscicultura tem sido uma alternativa para suprir a demanda do mercado e reduzir o impacto nas populações naturais devido ao alto nível de exploração pela pesca.

1.2 Caracterização da espécie *Piaractus mesopotamicus*

A espécie *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecida como pacu, pacu-caranha, pacu-guaçu (Britski *et al.*, 2007), é um serrasalmídeo de importância comercial (Severi *et al.*, 1999) que está distribuído nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975), principalmente nas planícies do Pantanal (Petrere, 1989). É um peixe de ambientes lóticos e semi-lóticos (Agostinho *et al.*, 2004), que alcança a sua maturidade sexual em cerca de três anos e que necessita percorrer grandes distâncias migratórias para a reprodução, com a sua desova ocorrendo geralmente no mês de novembro (Ferraz de Lima *et al.*, 1984). Apresenta corpo ovulado e robusto, com a região dorsal cinza escura e a ventral amarelada (Britski *et al.*, 2007).

O pacu pode alcançar 7 kg e atingir entre 60 a 80 cm de comprimento (Vazzoler *et al.*, 1997; Britski *et al.*, 2007). Esta espécie ocupa uma posição de destaque na pesca comercial e esportiva (Catella *et al.*, 2001; Resende, 2003). Entretanto, seus estoques naturais vêm diminuindo devido principalmente a sobrepesca e as destruições no habitat (Resende 2003). Devido ao seu manejo facilitado e fácil adaptabilidade a alimentação artificial (Carneiro *et al.*, 1995), o pacu é extensivamente utilizado em programas de aquicultura, sendo uma das espécies mais cultivadas no Brasil (IBGE, 2016).

O pacu é considerado um dos peixes nativos mais estudados da aquicultura brasileira, principalmente sob aspectos de reprodução, larvicultura, engorda, nutrição e parasitologia (Urbinati *et al.*, 2005). Entretanto, com relação ao melhoramento e genética, há poucos dados disponíveis e limitados a aspectos de hibridação interespecífica. Desta forma, a aplicação de ferramentas genéticas para o pacu poderá acelerar e maximizar a produção sustentável deste pescado, principalmente se estas tecnologias forem desenvolvidas e direcionadas para aplicação rotineira em programas de manejo, conservação e melhoramento genético.

1.3 Marcadores moleculares

A utilização de caracteres morfológicos associados com o uso de marcadores moleculares tem uma aplicabilidade eficiente na genética de peixes. Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na caracterização da biodiversidade e no estudo de estruturação genética da ictiofauna. Além disso, análises relacionadas a diversidade genética em populações de cultivo também tem sido realizadas com o uso de marcadores (Portela & Huerta, 2007). Dentre os marcadores moleculares, as sequências de DNA mitocondrial são destaques e se mostram uma poderosa metodologia para estudos de variação genética inter e intra-espécies (Avisé, 2004).

O uso dos marcadores moleculares, tanto mitocondrial como nuclear, começou na caracterização de bancos genéticos de peixes na década de 80 (Avisé, 1994; Avisé & Hamrick, 1996; Smith & Wayne, 1996; Calcagnotto, 1998). As principais vantagens deste método estão relacionadas ao menor número de indivíduos necessários para a realização das análises, maior poder de resolução e obtenção de amostras por meio de técnicas não invasivas, tais como sangue, escamas e pedaços de nadadeiras, além da obtenção de informações genéticas de materiais preservados em álcool há muitos anos (Avisé 1994; Avisé & Hamrick, 1996; Smith & Wayne, 1996). Outra vantagem é a possibilidade de amplificação de fragmentos de DNA por meio do método de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR).

1.3.1 Marcadores mitocondriais

O DNA mitocondrial (mtDNA) consiste em uma fita pequena, dupla e circular, responsável pela codificação de 5% do funcionamento mitocondrial (Nahum, 2012). Nos animais vertebrados, o mtDNA é composto por aproximadamente 16.500 pb, com 37 genes codificantes (Meyer, 1993) e 2 regiões não codificantes, sendo elas a Região

Controladora (CR) e OriL (Portela & Huerta, 2007). Além de estar presente em praticamente todos os eucariotos, o DNA mitocondrial apresenta herança exclusivamente materna e uma taxa de mutação superior a de genes nucleares, que pode ser em até quatro vezes. Por isso, têm demonstrado serem marcadores eficientes em estudos evolutivos e filogenéticos (Margulis, 1996).

Nas regiões não codificadoras, presentes nos extremos da região controle, as taxas de evolução são superiores se comparadas as que ocorrem no restante da molécula. Estas alterações fazem com que ocorra a formação de múltiplos alelos, denominados de haplótipos, que podem ser ordenados filogeneticamente dentro de uma mesma população, auxiliando nas relações filogenéticas intrapopulacionais ou genealogias (Awise, 1994). A região D-loop, também conhecida como região controle, está localizada entre dois genes de RNAs transportadores. Esta região apresenta uma elevada taxa mutacional em relação a outras regiões do próprio DNA mitocondrial e em relação ao DNA nuclear (Meyer, 1993). Por possuir uma alta variação em seu tamanho, é responsável pela maior parte das variações que ocorrem no genoma mitocondrial, característica que torna o seu uso eficaz em estudos populacionais (Aquadro & Greenberg, 1983; Harrison *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1993).

A sua transmissão materna disponibiliza informações sobre as linhagens maternas fundadoras de estoques de peixes, o que o torna um marcador único, quando comparado com os marcadores tipicamente nucleares SSR (*simple sequence repeats*) e SNP (*Single nucleotide polymorphism*). As principais vantagens do mtDNA estão relacionadas a sua herança predominantemente materna, frequência baixa de rearranjo por recombinação, inversões ou transposições e taxas altas de substituições, inserções e deleções, que fazem com que as modificações neste genoma ocorram de cinco a dez

vezes mais rapidamente do que as modificações que ocorrem no DNA nuclear (Taberlet, 1996).

Vários são os estudos relacionados com peixes Neotropicais que utilizaram a região controle (CR) do mtDNA. Em Martins *et al.* (2003), foram estudadas populações de *Leporinus elongatus* pertencentes a bacia do Paraná, observando uma alta variabilidade genética intrapopulacional, bem como a presença de haplótipos exclusivos. Sivasunder *et al.* (2001), no estudo de populações de *Prochilodus lineatus* da bacia do Paraná, concluíram uma alta homogeneidade genética entre as populações e a presença de haplótipos similares distantes.

Em relação aos estudos do mtDNA em pacu, por meio de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), Calcagnotto (1998) utilizou fragmentos aleatórios do mtDNA para a caracterização de estoques selvagens, observando uma baixa variabilidade genética nos estoques selvagens analisados. Sobre estudos da região controle, Iervolino *et al.* (2010) utilizaram este marcador para identificar a distribuição e a variação genética dentro de populações de pacu na Bacia do Alto Paraguai. Neste último estudo, foi verificada uma falta de estrutura genética do pacu em estoques selvagens do Pantanal, o que dá indício de ser uma população panmítica. A respeito de estoques cultivados, aplicação deste tipo de marcador ainda não está disponível, o que mostra a necessidade de se realizar estudos dirigidos para o melhoramento genético.

Vários fatores são importantes para que os programas de melhoramento conduzam a ganhos genéticos expressivos e duradouros. Dentre eles, é fundamental realizar um adequado programa de pré-melhoramento, por meio da avaliação da variabilidade genética inicial, que evitará os problemas do estreitamento da base genética de certos estoques (Ponzoni, 2006). Estudos de variabilidade por meio de marcadores moleculares efetivos, como o mtDNA, são necessários para a organização

de uma estrutura de geração e análise de dados genéticos em longo prazo. A avaliação genética torna-se ainda mais importante diante das alterações nas frequências gênicas, e possibilidade de redução da variabilidade genética no processo de seleção de organismos geneticamente superiores, o que pode resultar no aumento da probabilidade de acasalamento de indivíduos aparentados e surgimento de genes deletérios, dizimando o potencial de linhagem da produção piscícola (Oliveira *et al.*, 2011).

1.4 Referências

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; VERÍSSIMO S.; OKADA, E. K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. Reviews in **Fish Biology and Fisheries.**, v.14, p.11–19. 2004.
- AQUADRO, C.F.; GREENBERG. B.D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. **Genetics.**, v.103, p.287-312, 1983.
- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution.** Chapman & Hall., New York, 1994.
- AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. **Conservation genetics.** Chapman & Hall., New York, p.502, 1996.
- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de identificação.** Brasília. EMBRAPA, 2007. 227p.
- BROWN, J.R.; ANDREW, T.B.; SMITH, M.J. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). **Molecular Biology and Evolution.**, v.10, n.2, p.326-341, 1993.

- CALCAGNOTTO, D. **Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Através da Análise do DNA Mitocondrial**. 1998. Tese (Doutorado) - Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.
- CARNEIRO, D.J., WAGNER, P.M., DIAS, T.C.R. Efeito da densidade de estocagem e do nível de proteína bruta da dieta, no desempenho de produção do pacu, (*Piaractus mesopotamicus*). In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 7, 1992, Peruíbe. *Anais...*Jaboticabal: CAUNESP, 1995. p.52-61.
- CATELLA, A.C. **Pesca no pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil: descrição, nível de exploração e manejo (1994-1999)**. 2001. Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas, Manaus, 2001.
- FAO, 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. FAO. Rome, Italy.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. **The state of world fisheries and aquaculture**, 2016. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/sofia/en>>. Acesso em 26 de Janeiro 2017.
- FERRAZ DE LIMA, J. A.; BARBIERI, G.; VERANI, J.R. Período de reprodução e idade da primeira maturação gonadal do pacu (*Colossoma mitrei*) em ambiente natural, (Rio Cuiabá, - Pantanal de Mato Grosso). *Anais do III Simpósio Brasileiro de Aquicultura*, São Carlos, SP, 1984
- FLORES NAVA, A. Aquaculture seed resources in Latin America: a regional synthesis. In: FAO Fisheries Technical Paper No 501. Assessment of freshwater fish resources for sustainable aquaculture. Bondad-Reantaso MG (ed). 2007
- GODOY, M. P. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do Rio Mogi-Guaçu. **Revista Brasileira de Biologia**, n. 27, p. 1-12, 1967.

