

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Dissertação

**Caracterização genética de duas populações de *Rhamdia quelen* através da
utilização de marcadores microssatélites**

Suzane Fonseca Freitas

Pelotas, 2017

Suzane Fonseca Freitas

**Caracterização genética de duas populações de *Rhamdia quelen* através
da utilização de marcadores microssatélites**

Dissertação apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Zootecnia da
Universidade Federal de Pelotas,
como requisito parcial à obtenção do
título de Mestre em Zootecnia.

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F863c Freitas, Suzane Fonseca

Caracterização genética de duas populações de Rhamdia quelen através da utilização de marcadores microsatélites / Suzane Fonseca Freitas ; Nelson José Laurino Dionello, orientador. — Pelotas, 2017.

82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Marcadores microsatélites. 2. Rhamdia quelen. 3. Melhoramento genético. I. Dionello, Nelson José Laurino, orient. II. Título.

CDD : 639.1

Suzane Fonseca Freitas

Caracterização genética de duas populações de *Rhamdia quelen* através da utilização de marcadores microssatélites

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2017

Banca examinadora:

.....
Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello (Orientador)
Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....
Prof. Dr. Heden Luis Marques Moreira
Doutor em Genética pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Juvêncio Luis Fernandes Pouey
Doutor em Produção Animal pela Universidad de Zaragoza

.....
Dra. Carla Ávila Giovani Moreira
Doutora em Genética pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dedico este trabalho à minha família; minha mãe

Dulce, meu pai Gilnei, minhas irmãs Priscila, Daiane e Stefane, e minha avó Cleusa

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pois sem a fé que tenho depositado n'Ele, eu nada seria.

Aos meus pais, pela educação, valores e por terem me ensinado a andar; a vocês que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos para que eu pudesse realizar o meu, partilho com vocês a alegria deste momento.

As minhas irmãs e demais familiares que com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Aos professores Nelson José Laurino Dionello, Sérgio Renato Noguez Piedras, Rafael Aldrighi Tavares, Heden Luis Marques Moreira e Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey, pelos infindáveis ensinamentos concedidos, por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e efetividade da educação no processo de formação profissional, por tanto que dedicaram-se a mim, não somente por me ensinarem, mas por me fazerem aprender.

Aos colegas de Laboratório pelo convívio, apoio, compreensão e, sobretudo amizade.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, deixo aqui o meu sincero agradecimento.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade

continua misterioso diante de meus olhos.”

Isaac Newton

Resumo

FREITAS, Suzane Fonseca. **Caracterização genética de duas populações de *Rhamdia quelen* através da utilização de marcadores microssatélites.** 2017. 82f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O jundiá *Rhamdia quelen* destaca-se como uma espécie nativa de interesse econômico para região sul do Brasil, sendo a mesma apontada como promissora candidata para inserção em programas de melhoramento genético. O sucesso da implementação de programas de melhoramento está embasado na formação da população base, onde deve-se atentar para a variabilidade genética dos plantéis formadores e que normalmente são oriundos de populações selvagens. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar geneticamente duas populações naturais de jundiás oriundos das lagoas Mirim e Mangueira a fim de subsidiar estudos que visem efetivamente o melhoramento genético desta espécie em questão. Foram capturados 40 animais de cada lagoa, onde foram coletadas duas fontes de material biológico de cada peixe (fragmento de tecido muscular e nadadeira caudal). A extração de DNA genômico foi realizada mediante um protocolo de extração de DNA genômico *in house* e de baixo custo nas duas populações alvo, bem como aferida a eficiência do protocolo nas duas fontes de material biológico coletadas. Foram selecionados 8 *loci* microssatélites específicos da espécie para amplificação via PCR, tendo como critério de escolha dos mesmos a existência de motivo de repetição unicamente tetranucleotídeo, seguindo a tendência de análise forense internacional (ISFG), que aponta o motivo como o mais robusto e confiável para análises de cunho genético. O protocolo de extração mostrou-se eficaz para ambas fontes de material biológico, apresentando amostras com DNA íntegro, sem indicativos de degradação, excesso proteico ou contaminação. De igual forma, os 8 *loci* selecionados amplificaram para as duas populações de estudo, com amplicons de boa qualidade, sendo os mesmos adequados para utilização como ferramenta na análise genética do jundiá, visando seu melhoramento.

Palavras-chave: marcadores microssatélites; melhoramento genético; *Rhamdia quelen*

Abstract

FREITAS, Suzane Fonseca. **Genetic characterization of two populations of *Rhamdia quelen* through the use of microsatellite markers.** 2017. 82f. Post-Graduate Program in Animal Science. Federal University of Pelotas, Pelotas – RS.

The catfish *Rhamdia quelen* stands out as a native species of economic interest for the southern region of Brazil, being the same one indicated as promising candidate for insertion in programs of genetic improvement. The success of the implementation of breeding programs is based on the formation of the base population, where one must pay attention to the genetic variability of the breeding stock and which usually come from wild populations. Therefore, the objective of this study was to genetically evaluate two natural populations of catfish from the Mirim and Mangueira lagoons in order to subsidize studies that effectively aim at the genetic improvement of this species. A total of 40 animals were collected from each pond, where two sources of biological material were collected from each fish (fragment of muscle tissue and caudal fin). The extraction of genomic DNA was carried out by means of an *in house* and low cost genomic DNA extraction protocol in the two target populations, as well as the efficiency of the protocol in the two sources of biological material collected. Eight microsatellite specific loci of the species were selected for PCR amplification, with the criterion of their choice being the existence of a motif of tetranucleotide repeat, following the trend of international forensic analysis (ISFG), which points to the motif as the most robust and reliable for genetic analyzes. The extraction protocol was effective for both sources of biological material, presenting samples with good quality DNA, without indicative of degradation, protein excess or contamination. Likewise, the 8 selected *loci* amplified for the two study populations, with good quality amplicons, being the same ones suitable for use as a tool in the genetic analysis of catfish, aiming at its improvement.

Keywords: genetic improvement; microsatellite markers; *Rhamdia quelen*.

Lista de Figuras

Figura 1 - Exemplar de jundiá <i>Rhamdia quelen</i>	37
Figura 2 - Localização Lagoa Mangueira.	47
Figura 3 - Localização da Lagoa Mirim.	48
Figura 4 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de tecido muscular de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	51
Figura 5 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de nadadeira caudal de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	51
Figura 6 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de tecido muscular de jundiás oriundos da Lagoa Mirim.	51
Figura 7 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de nadadeira caudal de jundiás oriundos da Lagoa Mirim.....	52
Figura 8 - Amplificação do locus Rq137981 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	52
Figura 9 - Amplificação do locus Rq137981 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim. ..	53
Figura 10 - Amplificação do locus Rq155485 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira	53
Figura 11 - Amplificação do locus Rq155485 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim .	54

Figura 12 - Amplificação do locus Rq158947 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	54
Figura 13 - Amplificação do locus Rq158947 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.	55
Figura 14 - Amplificação do locus Rq164109 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	55
Figura 15 - Amplificação do locus Rq164109 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.	56
Figura 16 - Amplificação do locus Rq193810 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	56
Figura 17 - Amplificação do locus Rq193810 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.	57
Figura 18 - Amplificação do locus Rq51373 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	57
Figura 19 - Amplificação do locus Rq51373 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim. ..	58
Figura 20 - Amplificação do locus Rq68040 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira	58
Figura 21 - Amplificação do locus Rq68040 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim. ..	59
Figura 22 - Amplificação do locus Rq193399 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.	59
Figura 23 - Amplificação do locus Rq193399 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.	60
Figura 24 - Localização das lagoas Mangueira e Mirim	65
Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo extrações de DNA genômico a partir de tecido muscular (A) e nadadeira caudal (B) de jundiás oriundos	

da Lagoa Mangureira.	68
Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo extrações de DNA genômico a partir de tecido muscular (A) e nadadeira caudal (B) de jundiás oriundos da Lagoa Mangureira.	68
Figura 27 - Amplificação do <i>locus</i> Rq137981 nas duas populações de estudo.	68
Figura 28 - Amplificação do <i>locus</i> Rq155485 nas duas populações de estudo.	69
Figura 29 - Amplificação do <i>locus</i> Rq158947 nas duas populações de estudo.	69
Figura 30 - Amplificação do <i>locus</i> Rq164109 nas duas populações de estudo.	69
Figura 31 - Amplificação do <i>locus</i> Rq193810 nas duas populações de estudo.	70
Figura 32 - Amplificação do <i>locus</i> Rq51373 nas duas populações de estudo.	70
Figura 33 - Amplificação do <i>locus</i> Rq68040 nas duas populações de estudo.	70
Figura 34 - Amplificação do <i>locus</i> Rq193399 nas duas populações de estudo.	71

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Sequências e temperaturas de anelamento dos primers e sequência motif.
.....50

Tabela 2 - Sequências e temperaturas de anelamento dos primers e sequência motif.
.....67

Lista de Abreviaturas e Siglas

<i>AFLP</i>	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
<i>ASA</i>	<i>Amplified Specific Amplicon</i>
<i>DNA</i>	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<i>FAO</i>	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
<i>IBAMA</i>	<i>Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis</i>
<i>MPA</i>	<i>Ministério da Pesca e Aquicultura</i>
<i>OGM</i>	<i>Organismo Geneticamente Modificado</i>
<i>OMS</i>	<i>Organização Mundial da Saúde</i>
<i>RAPD</i>	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
<i>RFLP</i>	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
<i>SCAR</i>	<i>Sequence Characterized Amplified Regions</i>
<i>SSR</i>	<i>Simple Sequence Repeats</i>
<i>VNTR</i>	<i>Variable Number of Tandem Repeats</i>

Sumário

1.	Introdução	15
2.	Revisão da Literatura	17
2.2.	Status da Produção Aquícola Nacional	19
2.3.	Genética	20
2.4.	Melhoramento Genético Animal	22
2.5.	Genética Molecular.....	24
2.6.	Marcadores Moleculares	25
2.7.	Marcadores Microsatélites	26
2.7.1.	Uso de Marcadores Microsatélites na Aquicultura.....	28
2.8.	Variabilidade genética de populações.....	30
2.8.1.	Análise da variabilidade genética	31
2.8.1.1.	Polimorfismo.....	31
2.8.1.2.	Heterozigose	31
2.8.1.3.	Diversidade alélica	32
2.8.1.4.	Estatística F.....	32
2.8.1.5.	Equilíbrio de Hardy-Weinberg	32
3.	Projeto de Pesquisa	34
3.1.	Caracterização do problema	35
3.1.1.	Caracterização da espécie a ser estudada	37
3.2.	Objetivos	38
3.2.1.	Objetivos geral	38
3.2.2.	Objetivo específico	38
3.3.	Metodologia	38
3.4.	Resultados e impactos esperados.....	41
3.5.	Cronograma do projeto.....	42
3.6.	Outros projetos e financiamentos.....	43
3.1.	Aspectos éticos	44
	Referências bibliográficas.....	44

4	Relatório do Trabalho de Campo	46
4.1.1.	Lagoa Mangueira.....	46
4.1.2.	Lagoa Mirim.....	47
4.2.	Coleta dos animais	48
4.3.	Extração de DNA.....	49
4.4.	Amplificação dos Microssatélites.....	49
4.5.	Análise dos dados	50
5	Artigo submetido a Revista Ciência Agronômica.....	61
	RESUMO -.....	61
	ABSTRACT-	62
	INTRODUÇÃO	62
	MATERIAL E MÉTODOS	64
	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS	72
6	Considerações Finais	75
	Referências	76

1. Introdução

Dispondo de aproximadamente 12% de toda água doce disponível no planeta, litoral que ultrapassa 8 mil quilômetros de extensão e faixa marítima correspondente ao tamanho da Amazônia, o Brasil detém todas as prerrogativas necessárias para despontar como uma potência aquícola mundial.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations* - FAO) no ano de 2000 foram registrados cerca de 35 milhões de empregos nos setores da produção primária de pesca e aquicultura, sendo 65% relacionados à pesca marítima, 15% referentes à pesca continental e 20% na aquicultura (FAO, 2006).

Segundo dados divulgados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), no ano de 2011 o consumo médio de pescado no país alcançou a marca recorde de 11,17 Kg por habitante/ano, com expressivo crescimento de 14,5% em relação ao ano anterior. Com base nos números divulgados, é válido supor que atualmente os brasileiros consomem pescado na média anual mínima recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é equivalente a 12 kg de pescado por habitante. Este acentuado acréscimo de consumo não se restringe somente ao Brasil, como têm sido uma tendência mundial; fato este que pode ser atribuído pela incessante busca de alimentos mais saudáveis, e o pescado supre perfeitamente as novas exigências do mercado consumidor.

Como perspectiva futura, espera-se que no ano de 2030 a demanda internacional aumente em mais de 100 milhões de toneladas anuais, considerando-se que a produção média atual é de 154 milhões de toneladas. Segundo relatório publicado pela FAO, o Brasil tem capacidade de assumir 20% da demanda esperada para os próximos anos, mas para que isto ocorra é necessário tecnificação no concernente as formas de captura destes animais, evitando-se desta forma o esgotamento dos recursos pesqueiros, sendo a aquicultura uma excelente alternativa. Países detentores de grandes reservas de água e terra, associada a uma abundância de espécies aquícolas nativas, são promissores celeiros para o desen-

volvimento da aquicultura. Países como o Brasil, que necessitam de maior desenvolvimento e organização da cadeia produtiva, bem como adaptação tecnológica às condições locais, onde as instituições de pesquisa e o setor público devem trabalhar de forma conjunta, para o fortalecimento deste segmento produtivo (TAVARES, 2010).

A genética da conservação desenvolveu-se no início da década de 1980, objetivando apoiar a aplicação das análises genéticas moleculares em problemáticas conservacionistas das espécies. Em decorrência da crescente demanda de pescado e conseqüentemente aumento da captura de diversos recursos aquícolas, a comercialização desses produtos tem sido permeada por diversas medidas legais ao redor do mundo no sentido de regulamentar, fiscalizar e identificar corretamente as espécies de peixes provenientes da captura comercial (DOMINGUES, 2011).

As pesquisas em genética de populações de peixes têm sido determinantes para elucidações relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, abordando questões desde sua origem bem como de características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (PARKER *et al.*, 1998; SUNNUCKS, 2000). Esses estudos são de grande importância no que diz respeito a elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, em especial ao papel desempenhado pelas variações ao nível do genoma em resposta às mudanças ambientais, particularmente àquelas de origem antropogênica.

Neste contexto, a biologia molecular tem sido a ferramenta mais utilizada para estudos genéticos, onde a mesma tem acumulado avanços importantes, desenvolvendo técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA, em adição à descoberta de variados marcadores moleculares aplicáveis as mais diversas problemáticas encontradas no estudo de populações, da mesma forma que a elaboração de análises estatísticas que visam desde a estimação do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e esclarecer questões de parentesco.