- HONGLANG, H., 2007. Freshwater fish seed resources in China. In: Bondad-Reantaso, M.G., FAO Fisheries Technical Paper. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. Rome, Italy, p. 628.
- IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: **Produção da Pecuária Municipal**, 2015. v. 43
- IERVOLINO, F.; RESENDER, E.K.; HILSDORF, A.W.S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Fisheries Research.**, v.101, p.27–31. 2010.
- MARGULIS, L. Archenal-eubacterial mergens in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. **Proceedings of national academy of sciences: USA**, 1996. v.93, n.3, p.1071-6.
- MARTINS, C.; WASKO, A. P.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology.**, v.26, n.1, p. 33 – 38, 2003.
- MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: HOCHACHKA & MOMMSEN, **Biochemistry and molecular biology of fishes**, Elsevier., v.2., 1993.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura**, 2011.
- MPA – Ministério da Pesca e Aquicultura. **Censo Aquícola Nacional**. 2008.
- MPA - Ministério da Pesca e Aquicultura. **Potencial brasileiro**, 2014. Disponível em: <<http://www.mpa.gov.br/aquicultura/potencial-brasileiro>>. Acesso em: Jun. 2015.
- NAHUM, L.A. Evolução dos genomas. In: MATIOLI. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Ed. Holos, 2012.

PANNÉ HUIDOBRO, S. 2015. Producción por Acuicultura en Argentina en el 2015.

Informe de la Dirección de Acuicultura Dirección Nacional de Planificación
Pesquera Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Ministerio de Agroindustria.

Disponível em

<http://www.agroindustria.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/_archivo/s/160526_Producci%C3%B3n%20por%20Acuicultura%20en%20Argentina%20durante%20el%20a%C3%B1o%202015.pdf>

PONZONI, R.W. Genetic improvement effective dissemination: Keys to prosperous and sustainable aquaculture industries. In: PONZONI, R.W.; ACOSTA, B.O.; PONNIAH, A.G. **Development of Aquatic Animal Genetic Improvement and Dissemination Programs: current status and action plans**. Penang: WorldFish Center, 2006.

PORTELA, P.M. & HUERTA, A.F. **Genética y Genómica**. Madrid, 2007.

RESENDE, E.K. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin Excluding the Upper Paraná River. In. CAROLSFELD J., HARVEY B., ROSS C., BAERS A. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states**. Victoria: World Bank, 2003. p. 99-155.

SÃO PAULO. 2010. Decreto nº 56.031, Lista das Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção do Estado de São Paulo. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; GUILHERMO, O. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major south american rivers. **Molecular Ecology**., v.10, p.407-417. 2001.

SMITH, T.B. e WAYNE, F.W. **Molecular genetic approaches in Conservation**. New York: Oxford University Press, 1996. p.483

- TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. In: SMITH, T. B. & WAYNE, R. K. **Molecular Genetic Approaches in Conservation**, Oxford University Press, 1996. p. 125-142,
- URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO B. & GOMES L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: ED. da UFSM. 2005. p. 468.
- VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. 2016
- VAZZOLER, A.E.A.M.; SUZUKI, H.I.; MARQUES, E.E.; LIZAMA, M. DE. LOS. A. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In: VAZZOLER, A. A. AGOSTINHO, N. S. **A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e sócio econômicos**. Paraná: Hahn, 1997. p. 249-265.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar da variabilidade genética em lotes selvagens e cultivados de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), utilizando DNA mitocondrial.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar a composição genética do DNA mitocondrial em populações selvagens de pacu;
- Avaliar a variabilidade genética de lotes cultivados de pacu nas pisciculturas comerciais do Brasil e Argentina;
- Identificar e verificar a distribuição de haplótipos nos centros comerciais brasileiros e argentinos;
- Gerar subsídios para um manejo genético adequado em estoques cultivados e para programas de pré-melhoramento do pacu em aquicultura.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão deste trabalho foram divididos em forma de dois manuscritos, referentes às análises de populações selvagens [Capítulo 1: Análises de diversidade e estruturação genética de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) usando DNA mitocondrial] e populações cultivadas [Capítulo 2: Análise da diversidade genética em estoques cultivados de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando a região controle do DNA mitocondrial].

3.1 Capítulo 1

**Análise da diversidade e estruturação genética em populações
selvagens de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) DNA mitocondrial**

ABSTRACT

FREITAS, M.V. **Analysis of genetic structure and diversity in wild populations of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) using mitochondrial DNA.** 2017. Master's dissertation - Instituto de Biociência de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

The pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a species of high commercial importance and currently one of the main fish native to South America, attracting attention in both sport and commercial fishing. However, its natural stocks continue to decrease, primarily due to anthropic interference. The objective of this study was to analyze the genetic profile of four wild pacu populations distributed in the Paraná River, South America (Brazil: Panorama n = 36 and Ivinhema n = 8 ; Argentina: Goya n = 8 and Paso de La Patria n = 35), by using the control region (CR) of the mitochondrial DNA. The average sequence length was 440 pb and 27 polymorphic sites characterizing 28 haplotypes were found, four of which are shared and 24 exclusive. The rates of nucleotide (π) and haplotype (Hd) diversity varied from 0.057% to 0.708% and 0.250 to 0.891, respectively. The tests for Tajima's (D) and Fu's (Fs) demonstrated significant values in only one population (Panorama), or when all populations were grouped. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) demonstrated moderate genetic differentiation ($F_{ST} = 0.06593$) in the analyzed populations. This differentiation may be due to natural or imposed physical barriers, as observed by the presence of hydroelectric dams in the analyzed region. The low diversity values found in some populations may be related to fishing pressure, aquaculture escapes, restocking programs and the constant habitat alterations that this species has suffered over the years. Data regarding wild stock are of utmost importance to the monitoring and conservation of natural populations, as well as to future comparisons to cultivated stocks, with the objective of maintaining an elevated level of genetic diversity.

3.1.1 INTRODUCTION

Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) is a freshwater fish of South America with natural occurrence in the Paraná-Paraguay basins. This fish has body shape similar to the piranhas (round fish), and presents medium size between 3 and 7 kg (Saint-Paul, 2017). However, pacu is considered omnivorous and feeds preferentially of fruit and seed (Menton, 1989; Urbinati *et al.*, 2005). Pacu lives in lotic and semi-lotic environments and shows migratory activity for reproduction (Ferraz de Lima *et al.*, 1984; Agostinho *et al.*, 2004). Techniques of tagging and recapture showed that this species migrates around 26.4 km per day, reaching the maximum of 422 km in the Paraná River (Makrakis *et al.*, 2007).

Pacu is one of the most important non-model species cultivated in South America and its production has increased even in other parts of the world, such as China, Myanmar, Thailand and Vietnam (Honglang, 2007; FAO, 2010). This fish contributes significantly for the Brazilian aquaculture and represents one of the main native species produced, with an annual production of 13,276 t (IBGE, 2016).

This species is considered of high commercial value, with large-scale catches by the industrial fisheries and sport fishing (Resende, 2003; Britski *et al.*, 2007). Pacu represented one of the six most caught fish in continental waters of Brazil, with a volume that reached approximately 11 thousand tons per year (MPA, 2013). However, natural stocks of this fish have undergone a high level of exploitation (Catella, 2001; Peixer *et al.*, 2007). According to Decree No. 56.031, pacu was considered as critically endangered in the state of São Paulo (Brazil), *i.e.*, species that presents an extremely high risk of extinction in the wild in the near future (São Paulo, 2010).

Wild populations of pacu may also be suffering by the occurrence of dams for generation of electric energy, which is one of the main causes behind the decrease in

fish populations worldwide. The introduction of dams and reservoirs changes the surround hydrographic structure and alters the local fauna, interfering with natural migration patterns and reproductive strategy (Baxter, 1977; Tundisi 1978; Agostinho *et al.*, 1992; Larinier, 2000). About 146 impoundments exist in the Paraná River basin, 70% of which are used for the generation of electric energy, accounting for half the impounded areas in Brazil (Agostinho *et al.*, 2007). These modifications to the environment affect the fish communities significantly, altering the composition of the natural communities through the decrease and/or extinction of populations and the establishment of others (Agostinho *et al.*, 1999).

Previous genetic studies in pacu have demonstrated a low genetic divergence in natural populations from the Paraguay River in the Pantanal region, which suggests the occurrence of a panmitic unit because this area is characterized by flooded plains that facilitates the migration of this species (Ierlovino *et al.*, 2010). However, a significant differentiation was observed between populations of the Paraguay River in relation to the Paranapanema River (tributary of the Upper Paraná River), where there are several dams that fragment the rivers (Calcagnotto & DeSalle, 2009).

Additionally, in the past, the Paraná River basin was divided into two regions due to the Guaíra Falls (or Salto das Sete Quedas), which was a complex of waterfalls considered as geographical barrier preventing fish migration from the Lower to the Upper Paraná River (Bonetto, 1986; Resende, 2003). However, this natural barrier no longer exists since 80's, due to the implementation of the Itaipú Hydroelectric Dam, which flooded the region of the Guaíra Falls. Nowadays, the Itaipú Dam is considered as a functional barrier (instead the Guaíra Falls), but fish ladders can connect the regions of Lower and Upper Paraná River allowing fish migration, especially for pacu (Agostinho *et al.*, 1994). Studies show that previously isolated populations, due to the

geographic barrier, are currently able to migrate between reservoirs, often playing the role of invasive species, such as the tucunare (*Cichla ocillaris*) and corvina (*Plagioscion squamosissimus*), or often involved in accidents with bathers, such as stingrays (Neto & Haddad Junior, 2010).

In the present study, the control region (CR) of the mitochondrial DNA was used to analyze the genetic structure and diversity in wild populations of pacu, particularly in areas with significant impoundments like the Paraná River.

3.1.2 MATERIAL AND METHODS

3.1.2.1 Sampling of wild population and DNA extraction

Samples of posterior and adipose fins of pacu *Piaractus mesopotamicus* (n=87) were collected in four natural locations along the Paraná river, including two Brazilian regions (Panorama and Ivinhema) and two Argentinian regions (Paso de la Patria and Goya) (Figure 1).

The samples were stored in absolute alcohol and stocked in the Laboratory of Genetics in Aquaculture and Conservation (LaGeAC) in the Center of Aquaculture (CAUNESP), UNESP, Jaboticabal, SP. Brazilian samples were collected under the authorization of a permanent license for collecting zoological material (N0 33435-1, granted by ICMBio - MMA). Argentinian samples were collected by sport fishermen in collaboration with the research group of the Aquatic Biotechnology Laboratory, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas-Universidad Nacional de Rosario.

DNA extraction was performed using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) and DNA integrity was verified on 1% agarose gel.

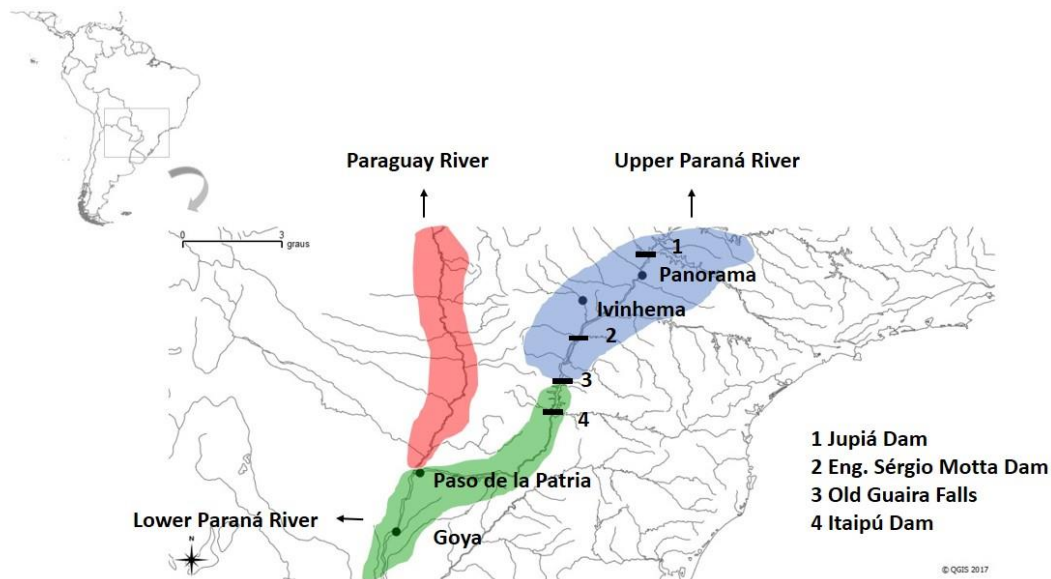


Figure 1. Area of the populations of *Piaractus mesopotamicus* analyzed in this study.

3.1.2.2 Amplification of the control region and sequencing

Analysis of genetic diversity in the wild stocks was assessed through the partial sequencing of the mitochondrial DNA control region (CR). Primers for control region (PM01 5' GATCCCAGTACATTATATGTAT 3' and PM02 5' CCTTGTTAATCATTACRCTGA 3') were designed using the program Geneious V.7.1.3, with the mitochondrial genome of *P. mesopotamicus* (NC_024940) as reference. PCR assays were performed at a final volume of 12 μ l: 1X Taq polymerase buffer; 1.5 mM MgCl₂; 100 μ M of each dNTP; 0.1 μ M of each primer; 10-50 ng of genomic DNA and 0.5 U of Taq polymerase (Invitrogen). The following amplification cycle was used: denaturation 94°C for 3 minutes, 35 cycles of denaturation at 94°C for 1 minute; annealing at 55°C for 45 seconds, extension to 72°C for 1 minute, and a final extension at 72°C for 10 minutes. PCR assays were performed on the ProFlex™ PCR System (Life technologies) and the final product checked in 1.5% agarose gel.

PCR products were cleaned with EXO-SAP Kit (USB® ExoSAP-IT® PCR Product Cleanup) and then underwent PCR sequencing, using BigDYE, Terminator

Cycle Sequencing Kit version 3, 1 (Applied Biosystems, Inc.). The sequencing was performed in the Center of Biological Resources and Genomic Biology (CREBIO), in UNESP - Jaboticabal, Brazil, using the ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.1.2.3 *Comparison between sequences in the database*

Sequences obtained in the present study were compared with haplotypes of individuals from the Paraguay River basin, reported by Iervolino *et al.* (2010), available at Genbank database (accession number: Fj96883 - Fj968916).

3.1.2.4 *Statistical Analysis*

The completed sequences were analyzed manually and aligned using the program CLUSTAW (Thompson *et al.*, 1994) included in the program ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006) for the identification of polymorphic areas. For genetic and population-based analysis, the nucleotide compositions, sequence diversity, number of polymorphic areas, and haplotype diversity were calculated using the program DNAsp v.5 (Librado and Rozas, 2009). The Tajima's D (1989) and Fu's Fs (1997) were calculated by DNAsp v.5 (Librado and Rozas, 2009) in order to test for selective pressures in the analyzed populations. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) was conducted to test the genetic heterogeneity between mtDNA haplotypes using ARLEQUIN version 3.01 (Excoffier *et al.*, 2006), which uses Wright's F-statistics (1951, 1965). A net of haplotypes was estimated by Software Network v 4.6.1.0. The Neighbor Joining tree was estimated by MEGA 6.0: Molecular Evolutionary Genetics Analysis, using the Tamura and Nei parameters.

3.1.3 RESULTS

An average of 440 bp (base pairs) of the control region were sequenced for 87 individuals of *P. mesopotamicus*, being 32.8% Thymine (T), 30.6% Adenine (A), 21.6% Cytosine (C) and 15% Guanine (G). In total, 27 polymorphic sites resulting in 28 haplotypes were found, of which 4 haplotypes were shared among individuals from different sampling points, and 24 were unique. The haplotype H2 was the most representative in the population, being shared with individuals of all 4 analyzed regions. The major haplotype diversity was found in Paso de la Patria ($H_d = 0.891$), where the highest number of exclusive haplotypes was also located, accounting for 16 out of 24 (Table 1). The lower diversity was observed in Goya ($H_d = 0.250$), where only two haplotypes were present. However, the lower value may be due to the small sample size ($n=8$). The nucleotide diversity index (π) varied from 0.057% (Goya) to 0.708% (Paso de la Patria) (Table 1).

Table 1. Sampling point/locality, geographic coordinates, and diversity parameters on *Piaractus mesopotamicus*.

	Coordinates	N	N° Haplotypes	Hd	π	Tajima's D	Fs Fu
Panorama	21°21'4.94"S 51°51'40.92"O	36	10	0.557	0.00264	-2.00335	-5.432
Ivinhema	22° 6'54.33"S 53°39'7.35"O	8	4	0.643	0.00559	-0.41500	0.583
Paso de la Patria	27°18'31.95"S 58°34'14.23"O	35	19	0.891	0.00708	-1.52913	-11.251
Goya	29° 5'28.37"S 59°16'5.53"O	8	2	0.250	0.00057	-1.05482	-0.182
All Group		87	28	0.692	0.00458	-1.96921	- 24. 673

N= Number of individuals, Hd= Haplotype diversity, π = Nucleotide diversity.

When haplotypes obtained in this work were compared with available sequences from Paraguay River in Genbank (Iervolino *et al.*, 2010), we observed that many haplotypes were shared among the localities, especially for Paso de La Patria, where 5 haplotypes were shared.

The neutrality tests for Tajima's D and Fu's F_s only yielded significant results in a single population (Panorama) (Table 1). Tajima's D also proved significant when considering all locations together ($p < 0.05$).

The results of AMOVA in accordance to the geographic history of region, *i.e.*, taking into consideration the old natural geographical barrier Guaira Falls (separating the samples in two groups, Brazilian and Argentinian regions) showed that the major variance was observed within populations and not between them, presenting a percentage variation of 93.4% within the populations. The F_{ST} values were significant, demonstrating a moderate genetic difference among the analyzed populations ($F_{ST} = 0.06593$). The Φ_{ST} values showed no significance. The pairwise F_{ST} showed significant difference between the Paso de la Patria and others locations: Panorama ($F_{ST} = 0.07526$), Ivinhema ($F_{ST} = 0.07435$), and Goya ($F_{ST} = 0.13598$) (table 2) ($p < 0.05$).

Table 2 Pairwise F_{ST} between all populations.

	Pairwise F_{ST}			
	Panorama	Ivinhema	Paso de la Patria	Goya
Panorama	-			
Ivinhema	-0.02914	-		
Paso de la Patria	*0.07526	*0.07435	-	
Goya	-0.01839	-0.03896	*0.13598	-

*significant values $p < 0.05$

The haplotypes net (Figure 2) demonstrated the distribution of haplotypes in the analyzed sampling localities, being H2 considered the ancestral haplotype. The

Neighbor Joining tree suggested a random distribution among the 28 analyzed haplotypes (Figure 3).

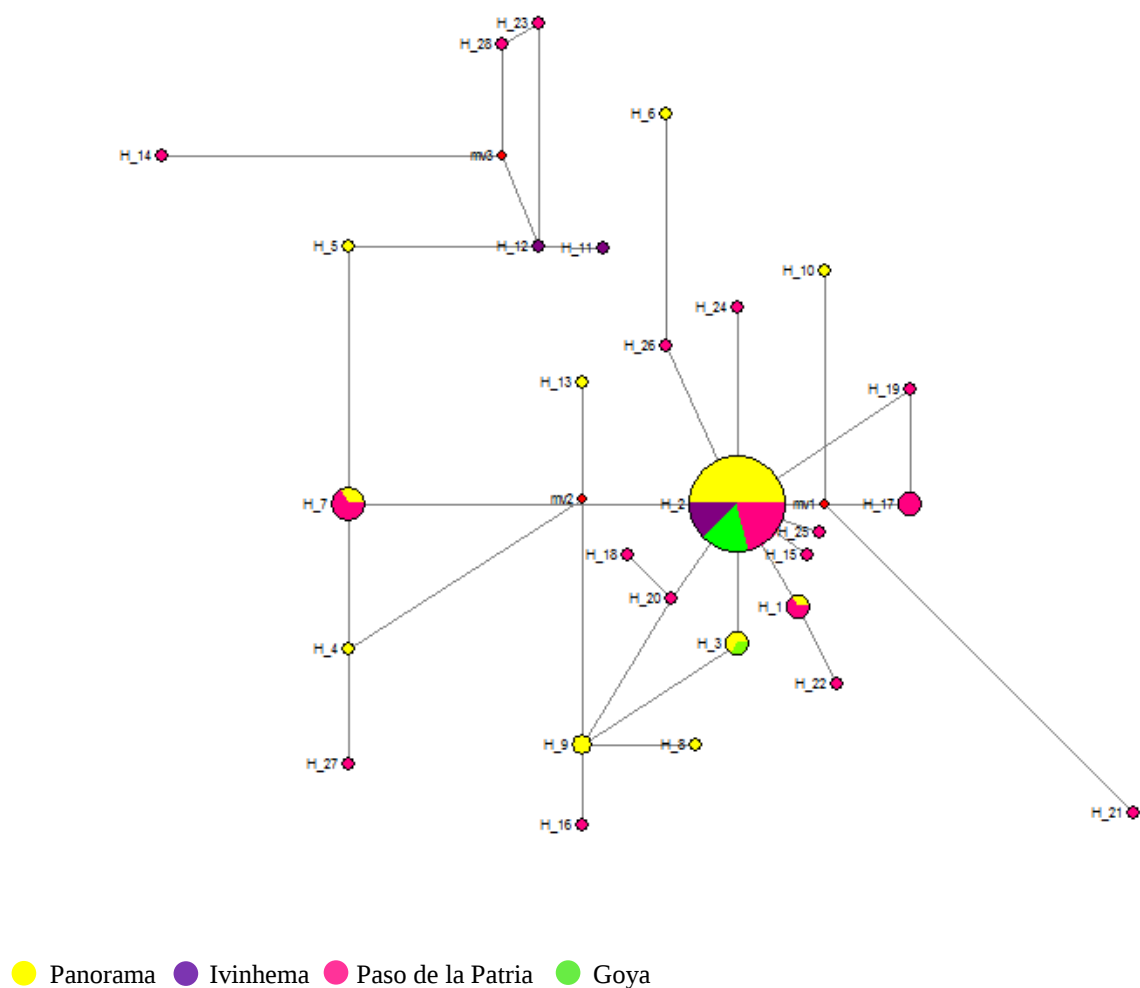


Figure 2. Haplotype net from the four sampling localities analyzed. The size of the circle corresponding to frequency of haplotypes