2. Revisão da Literatura

2.1. Status da Produção Aquícola Mundial

Segundo dados divulgados pela FAO (2016), o abastecimento mundial de peixe *per capita* atingiu a marca recorde de 20 kg em 2014, devido principalmente ao crescimento do setor aquícola, que pela primeira vez ultrapassou a pesca extrativista no fornecimento de toda demanda de peixes direcionada a alimentação humana.

Confrontada com a estagnação da pesca extrativista em virtude das questões relativas a gestão sustentável da atividade e conservação dos estoques pesqueiros, a aquicultura constitui a alternativa mais viável para suprimir a demanda do mercado consumidor.

Considerando que a atividade forneceu apenas 7% da produção piscícola para consumo humano em 1974, nas últimas décadas a aquicultura tem apresentado um crescimento bastante expressivo, saltando para um incremento de 26% no ano de 1994 e 39% em 2004.

Este acentuado crescimento deve principalmente à China, que tem desempenhado um papel primordial para o desenvolvimento do setor, representando mais de 60% da produção mundial de peixes oriunda da aquicultura. Contudo, outros países também estão beneficiando-se com este crescimento, visto que a demanda de pescado para consumo humano duplicou desde 1995. Da mesma maneira, com a gradativa consolidação da produção, o setor tem apresentado um crescimento exponencial nas últimas cinco décadas, com uma taxa anual média de 3,2% ao ano no período 1961 a 2013 superando a taxa de crescimento populacional anual, que é de 1,7%.

Peixes e demais produtos oriundos da aquicultura representam uma fonte valiosa de proteínas e micronutrientes essenciais para uma boa nutrição. Em 2009, os peixes representaram 16,6% da ingestão mundial de proteína animal e 6,5% de

todas variantes de proteínas consumidas.

O número de espécies registradas na FAO referente as estatísticas de produção aquícola elevaram-se para 541 espécies e grupos de espécies em 2010, incluindo 327 peixes ósseos, dentre eles 5 híbridos, 102 moluscos, 62 crustáceos, 6 anfíbios, 9 répteis e 35 invertebrados aquáticos ou algas. Este aumento reflete melhorias na coleta de dados e emissão de relatórios em nível nacional e internacional, bem como a criação de novas espécies, incluindo híbridos. Tendo em vista o elevado grau de agregação de espécies relatados por muitos países, estima-se que produção aquícola mundial utiliza cerca de 600 variedades de peixes e algas aquáticas.

Espécies aquáticas exóticas têm sido amplamente introduzidas e usadas para produção em massa na aquicultura, sendo o seu uso bastante comum especialmente em países asiáticos. A exemplo disto, destacam-se estirpes exóticas que têm sido bem sucedidas em sistemas aquícolas, como as tilápias oriundas da África (especialmente a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus*), carpas chinesas (carpa prateada - *Hypophthalmichthys molitrix*, carpa cabeça grande- *Anstichtys nobilis* e carpa capim *Ctenopharyngodon idella*), Salmão do Atlântico (*Salmo salar*), bagres *Pangasius* (*Pangasius spp.*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*).

Mensurando por produção, a espécie camarão perna-branca *Litopenaeus vannamei* configura como a variedade de crustáceo marinho mais bem-sucedida na aquicultura. Em 2010, foi responsável por 71,8% da produção mundial total de variedades de camarão marinho cultivadas, dos quais 77,9% foram produzidos na Ásia (sendo o restante em seu continente nativo, a América), considerando que alguns países mantem a proibição de criação desta espécie exótica.

Uma parte significativa da produção global de moluscos marinhos, designadamente da Europa e América, conta com a amêijoia japonesa amplamente introduzida (*Ruditapes philippinarum*), também conhecida como Manila clam, e ostra (*Crassostrea gigas*). Atualmente, a China possui produção em larga escala da vieira do atlântico (*Argopecten irradians*) e vieira yesso (*Patinopecten yessoensis*).

Um número considerável de híbridos, mais notavelmente de peixes, está sendo implantados na aquicultura, especialmente em países com um nível relativamente alto de desenvolvimento e domínio de tecnologias auxiliares da atividade. Híbridos comercialmente cultivadas incluem: esturjões (originário do cruzamento entre beluga

Huso huso x starlet *Acipenser ruthenus*) na Ásia e Europa; *Carassius spp.*, snakeheads e garoupas na China; *Characins* na América do Sul; e bagres de água doce (*Clarias gariepinus* e *Heterobranchus longifilis*) na África e Europa.

A inserção de tilápias híbridas em sistemas de cultivo é uma prática recorrente no cenário aquícola mundial, sendo o cruzamento mais comum entre *Oreochromis aureus* x *O. niloticus*, onde os animais originários deste cruzamento apresentam alta porcentagem de descendência masculina.

Cinco variedades híbridas de peixes ósseos foram registrados pela FAO com estatísticas de produção em 2010 sendo eles: 333.300 t de tilápia do Nilo híbrida (*Oreochromis aureus* x *O. niloticus*) na China e no Panamá, 116.900 t de *catfish* (*Clarias gariepinus* híbrido x *C. macrocephalus*) na Tailândia, 21.600 t de tambacu (*Piaractus mesopotamicus* x *Colossoma macropomum*), 4.900 toneladas de tambatinga (*Colossoma macropomum* x *Piaractus brachypomus*) ambos no Brasil e 4.200 t de robalo (*Morone chrysops* x *M. saxatilis*) nos Estados Unidos da América, Itália e Israel.

2.2. Status da Produção Aquícola Nacional

A aquicultura é uma atividade que vem crescendo acentuadamente desde a década de 70 no Brasil. Segundo dados gerados pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA (2007), o setor aquícola encontra-se em franca expansão desde 1998. Algumas espécies ocupam posição de destaque no Brasil e no mundo, como a Tilápia (*Oreochromis niloticus*), a Truta (*Oncorhynchus mykiss*), o Salmão (*Salmo salar*) e o camarão (*Litopenaeus vannamei*). Segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura, a aquicultura consiste no setor agropecuário de maior crescimento nos últimos anos, onde a mesma desempenha importante papel na economia e segurança alimentar mundial.

O desenvolvimento da atividade aquícola é de vital importância para a manutenção dos estoques pesqueiros, possibilitando a redução da pressão ambiental acerca das variedades obtidas por meio da pesca extrativista que tem promovido a

redução da biodiversidade e quantidade de diversas espécies nativas, sendo a criação de variedades aquícolas em cativeiro um dos caminhos para o aumento da produção e conseqüentemente oferta de tais produtos para o consumo humano.

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, no ano de 2013 todas as 27 Unidades da Federação e 2.618 municípios apresentaram informações sobre algum dos produtos da aquicultura. O valor total da produção foi de R\$ 3,055 bilhões, sendo a criação de peixes a mais representativa dentre os produtos investigados, representando 66,1% da produção e logo após destaca-se o cultivo de camarões, com 25,0% do valor total da produção nacional.

A região brasileira de maior produção piscícola no ano de 2013 foi a centro-oeste, totalizando 105 010 t, seguida da região sul com 88 03 t, nordeste com 76 393 t, norte apresentando 72.969 t e por fim a região sudeste que produziu 50 058 t.

Os estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul, lideraram a produção de camarões no país com incremento de 302 t para o setor, logo após configura a região nordeste com aproximadamente 64 t, a sudeste com 58 t e por último a norte com 40 t.

A malacocultura, por sua vez, obteve maior êxito no sudeste com 181 t, após a região nordeste com 87 t e finalmente as regiões sul e norte com 19.083 e 8 t respectivamente.

2.3. Genética

O biólogo inglês William Bateson, em 1906 definiu a genética como a ciência que lida com a herança e a variação, procurando estabelecer leis que governam similaridades e diferenças em indivíduos relacionados por descendência, sendo o alvo específico da genética animal o estudo dos princípios da herança nos animais (ELER, 2014).

A genética fundamenta-se no estudo de dois fenômenos distintos: a hereditariedade e a variação. A hereditariedade consiste no processo biológico no qual os descendentes (geração filial) se assemelham aos seus ascendentes (geração parental), processo este que só é possível devido ao fato que a expressão fenotípica

dos diferentes caracteres é passada de pais para filhos por meio dos gametas.

Em contrapartida, a variação diz respeito a todas alterações ambientais e/ou genéticas existentes entre os organismos relacionados por intermédio da descendência. Logo, as variações existentes entre os seres vivos podem ser oriundas exclusivamente do meio, sendo, por conseguinte não hereditárias, como da mesma forma, podem ser ocasionadas por alterações na constituição genética, sendo de origem hereditária (RAMALHO et al, 2012).

Em suma, a hereditariedade e a variação são forças antagônicas visto que, a hereditariedade está relacionada com a semelhança entre os indivíduos no transpassar das gerações e a variação faz com que os mesmos sejam distintos.

Porém, observa-se que estas duas forças apesar de serem antagônicas ao mesmo tempo tornam-se complementares para a manutenção da seleção genética, promovendo o melhoramento e evolução dos indivíduos (RAMALHO et al, 2012; ELER, 2014).

Evidências apontam que há 10 mil anos atrás o homem já se preocupava com a seleção de plantas e animais para sua sobrevivência, evidenciando que mesmo de forma empírica o estudo da genética já despertava a atenção do ser humano.

Ao longo da história, inúmeras hipóteses foram formuladas objetivando explicar e entender de forma concisa o mecanismo de transmissão das características hereditárias ao longo do tempo. Todavia, a genética recebeu seu maior impulso somente no século XX, quando os três pesquisadores De Vries, Correns e Tschermak comprovaram que a teoria proposta pelo monge agostiano Gregor Mendel em seus experimentos com ervilhas realizados no final do século XIX era de fato verdadeira; nascia então as três leis de Mendel que tangem os princípios da hereditariedade, consagrando Mendel como o “pai da genética”.

Em virtude deste grande avanço, a genética é conhecida como a ciência do século XX, sendo, portanto, um campo de estudo relativamente novo, porém apresenta uma evolução espetacular, sobretudo por despertar a atenção de vários ramos do conhecimento humano. Calcula-se que o período requerido para dobrar o conhecimento científico é de aproximadamente dez anos, sobretudo reduz-se pela metade para as ciências biológicas e, no caso específico da genética, abrevia-se para pouco mais de um ano (RAMALHO et al, 2012).

2.4. Melhoramento Genético Animal

O melhoramento genético animal teve início com a domesticação animal, prática milenar que já era realizada antes mesmo da escrita. Conjetura-se que provavelmente tenha ocorrido no final do período paleolítico (idade da pedra lascada) ou princípios do neolítico (idade da pedra polida), embora tenha havido variações entre os diferentes povos ao redor do mundo (ELER, 2014; TAVARES, 2010).

Sabe-se que os métodos de seleção genética foram aplicados aos animais domesticados objetivando características comportamentais favoráveis, tendo como início a seleção de cães que apresentassem afinidade ao homem. Posteriormente, ocorreu a seleção de equinos, visando animais aptos para o transporte de cargas e pessoas, bem como bovinos, ovinos e suínos.

De acordo com Van Vleck (1987), o "melhorista animal" tem como enfoque principal a utilização eficiente dos registros produtivos disponíveis, tendo como escopo a maximização da produção.

O uso de registros produtivos como alicerce para a implantação de estratégias de melhoramento data do início do século XVIII, com o agricultor Robert Bakewell, também chamado de "pai do melhoramento animal". O sucesso de Bakewell como criador e "melhorista", era resultante de sua acurácia em colher, e manter detalhados registros de produção, além do uso da endogamia para fixar determinada característica de interesse (ELER, 2014; TAVARES, 2010).

O melhoramento genético animal converge na soma de processos seletivos que objetivam o aumento da frequência dos genes desejáveis na população, diminuindo conseqüentemente a frequência dos genes indesejáveis. De forma sucinta, o melhoramento genético nada mais é do que a aplicação da genética animal com o intuito de aumentar a média de produção dos animais; fundamentando-se em dois dogmas centrais: métodos de seleção e sistemas de acasalamento.

A produção animal recebe influência direta da ação concomitante de fatores genéticos e ambientais, onde a alta produtividade só é possível por intermédio do melhoramento simultâneo da constituição genética dos animais em questão, e das condições ambientais na qual os mesmos estão submetidos (PEREIRA, 2008; TAVARES, 2010).

A utilização racional destas duas forças é a chave para a otimização do sistema produtivo, onde a genética representa o pilar para o estabelecimento de programas de melhoramento, sendo o fator limitante da capacidade de resposta dos animais aos processos seletivos. Desde maneira, torna-se indispensável procurar compatibilizar a genética com as condições ambientais da exploração animal (PEREIRA, 2008).

O aumento da produção e produtividade dos animais domésticos constitui um desafio técnico e político na atualidade, em decorrência da incessante demanda de produtos de origem animal. Esta demanda mostra-se mais premente em países tropicais, visto que uma grande parcela se encontra em estado de miséria e subnutrição, bem como produção animal insuficiente ou com pouca tecnificação; se comparadas com países de clima temperado. Evidencia-se assim, a vital necessidade de estabelecer o melhoramento genético das populações animais brasileiras, desmistificando a premissa de que esta é uma técnica elitista, onde os únicos beneficiários são os criadores abastados, usualmente detentores dos melhores genótipos e de condições socioeconômicas mais privilegiadas.

Faz-se indispensável que os criadores comerciais tenham acesso aos reprodutores geneticamente superiores e que sejam instruídos no sentido de propiciar condições ambientes adequadas, ao passo que venham receber, em troca, preços justos pelo trabalho e investimento. (PEREIRA, 2008; TAVARES, 2010)

Na aquicultura, melhoramentos genéticos dirigidos têm apresentado um potencial de ganho na taxa de crescimento, em média, de 15% por geração, a exemplo da tilápia GIFT (*Genetically Improved Farming Tilápia*), salmão do pacífico (*Oncorhynchus spp.*) e do Atlântico (*Salmo salar*), truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) e bagre do canal (*Ictalurus punctatus*). O principal provento do melhoramento genético tendo como enfoque a taxa de crescimento é a redução dos custos fixos e custos de produção, em decorrência do menor requerimento para a manutenção dos animais.

O programa Norueguês GENOMAR hoje supre hoje mais de 70% do mercado de ovos geneticamente melhorados de salmão do atlântico e truta arco-íris, apresentando taxa de custo/benefício de 1/15, ou seja, para cada real investido, há um retorno esperado de R\$ 15,00 (HULATA, 2001; RESENDE et al., 2008).

Nos últimos anos houve um significativo avanço científico tendo como alvo o desenvolvimento de novos métodos de análise de proteínas e DNA, devido ao progresso tecnológico da área de biologia molecular. Estes métodos tornaram-se promissores, sendo de fácil aplicação para auxiliar o melhoramento genético animal (TAVARES,2010).