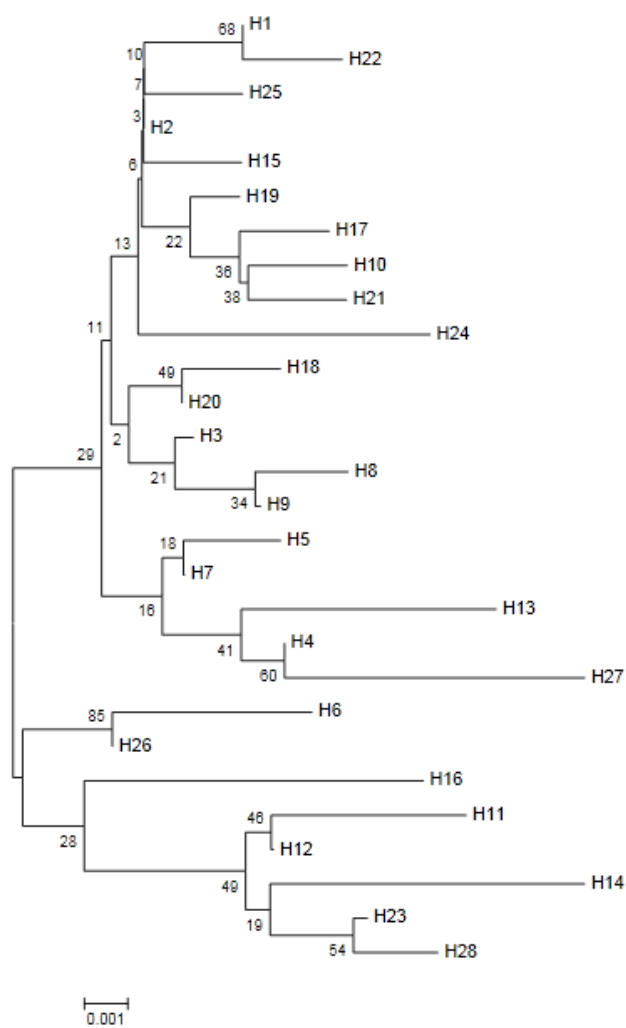


Figure 3. Neighbor Joining tree, estimated by Tamura and Nei parameters, throughout the 28 haplotypes of *Piaractus mesopotamicus*.

3.1.4 DISCUSSION

3.1.4.1 Genetic variability in wild populations

In general, the average parameters for genetic diversity in this study were lower than those found by Iervolino *et al.* (2010), when analyzing pacu populations from the Paraguay River using mtDNA. Furthermore, analysis of mtDNA sequences in the present study showed a high number of exclusive haplotypes in low frequency, which may be related to the reduction in natural stocks of pacu over time, mainly due to overfishing and destruction in the habitat (Resende, 2003). For example, the regions with the lowest genetic diversity, such as Panorama and Goya, are known as tourist spots for fishing, an activity that could be interfering directly in the genetic variability of these pacu populations. In fish, some studies have reported overexploitation conclusively with low levels of genetic diversity, such as New Zealand snapper *Pagrus auratus* (Hauser *et al.*, 2002), the North Sea cod *Gadus morhua* (Hutchinson *et al.*, 2003), the dark blotched rockfish *Sebastes crameri* (Gomez-Uchida & Banks, 2006), and acoupa weakfish *Cynoscion acoupa* (Rodrigues *et al.*, 2008).

Escape from aquaculture facilities is another factor that may be influencing the genetic diversity, *i.e.*, the introduction of cultivated individuals for wild populations, which can result in admixture of populations with different genetic characteristics reducing the overall mean of diversity (Wahlud Effect), as observed in other fish species (Brown *et al.*, 2015; Miralles *et al.*, 2016). Moreover, pacu restocking programs performed by the hydroelectric companies by several years can also alter the genetic structure of wild populations (Ribeiro *et al.*, 2015), as observed for salmon supportive breeding in which genetic diversity declined significantly in wild populations suggesting that genetic drift has increased because of a population bottleneck (Eldridge *et al.*, 2009). However, these hypotheses should be better investigated to confirm the

influence of cultivated pacu in wild populations, especially in regions where there are aquaculture facilities or restocking programs, such as in the Panorama region.

The analysis of neutrality tests Tajima (D) and Fu (F_s) showed that selective pressures were not significant in most of the wild pacu populations analyzed in this study, which indicated populations in accordance to the Hardy-Weinberg equilibrium, a situation also observed in the pacu populations from the Paraguay River (Iervolino *et al.*, 2010). However, non-significant, but negative F_s values were found in the populations from Paso de la Patria and Goya. According to Hartl and Clark (1997), these negative values may be related to a rapid demographic expansion. Tajima's D value was significant ($p < 0.05$) in the individuals of Panorama and upon analyzing the populations as a single group. These values may be related to the effect of selection, population expansion, population bottleneck, or heterogeneity of mutation rates (Santos *et al.*, 2006). The presence of population bottlenecks is commonly observed in populations that showed loss in genetic diversity, which could explain the situation observed in the analyzed populations. Bottlenecks reduce the population size, resulting in genetic drift and inbreeding, which may interfere significantly with the species' evolutionary potential (Hatanaka & Galetti Jr., 2003).

3.1.4.2 Genetic structuring and AMOVA

In the present study, moderate values of genetic structuring were found for pacu in the Paraná River basin. Probably, the old barrier Guaira Falls could be acting as main factor to the genetic structure of pacu herein observed by mtDNA markers. Another hypothesis that could be influencing this differentiation is the physical barriers imposed by human activities. Along the Paraná River basin there are three large hydroelectric dams: Jupiá, Engenheiro Sérgio Motta and Itaipú. Dams are responsible for the

formation of impacted environments, which alter the water regime and decrease the composition and richness of native species (Agostinho & Gomes, 1997), often acting as an obstacle to migration. The alteration of the migratory flow consequently leads to a diminution or interruption of the gene flow, reducing the population size, which makes more susceptible to the effects of genetic drift (Hatanaka & Galetti Jr., 2003).

The results of genetic structure also indicated a significant differentiation of Paso de la Patria in relation to the others localities, which may be related to the influence of the Paraguay River on this population. This is suggested because Paso de la Patria shares several unique haplotypes with those found in populations of the Paraguay River (Iervolino *et al.*, 2010).

Similar to the mtDNA results found in this study, microsatellite analyzes along the Paraná-Paraguay basin also demonstrated a significant population structure for pacu, between the region of the Paranapanema (Upper Paraná River) and tributaries of the Paraguay River (Calcagnotto & DeSalle, 2009). However, studies with the mtDNA control region previously performed in pacu (Iervolino *et al.*, 2010) did not find structure levels when analyzing populations from the Paraguay River. The possible difference in results may be related to the region studied by Iervolino *et al.* (2010), since the atypical topology of the Pantanal (characterized by flooded regions) favors the migratory flow of pacu during flood periods. Similarly, analyzes with the related species tambaqui *Colossoma macropomum* (Santos *et al.*, 2007), also demonstrated the absence of genetic structuring in populations from the Amazon River. In both studies, a high level of migration in these two species was observed, especially in regions where there are no geographic barriers (Santos *et al.*, 2007; Iervolino *et al.*, 2010).

In the past, the Guaíra Falls were flooded after the implementation of the Itaipú Hydroelectric Dam (80's), which allowed the fish migration of isolated

species/populations from the Lower to the Upper Paraná River (Ferreira Júlio Junior *et al.*, 2009; Zaia *et al.*, 2017). Moreover, fish ladders can be acting as mechanisms to facilitate fish migration from the Lower to the Upper Paraná River, as observed in a previous study for pacu (Makakis *et al.*, 2007), which showed that most of the migration of this species occurs in the horizontal direction upstream of Itaipú, especially using fish ladders. Therefore, these data indicates that pacu populations from the Lower and Upper Paraná River, separated in the past by the old natural barrier Guaíra Falls, can be suffering a process of genetic homogenization. This hypothesis needs to be better elucidated using molecular markers that evolve faster than mtDNA (*e.g.*, microsatellites), providing improved conclusions of recent and contemporary events in population history (Wan *et al.*, 2004).

Studies of genetic composition and how species are genetically structured in a watershed are essential for conservation of fishery resources (Piorski *et al.*, 2008). Thus, the results of the present work collaborate with the genetic information about the native species, increasing the data in relation to the wild populations of pacu. These results are also fundamental as references for analyzes of cultivated stocks and to develop future breeding programs in pacu.

3.1.5 REFERENCES

- AGOSTINHO, A. A. Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In: AGOSTINHO, A. A. & BENEDITO-CECILIO, E. Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil. Eduem, Maringá, Brazil. 1992.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Eduem, Maringá, Brazil. 2007.

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; VERÍSSIMO, S.; E. OKADA, K. Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Paraná River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**. v.14, p.11–19, 2004.
- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; LATINI, J. D. Fisheries management in Brazilian reservoirs: lessons from/for South America. **Interciencia**. p.334–338, 2004.
- AGOSTINHO, A.A. Pesquisa, monitoramento e manejo da fauna em empreendimentos hidrelétricos. In: Cômite Coordenador das Atividades de Meio Ambiente do Setor Elétrico – COMASE, ELETROBRÁS. Seminário sobre a fauna aquática e setor elétrico brasileiro: gerenciamento de bacias hidrográficas e fauna aquática, 1994.
- AGOSTINHO, A.A.; MIRANDA, L.E.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; TJOMAZ, S.M.; SUZUKI, H.I. Patterns of colonization in neotropical reservoirs and prognoses on aging. In: TUNDISI, J.G. & STRASKRABA, M. Theoretical reservoirs ecology and its applications. Internacional Institute of Ecology, Brazilian Academy of Science and Backhuys Publishes. São Carlos, Brazil, 1999.
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H., TRAUB-CSEKO. Genetic diversity of wild and culture populations of *Brycon opalinus* (cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. **Aquaculture**. v.247, p.51-65, 2005.
- BAXTER, R. M. Environmental effects of dams and impoundments. **Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics**. v.8, p. 255-283, 1977.
- BONETTO A.A. Fish of the Paraná system. In: The Ecology of River Systems (eds DAVIES BR, WALKER KF), DR W. JUNK, DORDRECHT, The Netherlands. pp. 573–588, 1986.

- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de identificação**. ed. EMBRAPA, Brasília, Brazil, 2007.
- BROWNL, C.; MILTIADOUL, D.; TSIGENOPOULOS, C.S. Prevalence and survival of escaped European seabass *Dicentrarchus labrax* in *Cyprus* identified using genetic markers. **Aquaculture Environment Interactions**.v.7, p.49–59, 2015.
- CALCAGNOTTO, D. & DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**. v.7, p.607-616, 2009.
- CATELLA, A.C. Pesca no pantanal do Mato Grosso do Sul, Brasil: descrição, nível de exploração e manejo (1994-1999). Tese (Doutorado) – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Universidade do Amazonas, Manaus, 2001.
- ELDRIDGEL, W.H., MYERS, J.M., NAISH, K.A. Long-term changes in the fine-scale population structure of coho salmon populations (*Oncorhynchus kisutch*) subject to extensive supportive breeding. **Heredity**. v.103, p.299–309, 2009.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis, 2006.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**. v.131, p.479-491, 1992.
- FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture 2010**. FAO. Rome, Italy, 2010.
- FERRAZ DE LIMA, J. A.; BARBIERI, G.; VERANI, J.R. Período de reprodução e idade da primeria maturação gonadal do pacu (*Colossoma mitrei*) em ambiente natural, (Rio Cuiabá, - Pantanal de Mato Grosso). Anais do III Simpósio Brasileiro de Aqüicultura, São Carlos, SP, 1984.

- FERREIRA JÚLIO JÚNIOR, H.; DEI TÓS, C.; AGOSTINHO, A.A.; PAVANELLI, C.S. A massive invasion of fish species after eliminating a natural barrier in the upper rio Paraná basin. **Neotropical Ichthyology**. v.7, p.709-718, 2009.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; AND BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.
- FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**. v.147, p.915-925, 1997.
- GARRONE NETO, D. & HADDAD JUNIOR, V. Arraías em rios da região Sudeste do Brasil: locais de ocorrência e impactos sobre a população. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.43, p.82-88, 2010.
- GOMEZ-UCHIDA, D. & BANKS, M.A. Estimation of effective population size for the long-lived darkblotched rockfish *Sebastes crameri*. **Journal of Heredity**. v.97, p.603-606, 2006.
- HARTL, D.L. & CLARK, A.G. **Principles of population genetics**. Sunderland: Sinauer Associates, 2007.
- HATANAKA, T. & GALETTI JR, P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**. v.26, p.19-25, 2003.
- HAUSER, L.; ADCOCK, G.J.; SMITH, P.J.; RAMIREZ, J.H.B.; CARVALHO G.R. Loss of microsatellite diversity and low effective population size in an overexploited population of New Zealand snapper (*Pagrus auratus*). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v.99, p.11742-11747, 2002.

- HONGLANG, H. Freshwater fish seed resources in China. In: BONDAD-REANTASO, M.G., FAO Fisheries Technical Paper. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. Rome, Italy, p. 628, 2007.
- HUTCHINSON, W.F.; VAN OOSTERHAUT, C.; ROGERS, S.I., CARVALHO, G.R. Temporal analysis of archived samples indicates marked genetic changes in declining North Sea cod (*Gadus morhua*). **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**. v.270, p.2125-2132, 2003.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística., 2016. Rio de Janeiro: Produção da Pecuária Municipal, 2015.
- IERVOLINO, F.; RESENDER, E.K.; HILSDORF, A.W.S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Fisheries Research**. v.101, p.27–31, 2010.
- LARINIER, M. Environmental issues: Dams and fish migration. In: Word commission on dams. Thematic review II.1: Dams, ecosystem functions and environment restoration. Contributing paper, 2017.
- LIBRADO, P. & ROZAS, J. DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**. v.25, p.1451-1452, 2009.
- MAKRAKIS, S.; MAKRAKIS, M.C.; WAGNER, R.L.; DIAS, J.H.P.; GOMES, L.C. Utilization of the fish ladder at the Engenheiro Sérgio Motta Dam, Brazil, by long distance migrating potamodromous species. **Neotropical Ichthyology**. v.5, p.197–204, 2007.
- MENTON, D.J.; CAROLSFELD, J.; BANEN, E.B.; ALCÂNTARA, R.C.G.; BERNARDINHO, G. In: HERNANDEZ, A. Bibliografia de espécies dos gêneros *Colossoma* e *Piaractus*. Bogotá, Guadalupe, 1989.

- MIRALLES, L.; MRUGALA, A.; SANCHEZ-JEREZ, P.; JUANES, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Potential Impact of Mediterranean Aquaculture on the Wild Predatory Bluefish. **Marine and Coastal Fisheries**. v.8, p.92-99, 2016.
- MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura., 2013. Boletim estatístico da pesca e aquicultura.
- PEIXER, J. & PETRERE JR, M. Hook selectivity of the pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**. v. 67, p.339-345, 2007.
- PIORSKI, N.M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P.D.; GALETTI JR, P.M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**. v.68, p.1039-1050, 2008.
- RESENDE, E.K. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin Excluding the Upper Paraná River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAERS, A. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states. Victoria: World Bank. pp. 99-155, 2003.
- RIBEIRO, P.R.; LOPERA-BARRERO, N.M.; SANTOS, S.C.A.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; OLIVEIRA, S.N.; ALEXANDRE FILHO, L.; VAGAS, L.; GOES, E.S.R.; CASTRO, P.L.; POVEDA PARRA, A. Genetic diversity of pacu for restocking programs in the Tietê and Grande rivers, Brazil. **Semina: Ciências Agrárias**. v.36, p.3807-3826, 2015.
- RODRIGUE, R.; SCHNEIDER, H.; SANTOS, S.; VALLINOTO, M.; SAIN-PAUL, U.; SAMPAIO, I. Low levels of genetic diversity depicted from mitochondrial DNA sequences in a heavily exploited marine fish (*Cynoscion acoupa*, Sciaenidae)

- from the Northern coast of Brazil. **Genetics and Molecular Biology**. v.31, p.487-492, 2008.
- SAINT-PAUL, U. Native fish species boosting Brazilian's aquaculture development. **Acta of Fisheries and Aquatic Resources**. v.5, p.1-9, 2017.
- SANTOS, M.C.F.; RUFFINO, M.L.; FARIAS, I.P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**. v.71, p.33-44, 2007.
- SANTOS, S.; HRBEK, T.; FARIAS, I.P.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of the South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**. v.15, p.4361-4373, 2006.
- SÃO PAULO. 2010. Decreto nº 56.031, Lista das Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção do Estado de São Paulo. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo.
- TAJIMA, F. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**. 123, 585-595, 1989.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**. v.30, p.2725-2729, 2013.
- THOMPSON, J.D.; HIGGINS D.G.; GIBSON T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. v.22, p.4673-4680, 1994.

- TUNDISI, J. Construção de reservatórios e previsão de impactos ambientais no baixo Tietê: Problemas limnológicos, Instituto de geografia. **USP. Biogeografia**, p.1-19, 1978.
- URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F.D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO B. & GOMES L.C. Espécies nativas para piscicultura no Brasil. UFSM, Santa Maria. pp. 468, 2005.
- VAZZOLER; SUZUKI, H.I.; MARQUES, E.E.; LIZAMA, M.A. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. In: VAZZOLER, A.E.A.M & A.A., AGOSTINHO. A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socio econômicos. Paraná: Hahn, p. 249-265, 1997.
- WAN, Q.H.; WU, H.; FUJIHARA, T.; FANG, S.G. Which genetic marker for which conservation genetics issue?. **Electrophoresis**. v.25, p.2165–2176, 2004.
- WANG, L.; SHI, X.; SU, Y.; MENG, Z.; LIN, H. Loss of Genetic Diversity in the Cultured Stocks of the Large Yellow Croaker, *Larimichthys crocea*, Revealed by Microsatellites. **International Journal of Molecular Sciences**. v.13, p.5584-5597, 2012.
- WRIGHT, S. Variability within and among natural populations. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.
- ZAIA, G.H.A.; FIGUEIREDO, B.R.S.; MANETTA G.I.; SACRAMENTO P.A.; TÓFOLI R.M.; BENEDITO, E. Trophic segregation underlies the coexistence of two piranha species after the removal of a geographic barrier. **Hydrobiologia**. DOI 10.1007/s10750-017-3159-6. 2017.