2.5. Genética Molecular

Desde a descoberta da estrutura molecular do DNA, por James Watson e Francis Crick em 1953, o campo da genética tem progredido consideravelmente e sido ferramenta auxiliar para o entendimento de processos biológicos inerentes à evolução de espécies.

No decorrer das últimas 3 décadas, a genética molecular vem inovando o campo das ciências biológicas, possibilitando o desenvolvimento de métodos para caracterizar geneticamente indivíduos e populações (FREELAND, 2005; TENEVA, 2009; SILVA,2012).

A genética molecular é definida como o ramo da biologia dedicado ao conhecimento estrutural e funcional dos genes a nível molecular, fazendo uso de métodos da genética e biologia molecular. A finalidade deste campo científico é o estudo e posterior aplicação de informações moleculares para a determinação de padrões de descendência, classificação zoológica dos organismos, bem como compreensão de mutações genéticas, etc. O avanço da genética molecular modificou completamente o mundo atual, tornando possível o que há algumas décadas atrás seria impensável, como a criação de clones, alimentos transgênicos (OGMs) resistentes às pragas, realização de testes de paternidade, mapeamento de doenças e realização de aconselhamento genético (SILVA,2012).

2.6. Marcadores Moleculares

Com o advento de novas tecnologias, a genética molecular adquiriu um expressivo espaço no ramo científico atual. Os primeiros estudos envolvendo o uso de marcadores genéticos eram fundamentados em aspectos morfológicos, sendo os mesmos baseados nas leis básicas de herança mendeliana. Todavia, este tipo de parâmetro nem sempre se mostra satisfatório para estudos de melhoramento, visto que frequentemente estes marcadores não são passíveis de identificação e restringem a sua aplicação a somente algumas espécies. Além disso, possuem pouco polimorfismo podendo ser mascarados por fatores ambientais (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995; ALMEIDA, 2012).

Os marcadores moleculares surgiram em decorrência da necessidade de detecção de polimorfismo genético diretamente no DNA, sendo definido como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA, possuindo capacidade de diferenciar dois ou mais indivíduos geneticamente (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1995).

Existem diversas razões comprovando a eficiência do uso de marcadores moleculares se comparados com marcadores morfológicos convencionais, entre elas a neutralidade fenotípica, a ausência de interações epistáticas ou pleiotrópicas, podendo ser detectados tanto em tecidos jovens como em adultos.

A utilização de marcadores moleculares possibilita um considerável aumento da eficiência em programas de melhoramento genético, visto que o seu uso permite que a seleção genética e posteriormente novos cruzamentos sejam realizados em uma mesma geração (ALMEIDA, 2012).

Com o avanço de técnicas moleculares, os marcadores moleculares tornaram-se ferramentas de vital importância para o estudo de populações, revelando parâmetros genéticos primordiais para o melhoramento e conservação animal, entre elas espécies aquáticas (ALMEIDA, 2012).

Marcadores moleculares em espécies aquáticas neotropicais estão sendo utilizados objetivando a identificação da diversidade genética destes animais, bem como na exploração de caracteres de interesse econômico e preservação de unidades significativas para a manutenção dessa biodiversidade (TORRES et al., 2004; TAVARES, 2010).

Os principais tipos de marcadores moleculares podem ser divididos em dois grupos distintos, sendo classificadas conforme a metodologia técnica utilizada para identificá-los: hibridização ou amplificação de DNA.

Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e Minissatélites ou loci VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*); SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) ou ASA (*Amplified Specific Amplicon*); Microssatélite (*SSR - Simple Sequence Repeats*); e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (JOHN et al., 1996; NEFF et al., 2000; ALI et al, 2005; MALDINI et al, 2006; ARANEDA et al, 2009).

2.7. Marcadores Microssatélites

O DNA satélite foi descoberto no ano 1960, quando cientistas concluíram que ao centrifugar sob certas condições o material genético, este apresentava-se em duas ou mais camadas: uma banda principal contendo genes e bandas secundárias constituídas de sequências de DNA repetidas e muito longas, sendo assim denominadas de bandas satélites. Em 1985 na Universidade de Leicester, o professor de genética *Sir Alec John Jeffreys* encontrou regiões menores contendo sequências de DNA repetitivo, as quais chamou de minissatélites, que consistiam de repetições de 15 ou mais pares de bases. Jeffreys e seus colegas também determinaram que o número de repetições minissatélite diferia entre indivíduos, procedimento este que levou a invenção posterior da técnica de *DNA-fingerprinting*.

No final da década de 80, o Dr. James L. Weber e Paula L. May, da Marshfield Medical Research Foundation juntamente com Michael Litt e Jeffrey A. Luty, da Oregon Health Sciences University isolaram satélites compostos de repetições de bases ainda menores que as já descritas em 1985, chamando-as de microssatélites.

Os microssatélites também denominados short *tandem repeat* (STR) (repetições curtas em tandem) (Edwards et al, 1991) ou *simple sequence repeat-SSRs* (simples sequências repetidas) (Tautz, 1989), são definidos como sequências

curtas de 1 a 6 pares de bases repetidos em tandem e distribuídos aleatoriamente no genoma de vários organismos, principalmente eucariotos.

O deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA é tida como a principal causa da variação no número de repetições nessas regiões. Os diferentes números de repetições caracterizam os diferentes alelos, que podem ser detectados numa eletroforese em gel.

Estas repetições são utilizadas como marcadores moleculares devido ao alto nível de polimorfismo encontrado em seus *loci*, o que possibilita sua utilização em diversos propósitos de estudo populacional, permitindo analisar desde indivíduos até espécies proximamente relacionadas, sendo amplamente usado em genética e melhoramento animal e vegetal (NEFF et al, 2000; MOREIRA et al., 2007; BORÉM e CAIXETA, 2009).

Além disso, esta classe de marcadores apresenta como característica comportamento codominante permitindo a detecção de alelos dominantes e recessivos em um dado *locus*, bem como alto grau de informação de polimorfismo por *locus* gênico e distribuição aleatória por todo o genoma, podendo estar associado a regiões expressas, alta conservação entre espécies relacionadas e dependentes de pouca quantidade de DNA na amostra (FERREIRA e CRATTAPAGLIA, 1996; XU et al., 2001; BUSO et al., 2004).

Os marcadores microssatélites podem ser classificados conforme a composição das sequências repetidas, das quais são denominadas repetições perfeitas, quando não apresentam interrupção (ATATATATATATATATA); repetições imperfeitas, quando são interrompidas por bases que não correspondem ao motivo (ATATATAGGATATATA); repetições compostas, quando duas ou mais repetições estão dispostas adjacentes (ATATATATATACGCGCGCGCGCGCGC). De igual forma, estes marcadores podem ser definidos conforme a unidade de repetição sendo elas: mononucleotídica (A)_n; dinucleotídica (AT)_n; trinucleotídica (ATG)_n; tetranucleotídica (ATGA)_n; pentanucleotídica (ATGCT)_n; e hexanucleotídica (ATGCTG)_n (OLIVEIRA et al., 2006; BORÉM e CAIXETA, 2009).

2.7.1. Uso de Marcadores Microsatélites na Aquicultura

Aplicações dos SSRs na aquicultura, objetivando o estudo de genética e reprodução de peixes tiveram início na década de 1990, quando trabalhos de Goff et al. (1992) mostraram que SSRs são abundantes em Zebrafish (*Danio rerio*), sendo os mesmos altamente polimórficos, com taxa de mutação estimada em $10^{-2} - 10^{-6}$ locus por geração.

Este polimorfismo tem consequências importantes, como a geração de alelos polimórficos que podem ser utilizados em estudos genéticos populacionais, em sistemática e no mapeamento genômico.

Desde então o uso de marcadores microsatélites na aquicultura está sendo cada vez mais premente, visto que os mesmos podem ser classificados como ferramenta auxiliar para o desenvolvimento da atividade. Em biologia pesqueira, especificamente, este recurso genético tem sido utilizado para avaliação do tamanho efetivo da população de um estoque (N_e), identificação de populações, níveis de endogamia, estrutura populacional e fluxo gênico, parentesco bem como características quantitativas (NEFF et al., 2000; MELO et al., 2006).

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

Trabalhos de variabilidade genética estão sendo realizados em plantéis de tilápia submetidas a programas de melhoramento, em sistema intensivo de cultivo, por meio de marcadores microsatélites (MOREIRA et al., 2007; MELO et al., 2008; PETERSEN et al., 2012).

Seguindo o mesmo enfoque, Wu et al (2015) fizeram uso de marcadores microsatélites para avaliação da diversidade genética da população selecionada de vieira híbrida *Chlamys farreri* x *Patinopecten yessoensis* que apresenta crescimento superior fornecendo um novo ângulo para entender a reprodução seletiva artificial em sistemas aquícolas.

Especificamente em espécies nativas, Almeida (2012) conduziu um estudo,

onde o mesmo teve como objetivo prospectar um fragmento genômico sexo-específico para *Arapaima gigas*. Essa prospecção foi realizada com foco no desenvolvimento de uma ferramenta molecular para sexagem do pirarucu na fase pré-púbere para melhorar os processos de criação dessa espécie em cativeiro, pois o pirarucu não apresenta dimorfismo sexual. Desta maneira, os resultados obtidos indicaram que a espécie possui um sistema de determinação sexual não exclusivamente cromossômico ou, alternativamente, que a espécie teria sofrido uma perda recente do cromossomo portador do gene determinante do sexo, estando no início do processo evolutivo de um novo sistema cromossômico. Os resultados obtidos também não permitem eliminar a hipótese de que a espécie *A. gigas* apresenta um sistema de determinação sexual ambiental, sob regulação de fatores como temperatura, fotoperíodo, e pH da água.

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

Objetivando identificar *loci* potencialmente amplificáveis de microsatélites para a espécie de peixe-rei *Odonthesthes humensis*, Tavares et. al (2014) obtiveram 1.265.204 leituras, contendo aproximadamente 0,184 Gpb onde 75.347 continham SSRs; no entanto, 34% apresentaram sequências flanqueantes bastante adequadas para desenho de primers, produzindo 25.806 PAL, sendo 21% de 2mers, 22% de 3mers, 37% de 4mers, 13% de 5mers e 7% de 6mers. Do total de PAL, foram selecionados os “Best PALs” (bPALs), estes *loci* SSRs apresentam unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) e trechos mais longos de repetições (mais de sete unidades de repetições observadas), que são mais propensos a serem variáveis nas populações de *O. humensis*. O número de bPAL foi de 167, valores próximos aos encontrados em aves (100 - 450), e inferiores aos resultados de estudos realizados com *Danio rerio*. Os resultados demonstram que, com uma pequena cobertura do genoma de *O. humensis*, foi possível a identificação de um grande número de *loci* potencialmente amplificáveis de microsatélites. Além disso, foi gerado um número ótimo de bPAL, com potencial para análise de variabilidade genética dessa espécie.

Em decorrência da dificuldade de inserção de espécies nativas em sistemas intensivos de criação e do crescente sobrepesca de animais ameaçados de extinção Oliveira (2014) conduziu um estudo tendo como enfoque principal realizar a reprodução em cativeiro de *Brycon orbignyanus* de diferentes locais de origem, assistida por análises genéticas do DNA mitocondrial e, também de marcadores moleculares do tipo microssatélite, de forma a produzir juvenis adequados para o uso em programas de manejo.

Prado (2014) utilizou marcadores moleculares do tipo microssatélite na identificação de híbridos e introgressão genética em populações de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum* visando desenvolver marcadores de genes nucleares para a distinção entre as espécies em questão, bem como identificar seus híbridos F1 e avançados. Já em estudo conduzidos por Tenório (2012), utilizou-se marcadores microssatélites para uma avaliação da estrutura genética e populacional do camarão de água doce em extinção, pitu (*Macrobrachium carcinus*), como ferramenta para apoiar programas de repovoamento da espécie.

2.8. Variabilidade genética de populações

Em 1900, com o redescobrimto dos trabalhos de Mendel, ficou cada vez mais claro que as características são determinadas por genes, onde os mesmos segregam durante a gametogênese e após são transmitidos para a prole. A análise da transmissão genética em cruzamentos experimentais e heredogramas rapidamente deu origem a um novo tipo de análise que envolvia populações inteiras. Em 1930 a genética de populações já estava se estabelecendo como disciplina, contando com a grande contribuição de pesquisadores como Sewall Wright, R.A. Fisher e J.B.S. Haldane, passando a representar um alicerce fundamental para a teoria evolutiva e para estudos de variação genética populacional.

Em peixes especificamente, a variabilidade genética promove a capacidade adaptativa a mudanças ambientais, resistência às doenças e ainda pode afetar o crescimento e a reprodução. Logo, a manutenção destes parâmetros se faz fundamental para a inserção de qualquer estratégia de melhoramento e de

conservação genética. (POVH et al.,2009).

Todavia, as práticas de manejo, em detrimento do volume de produção da atividade, também são fatores que predispõe a redução da variabilidade existentes nas populações cativas, aumentando a probabilidade de ocorrência de endocruzamento (SOUSA et al., 2006; MOREIRA et al., 2007).

Em razão disso, a consolidação de um programa de melhoramento genético está fundamentada no conhecimento da variabilidade genética da população base e a realização de análises específicas para o monitoramento da mesma.

2.8.1. Análise da variabilidade genética

2.8.1.1. Polimorfismo

O polimorfismo genético é definido como a ocorrência em um conjunto de indivíduos de dois ou mais alelos em um *locus*, o que implica em mudanças na sequência genética entre integrantes de uma certa população. A taxa de polimorfismo está associada ao número de *loci* polimórficos em razão do número total de *loci* analisados na população em estudo (TAVARES,2010).

2.8.1.2. Heterozigose

A heterozigose é a condição genética na qual o indivíduo possui dois alelos diferentes para determinar uma característica. Por conseguinte, a heterozigose observada de um *locus* diz respeito a proporção de indivíduos heterozigóticos observados neste *locus*. Já a heterozigose média observada traduz-se na ponderação de indivíduos heterozigóticos observados associado ao número total de *loci* estudados (RAMALHO et al.,2012)

2.8.1.3. Diversidade alélica

Parâmetro utilizado para comparação de diferentes genótipos e populações bem como a variação genética existente nas mesmas. Esta mensuração está embasada no conceito de frequência alélica, que pode ser definida como as proporções dos diferentes alelos de um determinado gene na população (RAMALHO et al, 2012).

2.8.1.4. Estatística F

Constitui uma medida introduzida pelo geneticista estadunidense Sewall Wright (1951) cuja finalidade é realizar a descrição da estrutura genética de populações.

Para tal intento são utilizados os parâmetros F_{st} , F_{it} e F_{is} ; onde F_{st} mensura a redução de heterozigose de uma subpopulação devido à deriva genética, sendo a mesma um reflexo direto da diferenciação genética da subpopulação. Os valores deste parâmetro podem variar de 0 a 1, onde um valor de F_{st} alto sugere que há uma considerável diferenciação genética. O F_{it} calcula a redução de heterozigose de um indivíduo frente ao total da população, sendo associada ao efeito da consanguinidade e deriva genética. Por fim, o F_{is} mede a diminuição da heterozigose de um indivíduo em decorrência da reprodução não casual existente dentro de uma subpopulação, onde seu valor está atrelado a consideráveis níveis de consanguinidade populacional. (TAVARES, 2010; RAMALHO et al., 2012).

2.8.1.5. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

O princípio de Hardy-Weinberg foi proposto em 1908 pelo matemático inglês Godfrey Hardy e o médico alemão Wilhem Weinberg onde em estudos independentes estabeleceram o teorema que norteia o princípio do equilíbrio gênico populacional.

Este teorema descreve a influência da reprodução ao acaso (panmítica) nas frequências alélicas e genóticas em uma população infinita. Nele é estabelecido que dentro de determinadas condições, uma população mendeliana apresentará frequências alélicas constantes ao decorrer das gerações. Independentemente da presença de genes raros ou frequentes, a frequência dos mesmos será constante desde que essas condições em que a população está inserida se mantenham inalteradas. (EDWARDS, 2008; TAVARES,2010).

3. Projeto de Pesquisa

PRPPG – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

PPGZ – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia

UFPEL – Universidade Federal de Pelotas

Caracterização genética de duas populações de *Rhamdia quelen* através da utilização de marcadores microssatélites

Equipe:

Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello
Prof. Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras
Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira
Prof. Dr. Rafael Aldrighi Tavares
Prof. Dr. Juvêncio Luiz Osório Pouey
Doutoranda Daiane Machado Souza
Doutorando Cristiano Costenaro Ferreira
Graduanda Fernanda Brunner Hammes
Graduando Paulo Leonardo Silva Oliveira
Graduando Rodrigo Ribeiro Bezerra de Oliveira

Suzane Fonseca Freitas

Pelotas, 2015

3.1. Caracterização do problema

Dispondo de aproximadamente 12% de toda água doce disponível no planeta, litoral que ultrapassa 8 mil quilômetros de extensão e faixa marítima correspondente ao tamanho da Amazônia, o Brasil detém todas as prerrogativas necessárias para despontar como uma potência aquícola mundial.

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (*Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO*) no ano de 2000 foram registrados cerca de 35 milhões de empregos nos setores da produção primária de pesca e aquicultura, sendo 65% relacionados à pesca marítima, 15% referentes à pesca continental e 20% na aquicultura (FAO, 2006).

Segundo dados divulgados pelo Ministério da Pesca e Aquicultura (MPA), no ano de 2011 o consumo médio de pescado no país alcançou a marca recorde de 11,17 Kg por habitante/ano, com expressivo crescimento de 14,5% em relação ao ano anterior. Com base nos números divulgados, é válido supor que atualmente os brasileiros consomem pescado na média anual mínima recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que é equivalente a 12 kg de pescado por habitante.

Este acentuado acréscimo de consumo não se restringe somente ao Brasil, como têm sido uma tendência mundial; fato este que pode ser atribuído pela incessante busca de alimentos mais saudáveis, e o pescado supre perfeitamente as novas exigências do mercado consumidor.

Como perspectiva futura, espera-se que no ano de 2030 a demanda internacional aumente em mais de 100 milhões de toneladas anuais, considerando-se que a produção média atual é de 154 milhões de toneladas. Segundo relatório publicado pela FAO, o Brasil tem capacidade de assumir 20% da demanda esperada para os próximos anos, mas para que isto ocorra é necessário a tecnificação no concernente às formas de captura destes animais, evitando-se desta forma o esgotamento dos recursos pesqueiros, sendo a aquicultura uma excelente alternativa. Países detentores de grandes reservas de água e terra, associada a uma abundância de espécies aquícolas nativas, são promissores celeiros para o desenvolvimento da aquicultura. Países como o Brasil, que necessitam de maior desenvolvimento e organização da cadeia produtiva, bem como adaptação

tecnológica às condições locais, onde as instituições de pesquisa e o setor público devem trabalhar de forma conjunta, para o fortalecimento deste segmento produtivo (TAVARES, 2010).

A genética da conservação desenvolveu-se no início da década de 1980, objetivando apoiar a aplicação das análises genéticas moleculares em problemáticas conservacionistas das espécies. Em decorrência da crescente demanda de pescado e conseqüentemente aumento da captura de diversos recursos aquícolas, a comercialização desses produtos tem sido permeada por diversas medidas legais ao redor do mundo no sentido de regulamentar, fiscalizar e identificar corretamente as espécies de peixes provenientes da captura comercial (DOMINGUES, 2011).

As pesquisas em genética de populações de peixes têm sido determinantes para elucidar relações relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, abordando questões desde sua origem bem como de características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (PARKER *et al.*, 1998; SUNNUCKS, 2000). Esses estudos são de grande importância no que diz respeito a elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, em especial ao papel desempenhado pelas variações ao nível do genoma em resposta às mudanças ambientais, particularmente àquelas de origem antropogênica.

Neste contexto, a biologia molecular tem sido a ferramenta mais utilizada para estudos genéticos, onde a mesma tem acumulado avanços importantes, desenvolvendo técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA, em adição à descoberta de variados marcadores moleculares aplicáveis as mais diversas problemáticas encontradas no estudo de populações, da mesma forma que a elaboração de análises estatísticas que visam desde a estimação do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e esclarecer questões de parentesco.

3.1.1. Caracterização da espécie a ser estudada

Endêmica no sul e sudeste do Brasil, bem como Uruguai, Paraguai e Argentina a espécie *Rhamdia quelen*, popularmente conhecida como jundiá, é um peixe caracterizado por sua rusticidade, podendo viver em águas com condições desfavoráveis para o desenvolvimento de outras espécies. Apresentam hábito alimentar onívoro, alimentando-se de pequenos peixes, moluscos, crustáceos, insetos, restos de vegetais e detritos orgânicos, porém apresentando boa aceitação a ração em sistema intensivo de cultivo (RINGUELET et. al, 1967).

A primeira maturação sexual ocorre quando as fêmeas atingem aproximadamente 165 mm de comprimento e os machos 134 mm. O período reprodutivo sucede-se na primavera, desovando em locais de água limpa, calma e de fundo pedregoso. Seus ovos ficam cobertos por uma substância gelatinosa, demorando cerca de 3 dias para eclodir (BENTO,2003; KUTTER,2005).

No estado do Rio Grande do Sul, o jundiá configura como a segunda espécie nativa mais capturada e a mais promissora para produção intensiva. Embora a espécie apresente grande importância para a piscicultura, pesquisas ou levantamentos de dados no concernente a características genéticas dos plantéis nativos de jundiá no Rio Grande do Sul são escassos, fazendo-se necessário um estudo nesse sentido, para que estratégias e medidas de conservação e fortalecimento da cadeia produtiva de *Rhamdia quelen* sejam implementadas.



Figura 1 - Exemplar de jundiá *Rhamdia quelen*.
Fonte: Fishbase

3.2. Objetivos

3.2.1. Objetivos geral

Descrever a divergência e a variabilidade genética de duas populações de jundiá (Lagoa Mirim e Lagoa Mangueira), através do polimorfismo de oito marcadores microssatélites.

3.2.2. Objetivo específico

- Analisar a frequência alélica nos oito *loci* microssatélites, para obtenção da diversidade entre as populações e estrutura populacional;
- Realizar análise estatística dos parâmetros genéticos populacionais que definam a estrutura de população;
- Analisar a diferenciação alélica e genotípica e desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg.

3.3. Metodologia

O estudo será desenvolvido em parceria entre o Laboratório de Ictiologia do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel e o Laboratório de Engenharia Genética Animal do Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, ambos pertencentes à Universidade Federal de Pelotas – RS, no período de agosto de 2015 a fevereiro de 2017.

Os peixes serão coletados por pescadores artesanais, licenciados pelo IBAMA e MAP para exercer a atividade de pesca nas lagoas e autorização do SISBIO (Licença SISBIO Nº 45945-1). Serão analisados um total de 80 exemplares de duas populações de jundiá (*Rhamdia quelen*), sendo 40 animais provenientes da Lagoa Mangueira, localizado no município de Santa Vitória do Palmar-RS, Brasil e 40

animais oriundos da Lagoa Mirim, situada no extremo sul do Estado do Rio Grande do Sul, na fronteira entre Brasil e Uruguai.

O material biológico coletado para análise genética serão fragmentos de tecido muscular e nadadeira caudal (aproximadamente 200–300mg), sendo os mesmos armazenados em etanol 70% e preservados a -20°C. Após a coleta, o DNA genômico total será extraído usando separação orgânica pelo protocolo de Cloreto de Sódio (BARRERO et al.,2008), que consiste:

- Maceração do tecido muscular, objetivando a ruptura da parede e membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA;
- Adição de 600 µL de solução tampão TNE1 (5 ml de tris HCl 1 Molar, pH 8.0, 10 mL de EDTA, 1ml de NaCl, 84 mL de água Milli-Q), tendo por finalidade promover a lise das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade;
- Adição de 330 µL de TNE2 (5ml tris HCl 1 Molar pH 8,0; 10 mL EDTA, 1mL NaCl; 10 mL SDS 20%), como solução detergente para solubilização das membranas e auxiliando na inativação de enzimas;
- 4 µL de proteinase K para a desnaturação proteica e incubação imediata à 50°C por 12 horas;
- Após a incubação, para precipitação de proteínas e restos celulares serão adicionados 340 µL de NaCl 5M;
- o material será centrifugado a 12000 rpm e transferido o sobrenadante para novos microtubos, onde serão acrescidos 900µL de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA;
- Posteriormente, será realizada a lavagem do material com 200 µL de etanol 70%;
- A fase líquida é então cuidadosamente desprezada e as amostras serão secas em estufa a 40°C;
- Por fim, o DNA será ressuspendido com 100 µL de tampão TE buffer (10 mM de Tris pH 8.0 e 1 mM de EDTA).

Para checagem da integridade do DNA obtido, as amostras serão submetidas a eletroforese horizontal com gel de agarose 1% e tampão SB buffer (H₃BO₃ e NaOH) 1X durante 30 minutos a 140 volts. Para tal, será usada uma alíquota de 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com 1,1 µL de *GelRed* (Biotium,USA) e posteriormente visualizados em transiluminador.

Os marcadores microssatélites serão amplificados através da técnica de reação de PCR, cujo o volume final será 25µL, contendo 1µL de DNA genômico, 1 µL de cada *primer* (10 pmol), 2,5 µL de 10X PCR buffer (*Sigma Aldrich*), 0,5 µL de dNTP (100µM), 1,0 µL de JumpStart™ Red taq® DNA Polymerase (*Sigma Aldrich*) e 18,0 µL de água livre de nuclease. O controle negativo (reação sem a presença de DNA) será utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação, sendo a reação de PCR realizada em um termociclador *Genetouch*® (*Bioer Technology*).

A amplificação consistirá em uma desnaturação inicial de 94°C por 30 segundos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada *primer* por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A posterior checagem da amplificação do produto de PCR será realizada por meio de eletroforese horizontal em gel de agarose a 1%, onde após a eletroforese, os produtos serão analisados em transiluminador (L-Pix, Loccus Biotecnologia) sob luz UV e registrados digitalmente.

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

A diversidade genética dentro das populações estudadas será caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada, diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg, número de alelos por *locus*, porcentagem de *loci* polimórficos e índice de fixação de Wright, estimativas obtidas pelo uso do programa *Genepop 4*.

3.4. Resultados e impactos esperados

O trabalho pretende contribuir na produção de conhecimento que auxilie no entendimento da estrutura populacional da espécie em estudo, visando a conservação bem como a exploração sustentável da mesma.

O estudo almeja de igual forma, servir como subsídio para implementação de futuros programas de melhoramento genético de espécies nativas para cultivo, onde se faz necessário o conhecimento das populações base.

3.6. Outros projetos e financiamentos

O coordenador deste projeto participa em vários projetos de pesquisa aprovados pelo COCEPE, como colaborador ou coordenador. A seguir são citados os projetos aprovados:

- Modelagem não-linear da curva de crescimento de codornas de corte em análises bayesianas. Código do COCEPE: 5511.
- Estudo da associação de polimorfismos em genes relacionados à resistência de bovinos ao carrapato. Código do COCEPE: 5358.
- Estudos epigênicos e de marcadores microssatélites em uma linhagem de codornas de corte. Código do COCEPE: 4989.
- Arroz na dieta de codornas. Código do COCEPE 3950.
- Preservação de sêmen de aves silvestres Código do COCEPE 20406002.
- Avaliação do tamanho adulto de vacas e associações com eficiência reprodutiva e qualidade da carcaça Código do COCEPE 5490.
- Ômega-3 na dieta da gestante: Efeitos epigenéticos no metabolismo energético em sucessivas gerações. Código do COCEPE 50500024.
- Avaliação do tamanho adulto de vacas e associações com eficiência reprodutiva e qualidade da carcaça. Código do COCEPE 5490.
- Uso de marcadores moleculares no estudo de associação e seleção genômica

ampla para características de crescimento e escores visuais em bovinos Hereford e Braford. Código do COCEPE 5611.

- Desempenho e qualidade de ovos de codornas alimentadas com óleo ácido de soja e os efeitos na sua progênie. Código do COCEPE 6443.

3.1. Aspectos éticos

Durante o estudo, questões relacionadas ao bem-estar animal, tais como coleta e abate dos mesmos, serão atendidas conforme a determinação do protocolo de bem-estar animal.

Referências bibliográficas

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

BENTO, D.M., 2003. Conhecendo os peixes mais pescados na região do Laranjal- Colônia Z3. **Monografia de especialização em Ecologia Aquática Costeira, FURG**, Rio Grande, 41p.

DOMINGUES, R.R.. Identificação molecular, biologia e pesca de tubarões do gênero *carcharhinus* (*Chondrichthyes – Carcharhiniformes*): uma contribuição para a gestão da pesca do estado de São Paulo, Brasil. 2011. 71f. **Dissertação (Programa de Pós Graduação em Aquicultura e Pesca)** Instituto de Pesca APTA-SAA. São Paulo-SP.

FAO, 2006. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Disponível em <<http://www.fao.org.br/>>. Acesso em 08 de agosto de 2015.