3.2 Capítulo 2

**Análise da diversidade genética em estoques cultivados de pacu
(*Piaractus mesopotamicus*) utilizando a região controle do DNA
mitocondrial**

RESUMO:

FREITAS, M.V. **Análise da diversidade genética em estoques cultivados de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando a região controle do DNA mitocondrial**. 2017. Dissertação de mestrado – Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

O estudo da diversidade genética em estoques cultivados é fundamental para a manutenção do potencial genético, principalmente, quando se pretende iniciar programas de melhoramento. O manejo reprodutivo equivocado, em conjunto com o uso de poucos reprodutores, muitas vezes aparentados, tende a diminuir a variabilidade, acarretando na perda do potencial genético e na depressão endogamia. Neste estudo, análises da região controle do DNA mitocondrial (CR) foram utilizadas para estimar os níveis de diversidade genética em estoques de reprodutores de *Piaractus mesopotamicus*, provenientes de oito pisciculturas, sendo quatro brasileiras (PB1-PB4) e quatro argentinas (PA1-PA4). Além disso, fêmeas matrizes de uma população base de programa de melhoramento também foram analisadas (N= 22). Ao total, foram sequenciados em torno de 411 pb (pares de bases) que caracterizaram 47 sítios polimórficos, evidenciando 34 haplótipos, dos quais 5 são compartilhados entre as pisciculturas e 29 são exclusivos. A diversidade nucleotídica (π) variou de 0,00031 a 0,01451 e a haplotípica (Hd) de 0,125 a 0,868. A análise de variância molecular (AMOVA) indicou alta estruturação presente nos estoques analisados ($F_{ST}= 0,16647$ e $\Phi_{ST}= 0,10503$). Quando se compara as populações selvagens com os lotes de cultivo, é possível observar que a variabilidade genética encontrada é similar. De forma geral, a diversidade encontrada foi alta, principalmente no plantel de reprodutores das pisciculturas brasileiras. Análises de diversidade genética em estoques cultivados podem direcionar os melhores cruzamentos com base nos haplótipos mais variáveis, assim mantendo os níveis de diversidade nestes plantéis e evitando a perda do potencial genético por meio da endogamia. Além disso, os haplótipos detectados neste trabalho podem futuramente servir como marcadores de rastreabilidade de produtos resultantes do melhoramento genético do pacu.

3.2.1 INTRODUÇÃO

A espécie *Piaractus mesopotamicus*, popularmente conhecida como pacu, pacu-caranha, caranha ou pacu-guaçu (Britski *et al.*, 2007), é um serrasalmideo de importância comercial (Severi *et al.*, 1999) que está distribuído nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai (Godoy, 1975), principalmente nas planícies do Pantanal (Petrere, 1989). É uma das principais espécies de cultivo para a piscicultura nacional, ocupando a 6ª posição de produção, juntamente com o seu híbrido com a pirapitinga *Piaractus brachypomus* (patinga), com uma estimativa de produção anual de 13.276 ton (IBGE, 2016). Além disso, tem sua produção representativa em outros países da América do Sul, em especial a Argentina, cuja produção desta espécie corresponde a 52,6% do total produzido, sendo a principal espécie aquícola produzida no país (2.119,17 ton) (Schenone *et al.*, 2011; Panné Huidobro, 2015; Valladão *et al.*, 2016). Os países asiáticos (China, Myanmar, Tailândia e Vietnã) também tem utilizado o pacu como uma das espécies para a aquicultura (Flores Nava 2007; Honglang 2007; FAO 2010; Lin *et al.*, 2015; Valladão *et al.*, 2016).

O pacu é um dos peixes da aquicultura da América do Sul mais estudados, sobretudo sob aspectos reprodutivos, nutricionais e parasitológicos (Urbinati *et al.*, 2005). No entanto, mesmo com sua relevância para a aquicultura brasileira, os estudos genéticos para essa espécie ainda são escassos (Calcagnotto *et al.*, 2001), especialmente de melhoramento genético. Embora a caracterização da variabilidade genética seja uma etapa fundamental quando se pretende iniciar programas de melhoramento genético (Marther, 2001), de forma a evitar estoques endogâmicos, poucos estudos para espécies de interesse comercial têm sido desenvolvidos neste âmbito. A endogamia se expressa como a união de organismos que podem possuir o mesmo parentesco ou estarem ligados a ancestrais comuns, desta forma, ocorre à diminuição da heterozigosidade e

homogeneização da variação genética dentro da população (Avise, 1994; Freitas *et al.*, 2014). Logo, a formação de famílias endogâmicas e utilização de reprodutores com baixa variabilidade genética podem desencadear na perda do potencial genético das espécies (Hiltsdorf & Dergam, 1999; Melo *et al.*, 2006; Moreira *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, ferramentas moleculares têm sido amplamente aplicadas visando a detecção da variabilidade genética em lotes de cultivo (Petersen *et al.*, 2012, Moreira *et al.*, 2007, Aguiar *et al.*, 2013). Por exemplo, lotes do peixe *Colossoma macropomum* provenientes do estado de Rondônia (Brasil) apresentaram-se com alta variabilidade genética e baixa estruturação genética (Lopes *et al.*, 2009). De forma similar, uma alta variabilidade também foi encontrada em lotes de tilápia nilótica em estudos com marcadores microssatélites, evidenciando que o manejo adequado tende a diminuir as pressões por endogamia (Moreira *et al.*, 2007).

Em pacu, alguns estudos já foram realizados sobre a variabilidade genética, especialmente em populações selvagens e estoques destinados a programas de repovoamento (Povh *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015). Em geral, estudos indicam alta variabilidade e estruturação genética desta espécie em ambientes naturais, especificamente ao longo da bacia do Rio Paraná ou entre as bacias do Paranapanema/Paraguai (Cacagnotto & Desalle, 2009; Capítulo 1), apesar de populações selvagens da Bacia do rio Paraguai (Pantanal) serem consideradas uma unidade panmítica. Além disso, altos valores de diversidade também foram observados nos estoques destinados para programas de repovoamento desta espécie (Povh *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2013; Ribeiro *et al.*, 2015). Entretanto, análises com a finalidade de gerar subsídios para um programa de melhoramento ou manejo genético do pacu em pisciculturas são inexistentes.

Desta forma, a aplicação de ferramentas genéticas para o pacu poderá acelerar e maximizar a produção sustentável deste pescado, principalmente se estas tecnologias forem desenvolvidas e direcionadas para aplicação rotineira em programas de manejo, conservação e melhoramento genético. O objetivo principal deste estudo foi avaliar a diversidade genética em estoques cultivados de pacu de diferentes pisciculturas comerciais brasileiras e argentinas, utilizando o DNA mitocondrial (CR) como ferramenta.

3.2.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.2.1 Coleta de lotes cultivados

As análises genéticas dos animais deste estudo foram realizadas em plantéis de reprodutores cultivados, especificamente pertencentes a produtores de alevinos que comercializam animais para piscicultores de engorda, dos quais foram coletadas amostras de nadadeira caudal e/ou adiposas de oito empresas comerciais: quatro pisciculturas brasileiras e quatro argentinas (tabela 1). Além disso, também foram analisadas fêmeas matrizes que formaram a população base de um programa de melhoramento genético do pacu, cujas famílias estão sendo mantidas no Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal, SP, Brasil (tabela 1). Todos os animais foram individualmente marcados com *pit-tags* (FDX-B) e mantidos vivos nas instalações dos produtores, até que sejam realizados o manejo posterior e a seleção genética dos animais. A identidade das pisciculturas foi mantida em sigilo, sendo identificadas como PB1-PB4 as pisciculturas brasileiras, PA1-PA4 as pisciculturas argentinas, e as matrizes como MA. A extração de material biológico foi realizada por meio do Kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega), e a integridade das amostras foram verificados em gel de agarose 1%.

Tabela 1 Número amostral de peixes coletados para caracterização de lotes cultivados.

Piscicultura	N
PA1	16
PA2	14
PA3	14
PA4	16
PB1	19
PB2	14
PB3	16
PB4	18
MA	22
Total	149

N= número amostral

3.2.2.2 Amplificação da região controle e sequenciamento

A análise da diversidade nos centros comerciais foi feita por meio do sequenciamento parcial da região controle (CR) do DNA mitocondrial. Para isso, foram realizados ensaios em cadeia polimerase (PCR) utilizando *primers* internos à região controle (PM01 5' GATCCCAGTACATTATATGTAT 3' e PM02 5' CCTTGTTAATCATTACRCTGA 3') (Cap. 1). As reações foram realizadas com volume final de 12 µl: tampão da Taq polimerase 1X; MgCL₂ 1.5 mM; 100 µM de cada dNTP; 0.1 µM de cada *primer*; 10-50 ng de DNA genômico e 0.5 U de Taq polimerase (Invitrogen). Os seguintes ciclos de amplificação foram utilizados: desnaturação inicial 94°C por 3 minutos; seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 62°C por 45 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto; e extensão final a 72°C por 10 minutos. Os ensaios de PCR foram realizados no equipamento ProFlex™ PCR System (Life technologies), e o produto final checado em gel de agarose 1,5%.

Os produtos de PCR foram purificados com EXO-SAP, e em seguida realizado um PCR de sequenciamento, na qual as amostras foram marcadas com BigDYE, versão Terminator Cycle Sequencing Kit 3,1 (Applied Biosystems, Inc.). O sequenciamento foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), sediado

na UNESP, Campus de Jaboticabal, com o sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger), ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems).

3.2.2.3 *Análise estatística*

As sequências completas foram analisadas manualmente e alinhadas utilizando o programa CLUSTAW (Thompson et al., 1994) incluso no programa ARLEQUIN versão 3.01 (Excoffier et al., 2006) para identificação dos sítios polimórficos. Para as análises genético-populacionais foram calculadas as composições nucleotídicas, diversidade das sequências, número de sítios polimórficos e diversidade de haplótipos utilizando o programa DNAsp v.5. (Librado & Rozas, 2009).. A análise da Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) foi realizada para testar a heterogeneidade genética entre os haplótipos do mtDNA utilizando o programa ARLEQUIN versão 3.01 (Excoffier et al., 2006), que utiliza a estatística F de Wrigth's (1951, 1965). Foi estimada uma rede de haplótipos pelo Software Network v 4.6.1.0. Os dados obtidos foram comparados com análises das populações selvagens presentes no Capítulo 1.

3.2.3 **RESULTADOS**

3.2.3.1 *Análise de diversidade entre populações cultivadas*

Foram analisados 411 pb (pares de base) dos 149 indivíduos pertencentes às oito pisciculturas (PB1-PB4, PA1-PA4) e as matrizes do melhoramento genético. No total, foram encontrados 47 sítios polimórficos, que caracterizaram 34 haplótipos. Dentre os haplótipos encontrados, 5 são compartilhados entres os estoques, sendo que dois destes são compartilhados entre os plantéis brasileiros e argentinos, e os outros três somente entre os lotes brasileiros. Além disso, foram detectados 29 haplótipos exclusivos (Tabela 2), sendo que 13 estão nas pisciculturas argentinas (PA2 e PA3), 11

estão nas brasileiras (PB1, PB3e PB4) e 5 entre as matrizes do melhoramento (MA). O haplótipo mais representativo foi o H1, que corresponde também ao haplótipo mais frequente na população selvagem (H2, ver Cap. 1), com distribuição em todas as pisciculturas analisadas. Com relação aos haplótipos encontrados nas populações naturais, foi possível observar que as populações cultivadas compartilham 6 haplótipos com os indivíduos selvagens, sendo eles: H1, H2, H8, H10, H17 e H21. A porcentagem de bases entre os haplótipos correspondeu a: 28,5% Adenina (A), 33,4% Timina (T), 22,0% Citosina (C) e de 16,1% Guanina (G).