KUTTER, M.T. 2005. Estratégia alimentar da reprodução do jundiá *Rhamdia quelen* (Siluriformes, Heptapteridae). **Monografia de Graduação em Oceanologia, FURG**, Rio Grande, 18p.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology, Durham**, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

RAMALHO, M.A.P.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.A.B.P.; SOUZA, E.A.; GONÇALVES, F.M.A.; SOUZA, J.C.. **Genética na Agropecuária**. 5.ed. Editora UFLA. Lavras-MG, 2012. 566 p.

RINGUELET, R.A.; ARAMBURU, R.H.; ARAMBURU, A.A. 1967. Los peces argentinos de agua Dulce. **Comision de Investigacion Cientifica**, La Plata, 602p.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p.199-203, 2000.

TAVARES, R.A. Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microssatélites. 2010. 70f. Dissertação (**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia /Melhoramento Animal**). Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS. 2010.

4 Relatório do Trabalho de Campo

4.1. Local de estudo

4.1.1. Lagoa Mangueira

A lagoa Mangueira está situada no extremo sul do Estado do Rio Grande do Sul, mais precisamente entre as dunas que separam o município de Santa Vitória do Palmar e o Oceano Atlântico (33°05'27.02"S e 52°46'03.01"O) (Figura 2). Possui volume aproximado de setecentos milhões de metros cúbicos de água doce, distribuídos em 92 km extensão, oscilação de dois a seis km de largura e profundidade média aproximada de 1,5 a 6 metros de profundidade (DELANEY, 1965; ARTIOLI et al, 2009).

Sua formação é originária de regressões e transgressões marinhas decorrentes do processo de erosão e posterior deposição de areia, bem como a ação eólica; podendo ser considerada uma lagoa costeira jovem do ponto de vista geológico (aproximadamente 5.000 anos) (SCHÄFER, 1984; TOMAZELLI & VILLWOCK, 2005).

Além disso, a lagoa Mangueira é caracterizada como um sistema fechado e sem influência de marés, sendo desta forma uma área com diversas particularidades geográficas, bem como populações biológicas e regime hídrico únicos, sendo associada também a diversas atividades econômicas como a pesca, recreação e irrigação (JICA, 2000).

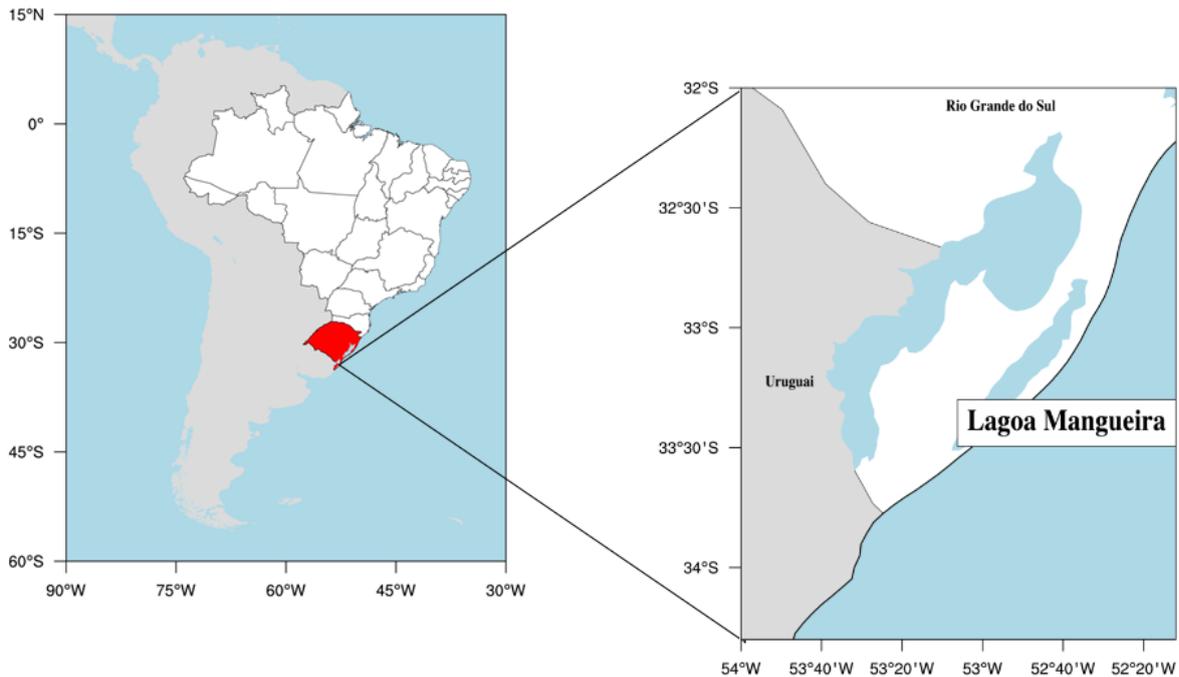


Figura 2 - Localização Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.1.2. Lagoa Mirim

Situada no extremo sul do estado do Rio Grande e norte do Uruguai ($31^{\circ} 30'$ a $34^{\circ} 35' S$ e $53^{\circ} 31'$ a $55^{\circ} 15' O$) (Figura 3), a lagoa Mirim abrange uma superfície de 62.250 km^2 , dos quais, 47% estão em território brasileiro e 53% em território Uruguaio (PIEDRAS, 1994; FIA et al. 2009).

A bacia da lagoa Mirim é o segundo maior corpo hídrico com presença de características lacustres no país, onde prevalece o regime de águas compartilhadas de acordo com o Tratado de Limites de 1909 e Tratado da Lagoa Mirim de 1977. Além disso, apresenta área superficial de 3.749 km^2 , sendo aproximadamente 185 km de extensão e largura máxima de 37 km (IBGE, 1986; PIEDRAS, 1994).

Se comparada com outros ambientes límnicos, a lagoa Mirim possui sedimento pobre em matéria orgânica (Carbono e Nitrogênio), sendo este comportamento atípico, visto que lagoas costeiras são caracterizadas pelo acúmulo de matéria orgânica e, por conseguinte, elevados níveis de produção primária.

Apontada como um importante reservatório de água para o desenvolvimento econômico e social no qual a mesma abrange, as águas da lagoa Mirim são utilizadas para diversas atividades tais como: orizicultura, recreação, abastecimento público,

navegação e pesca artesanal (PIEDRAS et al. 2012).



Figura 3 - Localização da lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

4.2. Coleta dos animais

Os animais utilizados para o estudo foram coletados por pescadores artesanais atuantes nas Lagoas Mangueira e Mirim, na qual os mesmos possuem licença do IBAMA e MAP bem como autorização do SISBIO (Licença SISBIO N° 45945-1), para exercer a atividade da pesca.

Para captura dos peixes foram utilizadas redes de emalhe, sendo a pesca realizada no período da noite durante 12 horas e posterior coleta pela manhã.

Foram obtidos um total de 80 exemplares da espécie *Rhamdia quelen* sp., sendo 40 animais oriundos da Lagoa Mangueira e 40 animais da Lagoa Mirim.

Como fonte de biológico para posterior extração de DNA genômico, retirou-se fragmentos de tecido muscular e nadadeira caudal de cada indivíduo coletado, totalizando 160 amostras.

4.3. Extração de DNA

Para extração de DNA genômico, utilizou-se o protocolo mediante precipitação por NaCl seguindo metodologia proposta por Barrero et al. (2008).

A integridade do DNA extraído foi checada por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, onde a mesma foi conduzida em cuba horizontal a 140 volts por 30 minutos usando tampão SB 1x (H₃BO₃ e NaOH).

Para tal, utilizou-se uma alíquota de 7 µl de DNA sendo as amostras coradas com GelRedTM (Biotium USA). Após corrida, os géis foram visualizados em transiluminador sob luz UV e registrados digitalmente.

4.4. Amplificação dos Microssatélites

Foram utilizadas 8 *loci* microssatélites tetranucleotídeos para amplificação, nos quais os mesmos foram desenhados e sequenciados segundo metodologia utilizada na literatura (Castoe et al., 2012).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL, contendo 1µL de DNA genômico, 1,0 µL de cada *primer* (10pmol), 2,5µL de 10X PCR buffer (*Sigma Aldrich*), 0,5µL de dNTP (100µM), 1,0 µL de JumpStartTM Red taq[®] DNA Polymerase (*Sigma Aldrich*) e 18,0 µL de água livre de nuclease. O controle negativo (reação sem a presença de DNA) foi utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação.

As reações foram realizadas em um termociclador Genetouch[®] (*Bioer Technology*). A amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 30 segundos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento conforme a temperatura específica de cada *primer* (Tabela 2) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos, terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A checagem da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de

agarose a 1,0 %, utilizando uma alíquota de 4 µL de produto de PCR. Após a eletroforese, os produtos foram analisados em transiluminador sob luz UV e registrados digitalmente.

Tabela 1 - Sequências e temperaturas de anelamento dos primers e sequência *motif*.

<i>Locus</i>	Sequência primers (5'-3')	Sequência <i>motif</i>	Ta* (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Rq137981	F: TGACAATAAAGCAAGGTCATTTTCG R: GGGTCTGAATCACCAGTTGC	AAAT	60,5	120-140
Rq155485	F: CTTTCATGGTCAGCTGTGAGG R: GTGATGCGTTGCTTTCCG	TGCG	54,9	120-130
Rq158947	F: CCTGCACTGTGCCAGAAGG R: ATCCATGCGTTTGTCCATGC	TCCG	55,6	140-160
Rq164109	F: TGATACTGGTGCGAATCC R: TCCACTCTAAACGACTGATGC	AAAC	57,0	140-160
Rq193810	F: TTAATGAATGATCGATATTATTGACG R: AAAGGATGGATAGTCTCGCC	ATCT	66,0	60-80
Rq51373	F: CACTCCATTGCAGCTTCTTCC R: ATCGAGTGAAATGCAGCAGG	ATGG	61,7	80-100
Rq68040	F: GGTAAAGTGAGCTCAGGCAGG R: GCGGAGGAGAGAAAGGG	AATG	59,2	120-140
Rq193399	F: TGCTGAACTTCCAAACGTTCC R: GACTAAAGCCGGGACCTTCC	AGTG	54,3	100-120

*Ta = temperatura de anelamento

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.5. Análise dos dados

Foram realizadas 160 extrações de DNA genômico, correspondendo a 40 animais proveniente de cada população de estudo, nas quais foram coletados de cada animal, fragmentos de duas fontes de material biológico para comparação.

Como é evidenciado nas Figuras 4, 5, 6 e 7 tanto a utilização de tecido muscular quanto de nadadeira caudal mostraram-se eficientes para extração de material genético da espécie *Rhamdia quelen*, apresentando amostras limpas, sem degradação e sem apresentar alterações quanto a qualidade das mesmas nas duas populações estudadas

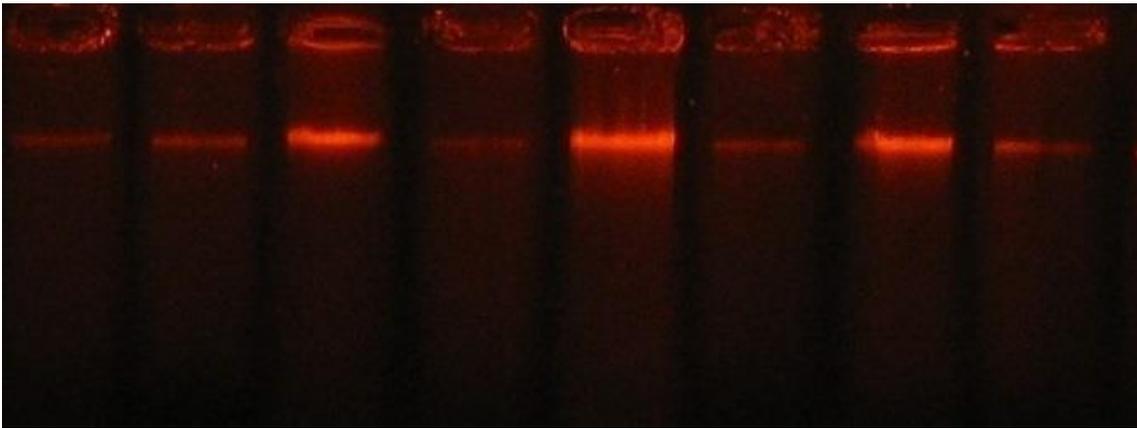


Figura 4 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de tecido muscular de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.

Fonte: Elaborado pela autora.

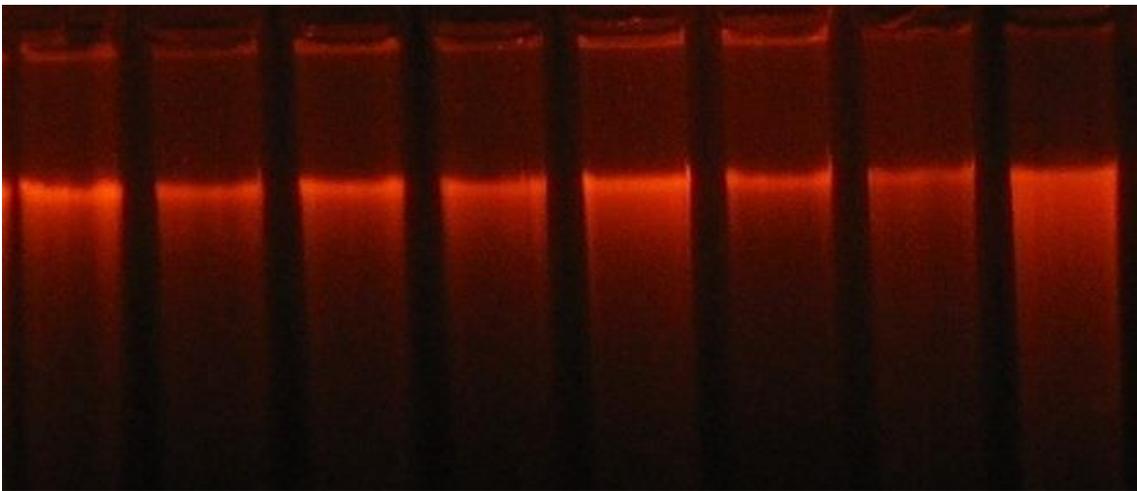


Figura 5 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de nadadeira caudal de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.

Fonte: Elaborado pela autora.

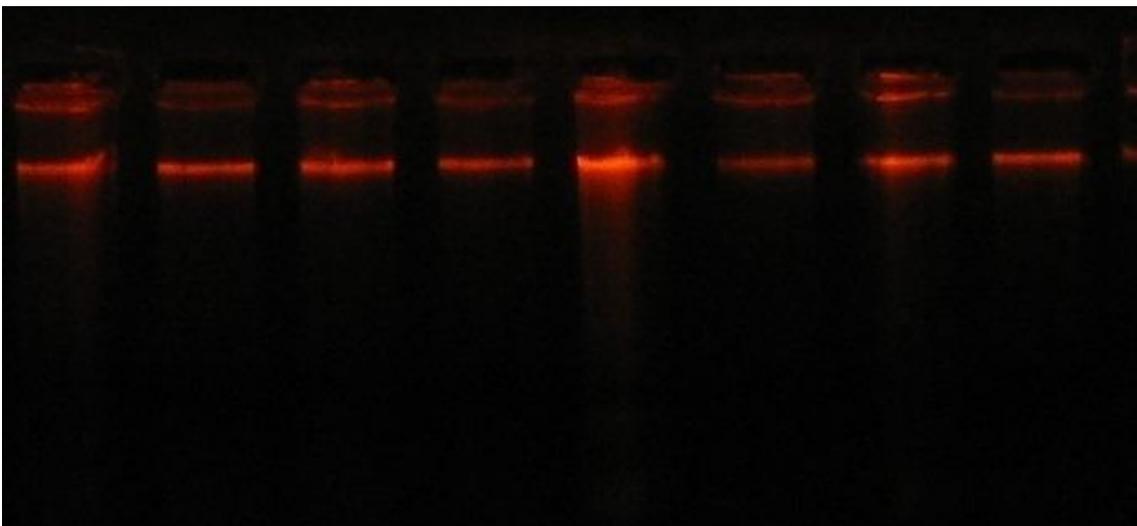


Figura 6 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de tecido muscular de jundiás oriundos da Lagoa Mirim.

Fonte: Elaborado pela autora.



Figura 7 - Perfil eletroforético de amostras de DNA genômico extraído a partir de fragmentos de nadadeira caudal de jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

Em consonância com a qualidade das extrações de DNA obtidas, os 8 *loci* microssatélites utilizados no presente estudo apresentaram amplificação nas duas populações investigadas (Figuras 8 a 23), fato este primordial para a condução das etapas subsequentes deste projeto, que tem por finalidade principal caracterizar geneticamente duas populações selvagens de jundiá através do polimorfismo destes microssatélites testados.

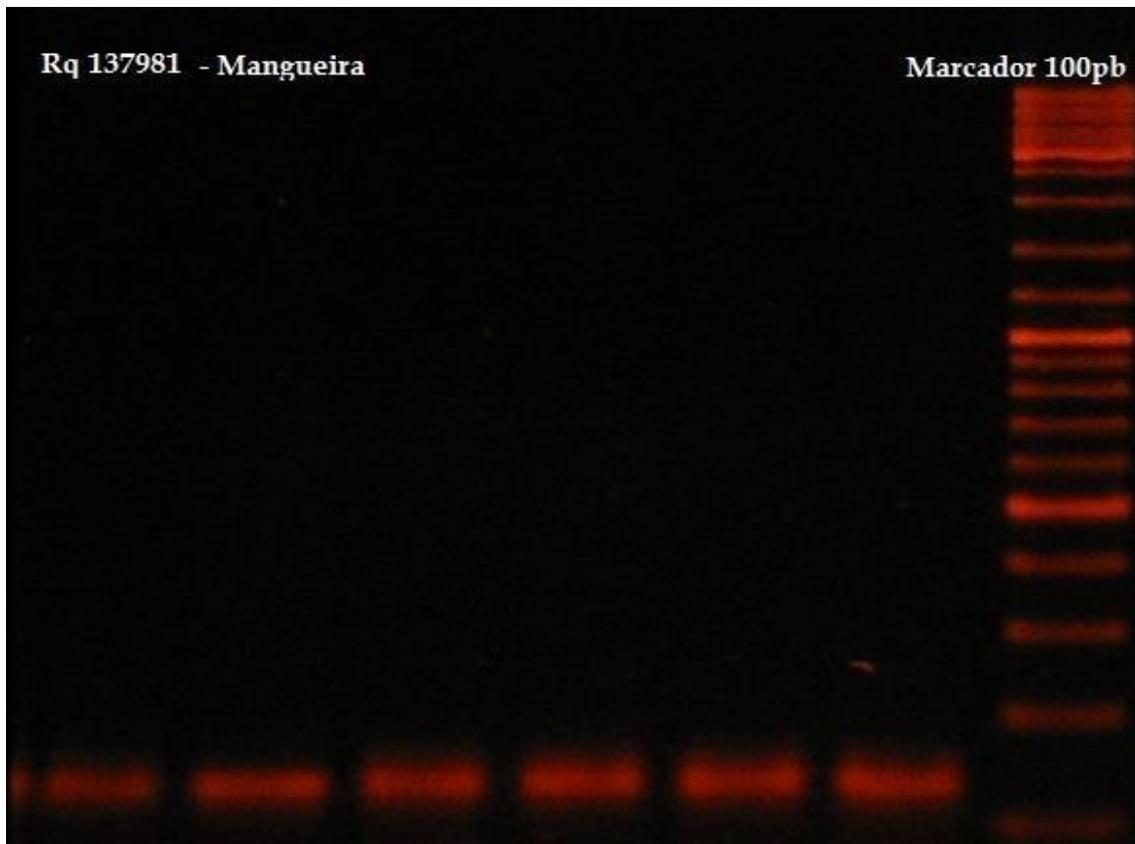


Figura 8 - Amplificação do *locus* Rq137981 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pela autora

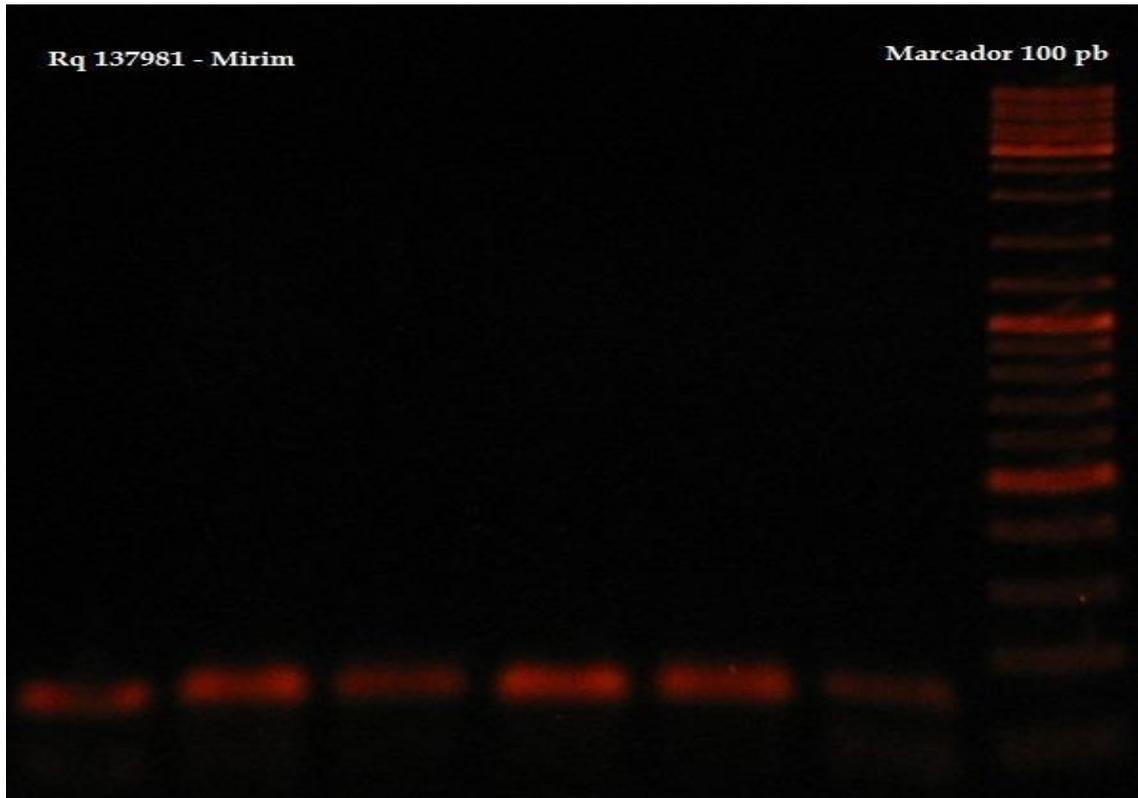


Figura 9 - Amplificação do *locus* Rq137981 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

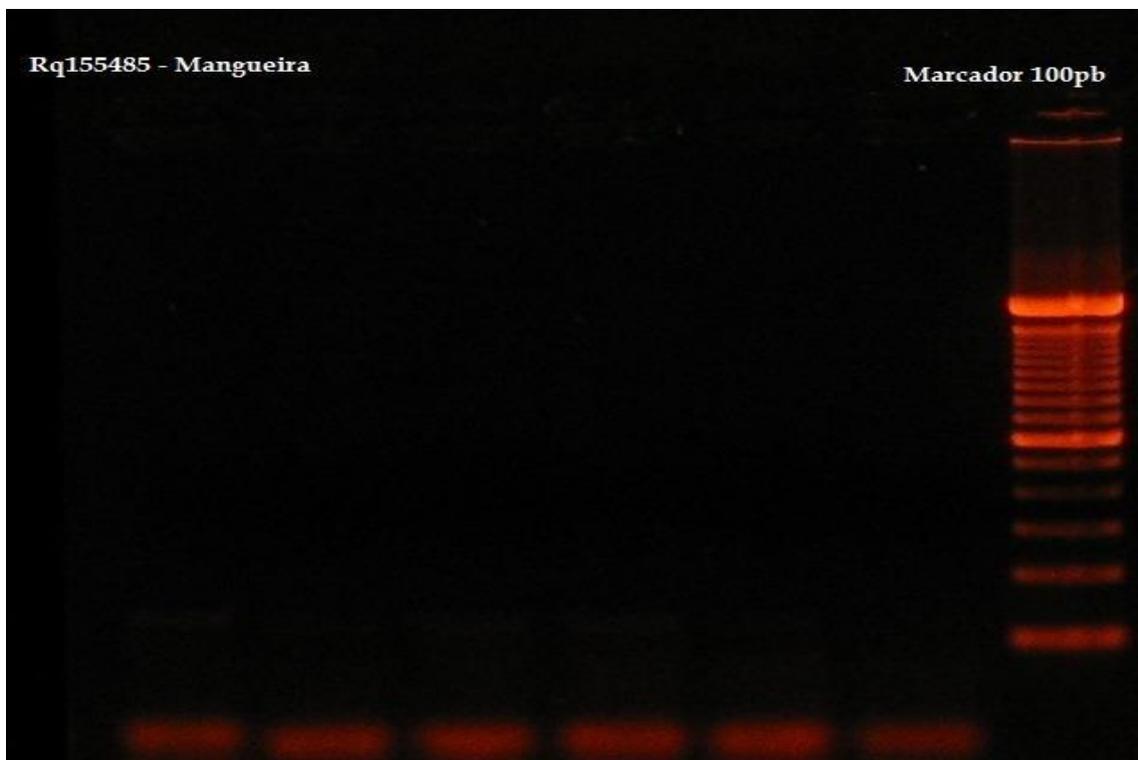


Figura 10 - Amplificação do *locus* Rq155485 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira
Fonte: Elaborado pela autora.

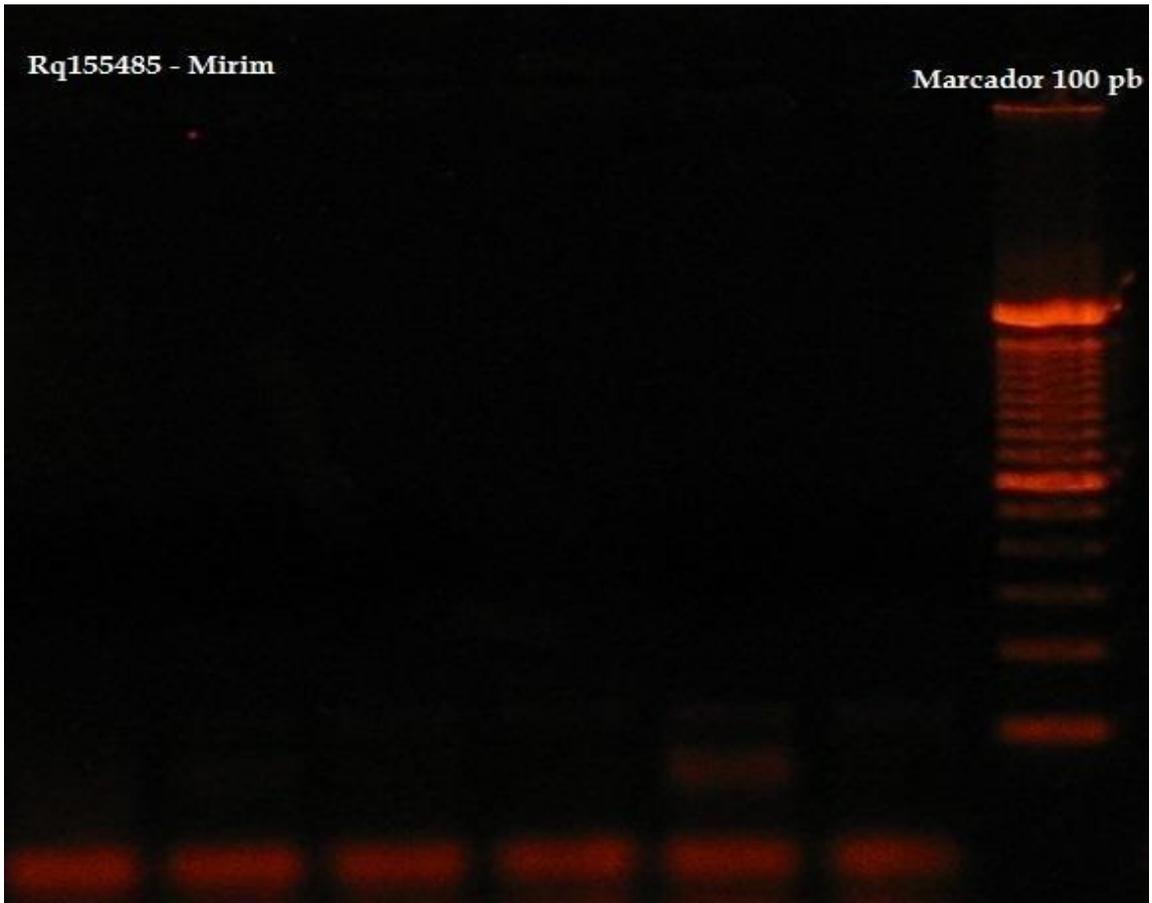


Figura 11 - Amplificação do *locus* Rq155485 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim
Fonte: Elaborado pela autora.