Tabela 2 Distribuição haplotípica entre as pisciculturas. Os haplótipos exclusivos estão em verde.

	PA1	PA2	PA3	PA4	PB1	PB2	PB3	PB4	MA	Total	%
H1	14	4	6	15	8	11	6	1	12	77	51,6
H2	2	1		1		2	2			8	5,3
H3		4								4	2,6
H4		1								1	0,6
H5		1								1	0,6
H6		1								1	0,6
H7		1								1	0,6
H8		1								1	0,6
H9						1				1	0,6
H10					6		1	10	4	21	14,0
H11							1			1	0,6
H12							2			2	1,3
H13							1			1	0,6
H14							1			1	0,6
H15					1		1			2	1,3
H16							1			1	0,6
H17					1			4		5	3,3
H18					1					1	0,6
H19					1					1	0,6
H20					1					1	0,6
H21								2		2	1,3
H22								1		1	0,6
H23			2							2	1,3
H24			1							1	0,6
H25			1							1	0,6
H26			1							1	0,6
H27			1							1	0,6
H28			1							1	0,6
H29			1							1	0,6
H30									1	1	0,6
H31									2	2	1,3
H32									1	1	0,6
H33									1	1	0,6
H34									1	1	0,6

Os índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípica (H_d) demonstraram dois padrões distintos de variabilidade genética, sendo observado lotes com alta e baixa diversidade genética. A maior diversidade haplotípica foi encontrada em PA2 ($H_d = 0,868$), e a menor diversidade em PA4 ($H_d = 0,125$). Já a diversidade nucleotídica foi maior em PA3 ($\pi = 0,01451$) e a menor em PA4 ($\pi = 0,00031$) (Tabela 3). De forma geral, a diversidade genética dos lotes cultivados foi alta, $H_d = 0,711$ e $\pi = 0,00660$,

quando comparada com estoques selvagens de referência (Cap. 1) ($H_{d\text{sel}} = 0,692$ e $\pi_{\text{sel}} = 0,00458$). Os plantéis das pisciculturas brasileiras ($H_d = 0,663$ e $\pi = 0,00665$) tiveram uma média de diversidade maior em relação as pisciculturas da Argentinas ($H_d = 0,512$ e $\pi = 0,00543$). As matrizes apresentaram valores similares de diversidade ao das populações naturais ($H_{d\text{ma}} = 0,684$ e $\pi_{\text{ma}} = 0,00463$). Algumas pisciculturas apresentaram valores de diversidade haplotípica abaixo dos encontrados nas populações naturais, como é o caso das pisciculturas PA1, PA4 e PB2. Entretanto, valores elevados às populações naturais também foram observados nas pisciculturas PA2, PA3 e PB3.

Tabela 3 Análises genéticas em indivíduos cultivados de *P.mesopotamicus* e em matrizes de melhoramento genético.

Pisciculturas	N	Nº Haplótipos	Hd	π
PA1	16	2	0,233	0,00058
PA2	14	8	0,868	0,00635
PA3	14	8	0,824	0,01451
PA4	16	2	0,125	0,00031
PB1	19	7	0,749	0,00666
PB2	14	3	0,385	0,00197
PB3	16	9	0,858	0,00910
PB4	18	5	0,660	0,00888
MA	22	7	0,684	0,00946
Todas	149	34	0,711	0,00660

N = número de indivíduos, Hd = Diversidade haplotípica π = diversidade nucleotídica

Para o cálculo da AMOVA, as populações foram agrupadas conforme a localidade das pisciculturas (Argentina e Brasil). Desta forma, foi possível observar que a maior variação genética é encontra dentro das populações (Tabela 4). O índice F_{ST} (que leva em consideração apenas a frequência haplotípica) indicou elevada estruturação genética entre as populações ($F_{ST} = 0,16647$), da mesma forma que o

índice Φ_{ST} (0,10503). Comparando com as populações naturais também foi possível observar estruturação genética entre eles ($F_{ST} = 0.14404$ e $\Phi_{ST} = 0,09901$; $p < 0,05$).

Tabela 4 Análise da variância molecular (AMOVA)

AMOVA			
	Componentes da variância	Porcentagem da variância (%)	* Φ_{ST}
Entre os grupos	-0,00170	-0,11	0,10503
Entre as populações dentro dos grupos	0,16898	10,61	
Dentro das populações	1,42544	89,50	
	Componentes da variância	Porcentagem da variância (%)	* F_{ST}
Entre as populações	-0,00293	-0,81	0,16647
Entre as populações dentro dos grupos	0,06307	17,46	
Dentro das populações	0,30111	83,35	

* Valores significativos $p < 0,05$

Ao analisar a matriz de F_{ST} entre as pisciculturas par-a-par (tabela 5), apesar de alguns valores não-significativos, foi possível observar que os lotes se encontram estruturados entre eles, indicando a formação de diferentes estoques genéticos nestes empreendimentos. Além disso, é observada a estruturação genética entre as pisciculturas e as localidades selvagens (Cap. 1) (tabela 6).

Tabela 5 Matriz dos índices de F_{ST} entre as pisciculturas analisadas

	PA1	PA2	PA3	PA4	PB1	PB2	PB3	PB4
PA1	-							
PA2	0,26794	-						
PA3	0,16316	*	-					
PA4	*	0,33289	0,22006	-				
PB1	0,21157	0,08325	*	0,26224	-			
PB2	*	0,18154	*	*	0,14254	-		
PB3	0,16825	*	*	0,23252	*	0,09090	-	
PB4	0,52235	0,22810	0,24352	0,57486	0,10752	0,44394	0,19801	-

* Valores não-significativos $p > 0,05$

Tabela 6 Tabela dos índices de F_{ST} entre as pisciculturas analisadas e as localidades selvagens

	Panorama	Ivinhema	Paso de la Patria	Goya
PA1	*	*	0,11012	*
PA2	0,16115	*	*	0,21028
PA3	0,06142	*	*	*
PA4	*	*	0,15098	*
PB1	0,10470	*	0,05182	0,15716
PB2	*	*	*	*
PB3	0,08411	*	*	*
PB4	0,38593	0,37465	0,24418	0,47113
MA	*	*	*	*

* Valores não-significativos $p > 0,05$

A rede de haplótipos (Figura 1) permitiu observar a distribuição dos haplótipos pelas pisciculturas analisadas, sendo o haplótipo H1 considerado ancestral, e o consequente estabelecimento dos demais haplótipos. Não houve um padrão de distribuição evidente dos haplótipos encontrados entre as pisciculturas do Brasil e Argentina.

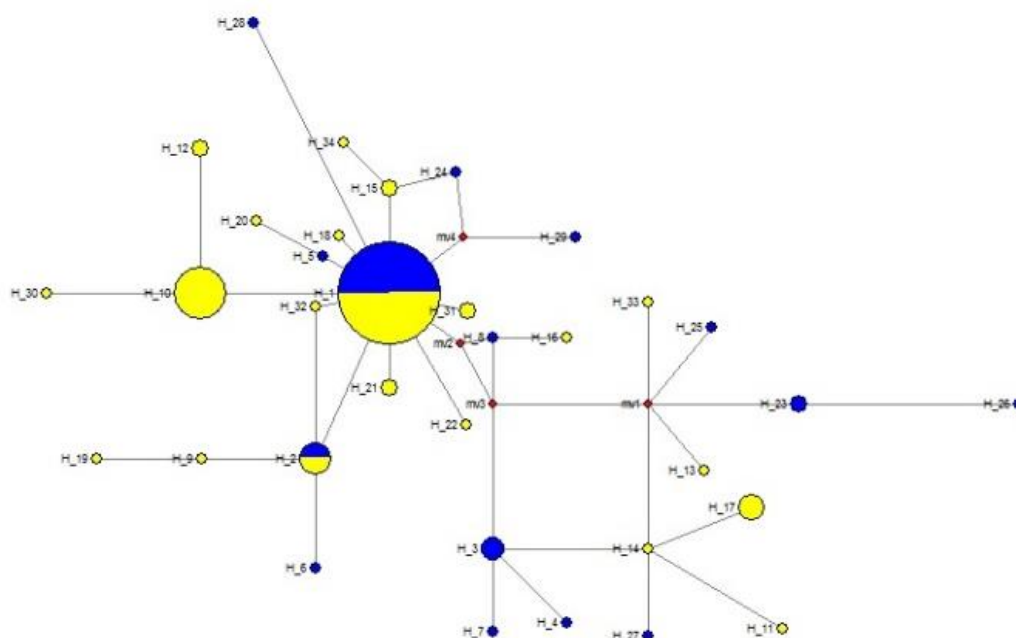


Figura 1 Rede de haplótipos em relação ao fluxo de haplótipos entre as pisciculturas. O tamanho do círculo é proporcional à frequência haplotípica. Em amarelo, pisciculturas brasileiras e, em azul, pisciculturas argentinas.

3.2.4 DISCUSSÃO

No presente trabalho, a avaliação dos níveis de diversidade genética em oito pisciculturas comerciais evidenciou a existência de diferentes graus de perfil genético. Dentre as oito pisciculturas, cinco (PA2, PA3, PB1, PB3 e PB4) apresentaram valores elevados de diversidade, enquanto que três (PA1, PA4 e PB2) tiveram baixos índices de variabilidade revelado pelo marcador de DNAm. Outros estudos com Serrasalmídeos de interesse comercial, como é o caso do *Colossoma macropomum* (tambaqui), têm demonstrado situações similares ao que foi detectado para o pacu do Brasil e Argentina, com dois distintos cenários: 1) produtores de alevinos fornecendo peixes com alto risco de endogamia (ou seja, baixa variabilidade genética, como reduzido número de haplótipos, número de alelos e heterozigosidade) (Gomes *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2016); 2) estoques de reprodutores que mantêm a diversidade genética característica de populações selvagens (Aguiar *et al.*, 2013).

A variabilidade genética em estoques cultivados é consequência de diferentes fatores, tais como: origem e número de reprodutores utilizados na formação dos plantéis, manejo reprodutivo, e índice de diversidade genética do estoque fundador (Moreira *et al.*, 2007). No presente estudo, sugere-se que os índices elevados de diversidade encontrados nas pisciculturas PA2, PA3, PB1, PB3 e PB4 podem estar relacionados particularmente ao fato destes lotes terem sido compostos por indivíduos selvagens de ambiente natural, pois, até o momento, produtores de pacu ainda não adotaram práticas corretas de manejo reprodutivo ou ferramentas moleculares para monitoramento genético dos estoques. Geralmente, devido à ausência de programas de melhoramento genético em peixes, a formação do estoque reprodutor é feita da captura de indivíduos selvagens, que servem inicialmente para a formação do plantel e, posteriormente, são selecionados para a formação do estoque reprodutor (Hiltsdorf &

Dergan, 1999). Portanto, o ideal é que o plantel de reprodutores cultivados tenha uma representação significativa de diversidade genética em relação às populações selvagens.

Por outro lado, os baixos valores detectados nas pisciculturas PA1, PA4 e PB2 podem estar associados aos seguintes fatores: formação de lotes de reprodutores a partir de estoques já endogâmicos, renovação do plantel com indivíduos F1 e pós-F1, desconhecimento da origem dos animais e baixo número de reprodutores para constituição do estoque fundador. Além disso, por possuir desova total e alta prolificidade, como é o caso do pacu, os produtores não se preocupam com o número efetivo de fêmeas usadas durante a reprodução e, por práticas errôneas de manejo ou falta de espaço/estrutura, são acasaladas com poucos machos. Desta forma, destaca-se que tais práticas inviabilizam a diversidade genética e levam à depressão por endogamia (Hiltsdorf & Dergan, 1999).

Adicionalmente, observa-se que os estoques de reprodutores das pisciculturas da Argentina apresentaram menor diversidade genética. Além dos fatores mencionados acima, esta situação também pode ser explicada pela diferença histórica do cultivo de pacu dos dois países, pois a produção de pacu na Argentina, iniciada nos anos 2000, é mais recente que a do Brasil, cujo começo foi na década de 1980. Esta maior experiência da piscicultura brasileira pode ter permitido a adoção de melhores práticas de manejo genético, como a renovação adequada de plantéis, que resultam em níveis mais altos de diversidade genética.

Diante de um cenário de baixa variabilidade genética, um dos principais problemas enfrentados pelos piscicultores é a depressão por endogamia, que afetam diretamente as gerações seguintes do plantel. De forma geral, a união entre indivíduos que possuem níveis próximos de parentesco levam à formação de fenótipos alterados, com baixa viabilidade ou até mesmo letais que afetam características de interesse

econômico, tais como, ganho de peso, características reprodutivas, resistência a doenças, entre outros (Freitas *et al.*, 2014). Como exemplo, em trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), os diferentes graus de depressão endogâmica afetaram de forma significativa o percentual de eclosão, fecundidade e sobrevivência larval, além de gerar indivíduos com deformidades morfológicas (Yousefian & Nejati, 2008).

Embora esforços para que a diversidade genética dos plantéis seja controlada, a perda de variabilidade é inevitável, sendo que a sua recuperação ocorre somente por meio da introdução de um novo material genético (Yokota *et al.*, 2003; Sakeno *et al.*, 2004). Uma estratégia para aumentar a diversidade genética e melhorar o potencial aquícola seria a composição de diferentes haplótipos durante a formação das famílias, o que poderia elevar a diversidade e, conseqüentemente, evitar altas taxas de endogamia. Além disso, devido aos prejuízos que podem acarretar para os produtores de peixes, há uma imediata necessidade para o monitoramento da variabilidade genética dos plantéis de reprodutores. Com a informação do perfil genético, em conjunto com práticas adequadas de manejo genético, pode-se reduzir e até evitar os principais problemas genéticos resultantes do uso inadequado de animais em sistemas de produção.

Por fim, embora haja alguns valores não-significativos, os dados obtidos pela análise da variância molecular (AMOVA) indicaram a existência de alta estruturação genética entre os diferentes estoques das pisciculturas analisadas do Brasil e Argentina. Esta diferenciação genética pode estar relacionada com a formação dos plantéis a partir de animais selvagens de distintas localidades ou origens (ex., Brasil/Alto Rio Paraná e Argentina/Baixo Rio Paraná), pois há indícios genéticos de que as populações naturais de pacu estão estruturadas ao longo da bacia do Rio Paraná ou entre as bacias do Paranapanema/Paraguai (Calcagnotto & Desalle, 2009; Capítulo 1). Os dados do presente estudo também fornecem importantes marcadores para a rastreabilidade

genética dos produtos resultantes do processo de melhoramento genético, especialmente dos haplótipos exclusivos detectados nesta população base inicial, o que posteriormente permitirá identificar suas progênies como produtos oriundos de melhoramento genético. Além disso, em termos de composição genética do programa de pré-melhoramento, verificou-se que esta população base teve níveis de variabilidade compatíveis com estoques selvagens, com alta diversidade haplotípica e nucleotídica, o que reduzirá os problemas decorrentes do estreitamento da base genética ou perda do potencial genético ao longo das várias gerações de seleção. Os resultados genéticos deste estudo geraram um maior conhecimento do genoma mitocondrial dos estoques cultivados de pacu e, de forma aplicada, forneceram subsídios para o desenvolvimento de programas de manejo e melhoramento genético desta espécie.

3.2.5 REFERÊNCIAS

- AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall., New York, 1994.
- BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.S.; LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: Manual de identificação**. Brasília. EMBRAPA, 2007. 227p.
- CALCAGNOTTO D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.245-247, 2001
- CALCAGNOTTO, D. & DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**. v.7, p.607-616, 2009.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. 2006.

- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E. & QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance in ferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p.479-491, 1992.
- FAO, 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. FAO. Rome, Italy.
- FLORES NAVA, A. Aquaculture seed resources in Latin America: a regional synthesis. In: FAO Fisheries Technical Paper No 501. Assessment of freshwater fish resources for sustainable aquaculture. Bondad-Reantaso MG (ed). 2007
- FREITAS, R.T.F.; HILSDORF, W.S.; GONÇALVES, A.C.S.; MOREIRA, H.L.M. O que é endogamia e como controlá-la. **Panorama da Aquicultura**. v.24, p. 42-53, 2014.
- GODOY, M. P. Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do Rio Mogi-Guaçu. **Revista Brasileira de Biologia**, n. 27, p. 1-12, 1967.
- HILSDORF, A.W.S. & DERGAM, J.A. Depressão por endogamia: somente uma terminologia genética ou um fato na aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, v.9, p.34-36, 1999.
- HONGLANG, H., 2007. Freshwater fish seed resources in China. In: Bondad-Reantaso, M.G., FAO Fisheries Technical Paper. Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. Rome, Italy, p. 628.
- IBGE (2016) Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio de Janeiro: **Produção da Pecuária Municipal**, 2015. v. 43
- JONAS AGUIAR¹, J.; SCHNEIDER,.; GOMES, F.; CARNEIRO, J.; SANTOS, S.; RODRIGUES, L.R. & SAMPAIO, I. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.85, n.4, p 1439-1447, 2013.

journal. v.29, p.478-489, 2013.

LIBRADO, P & ROZAS, J., DnaSP v.5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25 p. 1451-1452. 2009.

LOPES, T.S; STREIT JR; RIBEIRO., R.P., POVH, J.A. et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.728-735, 2009.

MELO, D.C.; OLIVEIRA, D.A.A.; RIBEIRO, L.P. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, p.87-93, 2006.

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

PANNÉ HUIDOBRO, S. 2015. Producción por Acuicultura en Argentina en el 2015. Informe de la Dirección de Acuicultura Dirección Nacional de Planificación Pesquera Subsecretaría de Pesca y Acuicultura Ministerio de Agroindustria. Disponível em <http://www.agroindustria.gob.ar/site/pesca/acuicultura/06_Publicaciones/_archivos/160526_Producci%C3%B3n%20por%20Acuicultura%20en%20Argentina%20durante%20el%20a%C3%B1o%202015.pdf>

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; STREIT JR, D.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS L.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Genetic diversity of pacu from the Paranapanema River and from the broodstock of a stock enhancement program. **Pesquisa agropecuária brasileira**., Brasília, v.43, n.2, p.201-206, 2008.

- RIBEIRO, R.P.; SANTOS, S.C.A.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; OLIVEIRA, S.N.; ALEXANDRE-FILHO, L.; VARGAS, L.; GOES, E.S.R.; CASTRO, P.L.; POVEDA PARRA, A.R. Genetic diversity of pacu for restocking programs in the Tietê and Grande Rivers, Brazil. **Semina: ciências agrárias**. v.36, p.2807-3826, 2015.
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; SANTOS, S.C.A.; VARGAS, L.; STREIT JR, D.P.; RIBEIRO, R.P. Genetic diversity of *Piaractus mesopotamicus* (Characiformes: characidae) broodstocks using in the restocking program of Tiete River, Brazil. **Bioscience**
- SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L. & FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, n. 71, p. 33-44, 2007.
- SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M. et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v.233, p.163-172, 2004.
- THOMPSON J. D.; HIGGINS D. G.; GIBSON T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.
- URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: BALDISSEROTTO B. & GOMES L.C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: ED. da UFSM. 2005. p. 468.
- VALLADÃO, G.M.R.; GALLANI, S.U.; PILARSKI, F. South American fish for continental aquaculture. **Reviews in Aquaculture**. 2016.

- WRIGHT, S. Variability within and among natural populations, v. 4. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.
- YOKOTA, M.; HARADA, Y.; IIZUKA, M. Genetic drift in a hatchery and the maintenance of genetic diversity in hatchery-wild systems. **Fisheries Science**, v.69, p.101-109, 2003.
- YOSEFIAN, M. & NEJATI, A. Inbreeding depression by family matching in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.3, p.384-391, 2008.

4 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

- A região controle (CR) do DNA mitocondrial se mostrou eficiente para avaliar os níveis de diversidade do pacu nas populações selvagens e cultivadas
- As populações selvagens se apresentaram estruturadas e com diversidade genética moderada
- As barragens hidrelétricas e a sobrepesca podem ser fatores que estejam influenciando a diversidade genética desta espécie na Bacia do rio Paraná
- Antigas barreiras naturais (*Salto del Guaira*) pode ter influenciado a estrutura genética do pacu na bacia do Rio Paraná
- As populações cultivadas de pacu apresentaram diferentes padrões de diversidade genética
- De forma geral as populações cultivadas e as matrizes de melhoramento apresentaram valores próximos de diversidades às populações naturais
- Os plantéis se encontraram com alta estruturação genética entre eles, e entre as populações selvagens
- As diferentes práticas de manejo podem estar influenciando a diversidade genética dos lotes cultivados do pacu