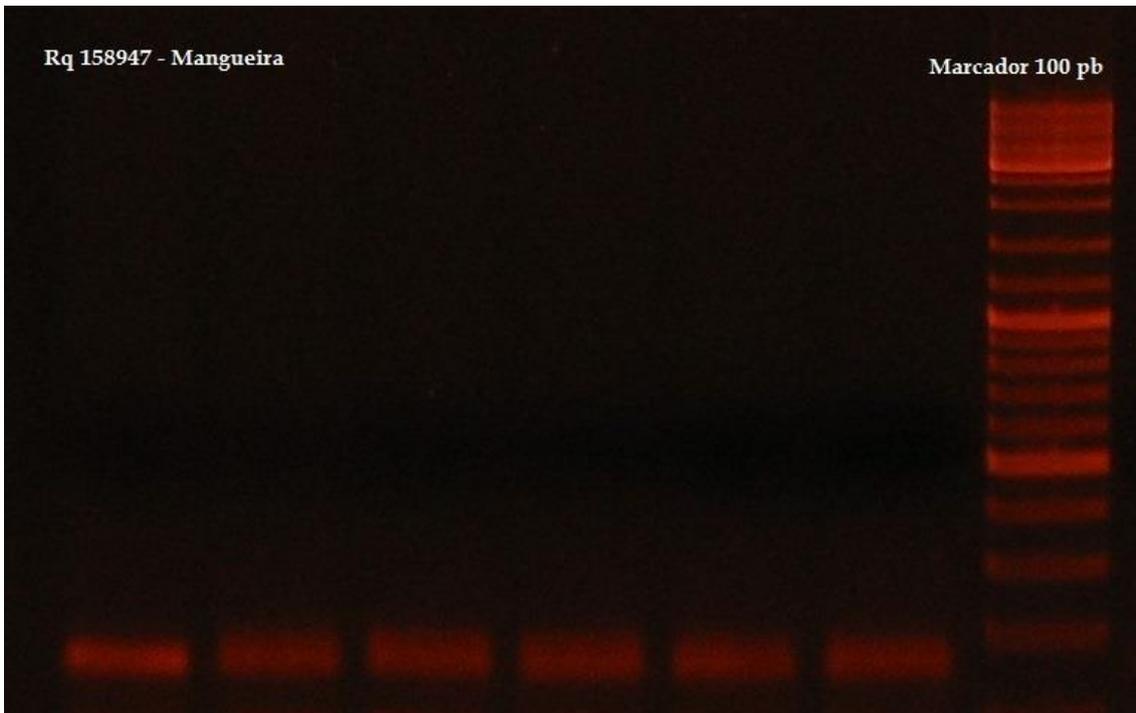


Figura 12 - Amplificação do *locus* Rq158947 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pela autora

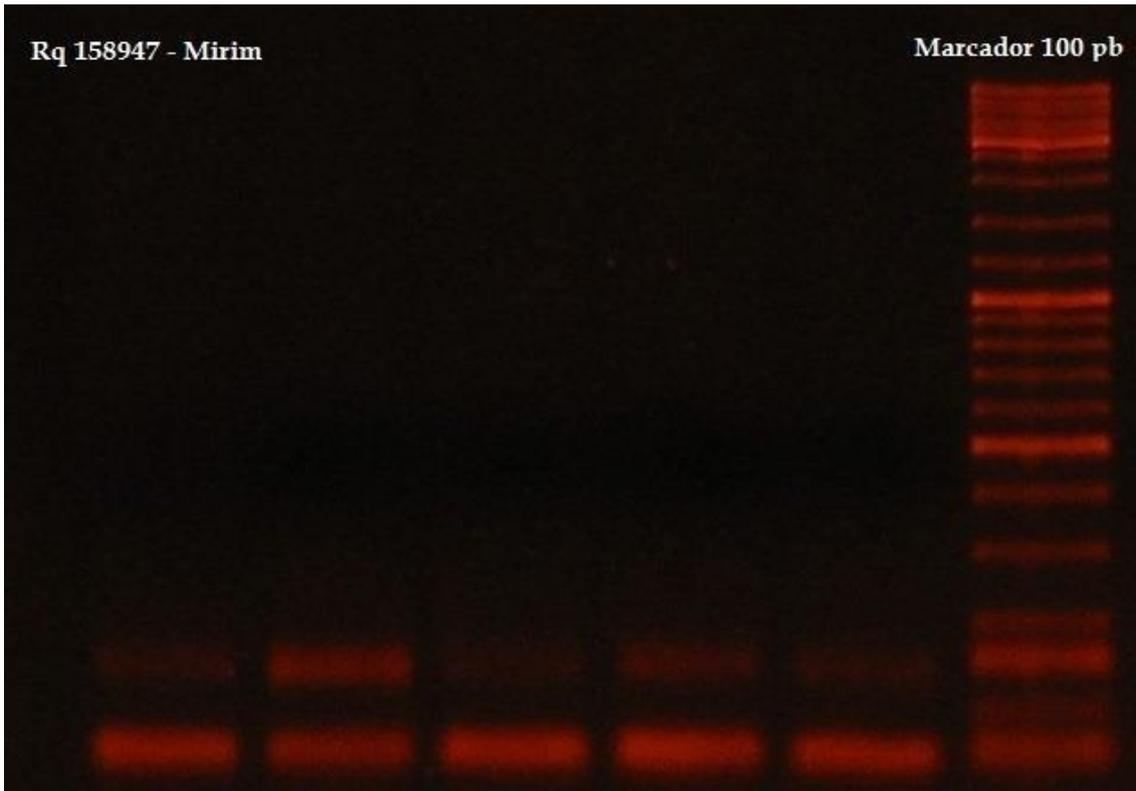


Figura 13 - Amplificação do *locus* Rq158947 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

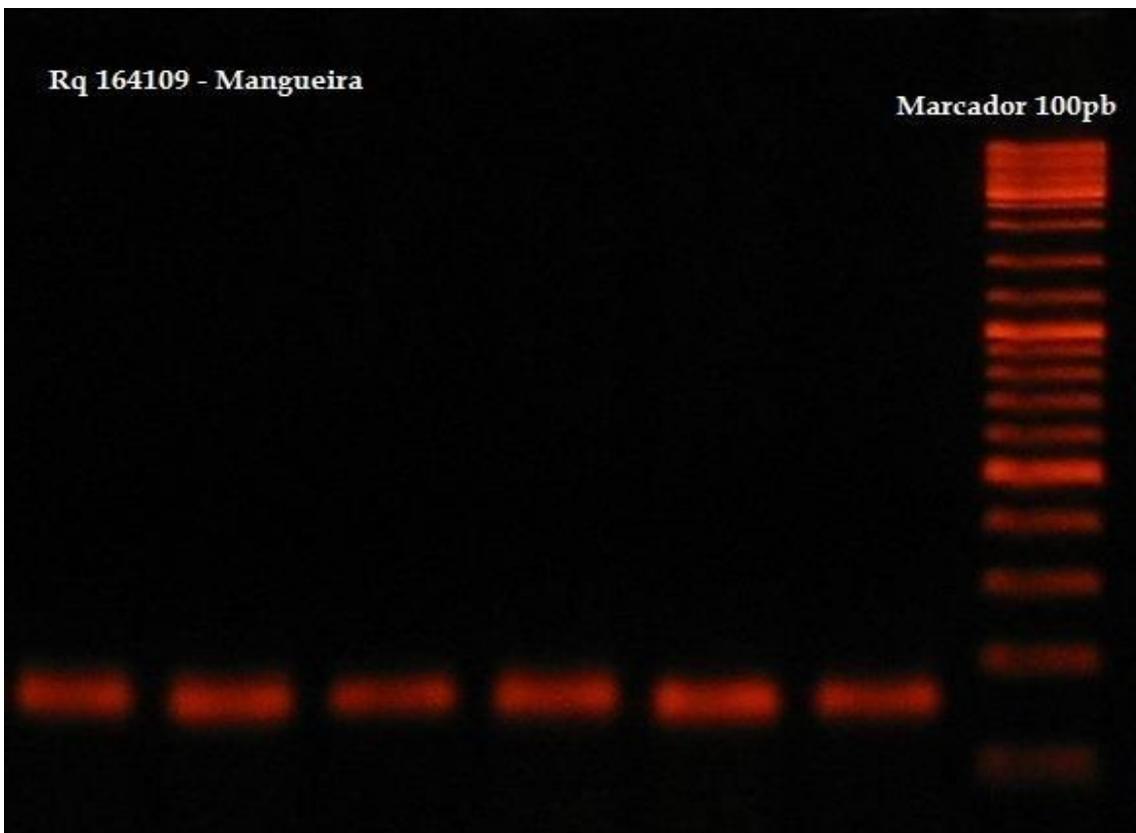


Figura 14 - Amplificação do *locus* Rq164109 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pela autora.

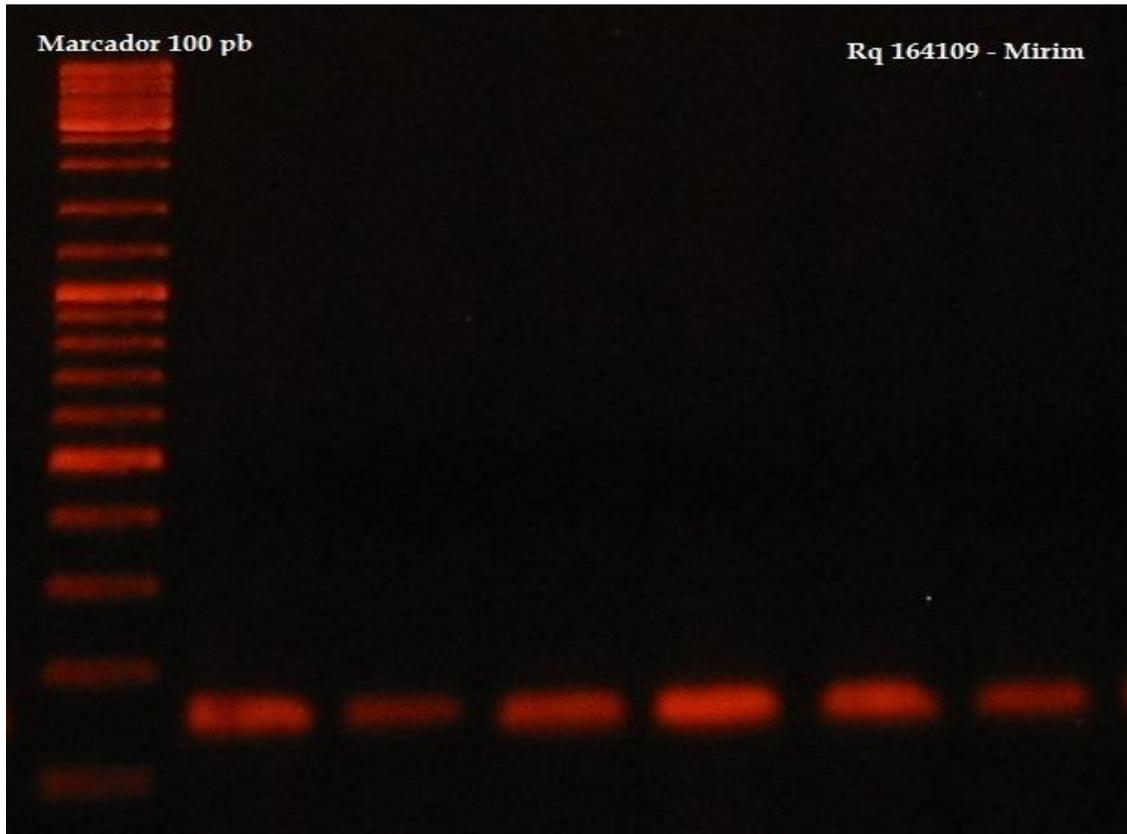


Figura 15 - Amplificação do *locus* Rq164109 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

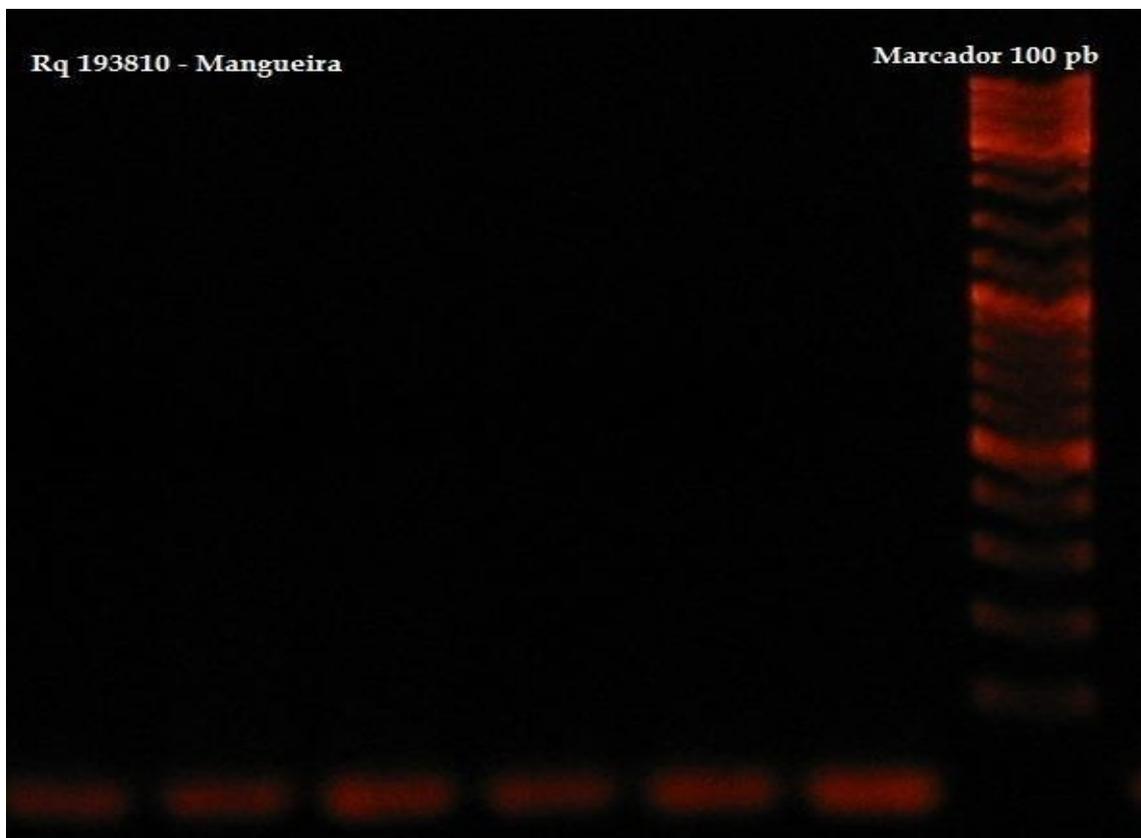


Figura 16 - Amplificação do *locus* Rq193810 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pela autor.

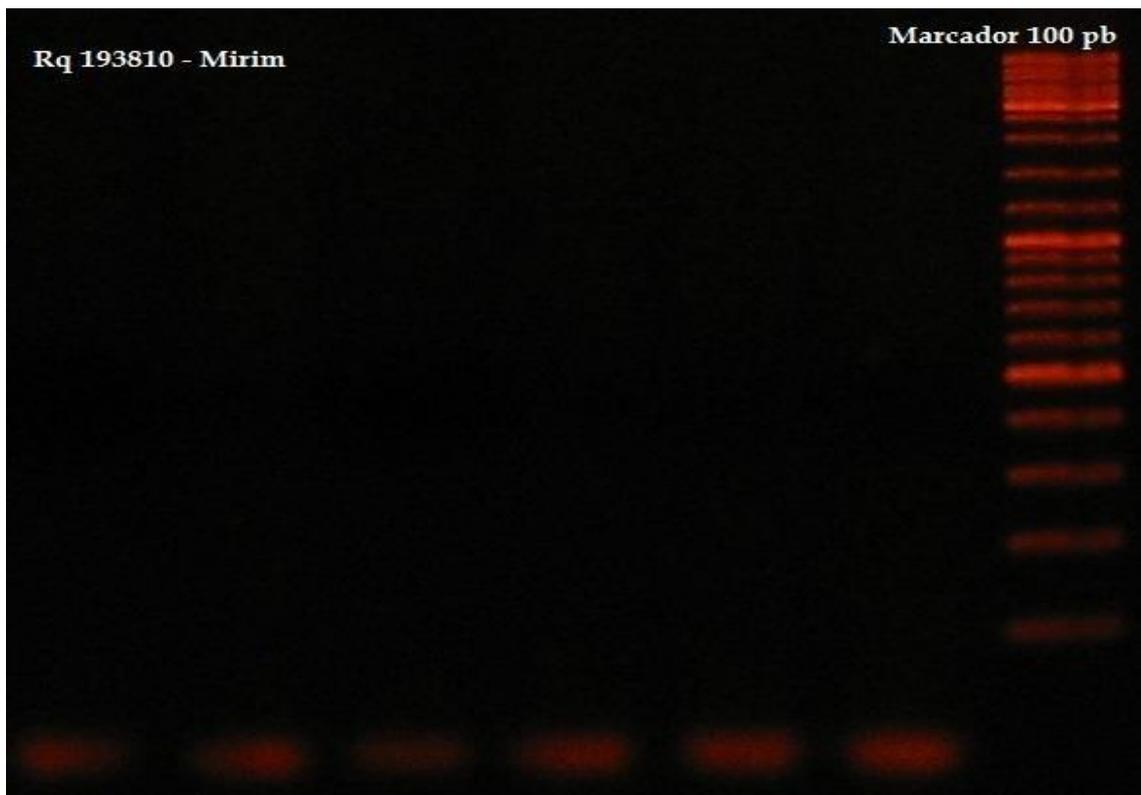


Figura 17 - Amplificação do *locus* Rq193810 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora

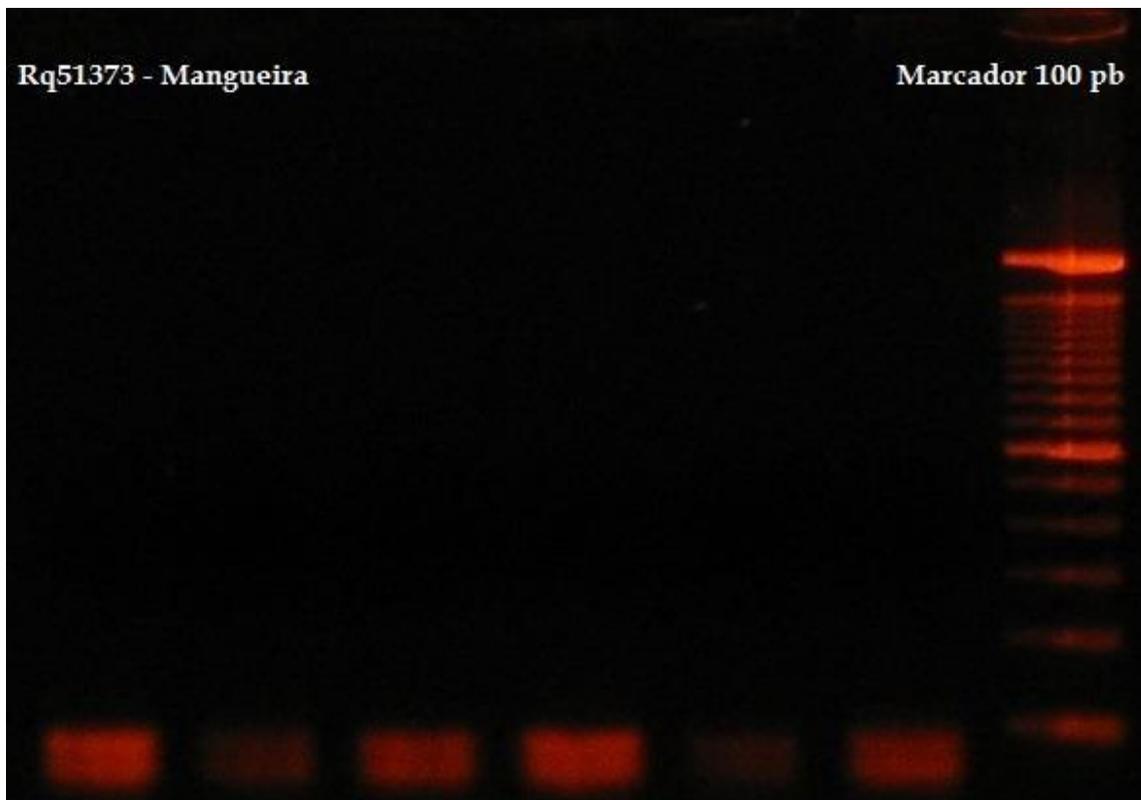


Figura 18 - Amplificação do *locus* Rq51373 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pela autora.

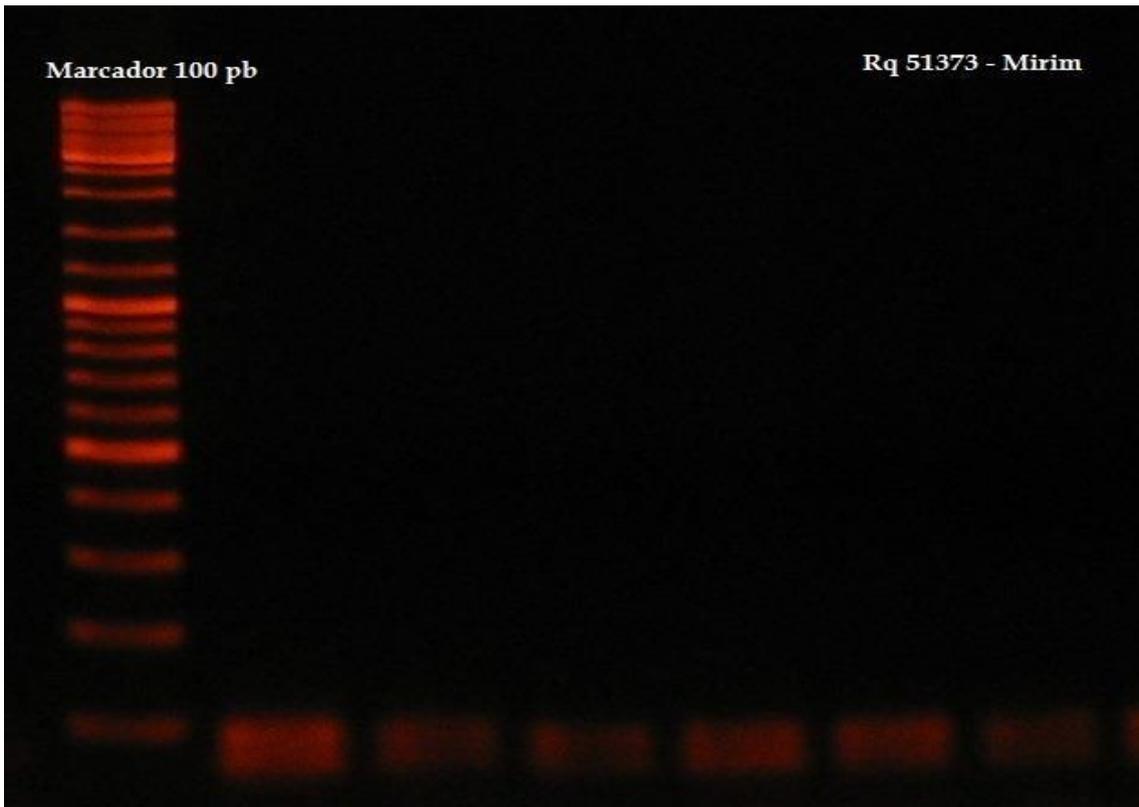


Figura 19 - Amplificação do *locus* Rq51373 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

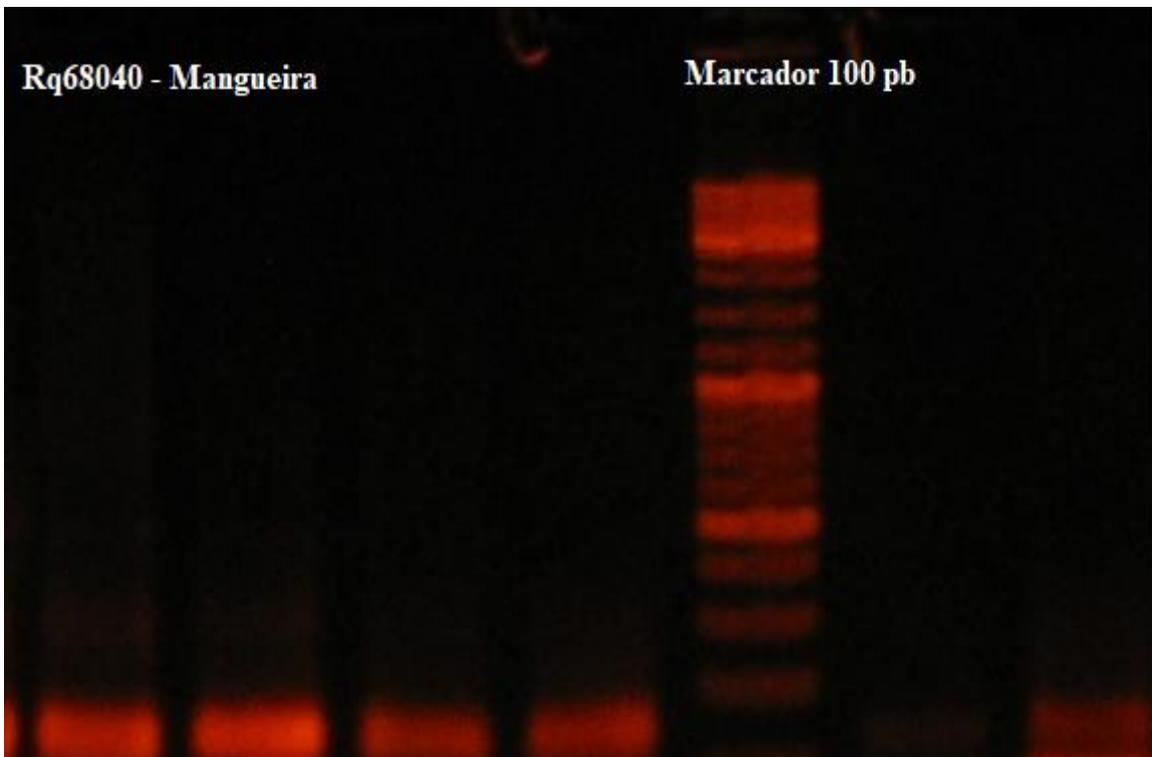


Figura 20 - Amplificação do *locus* Rq68040 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira
Fonte: Elaborado pela autora.

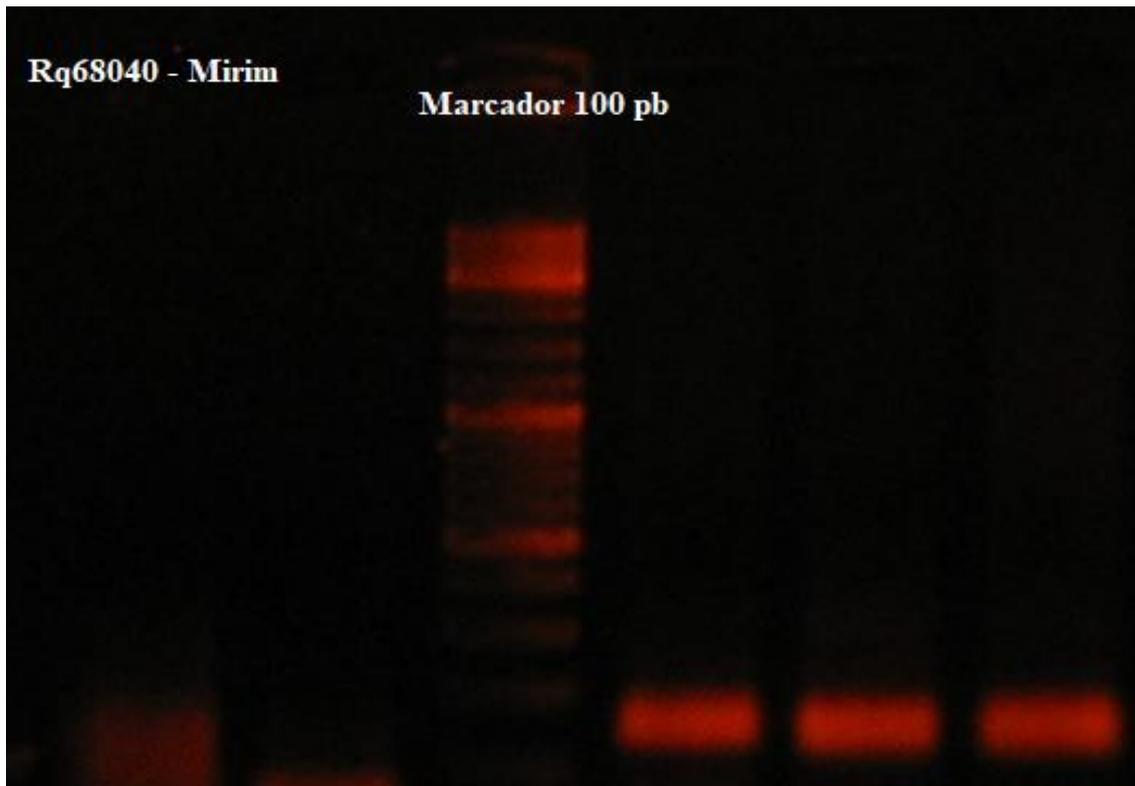


Figura 21 - Amplificação do *locus* Rq68040 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pela autora.

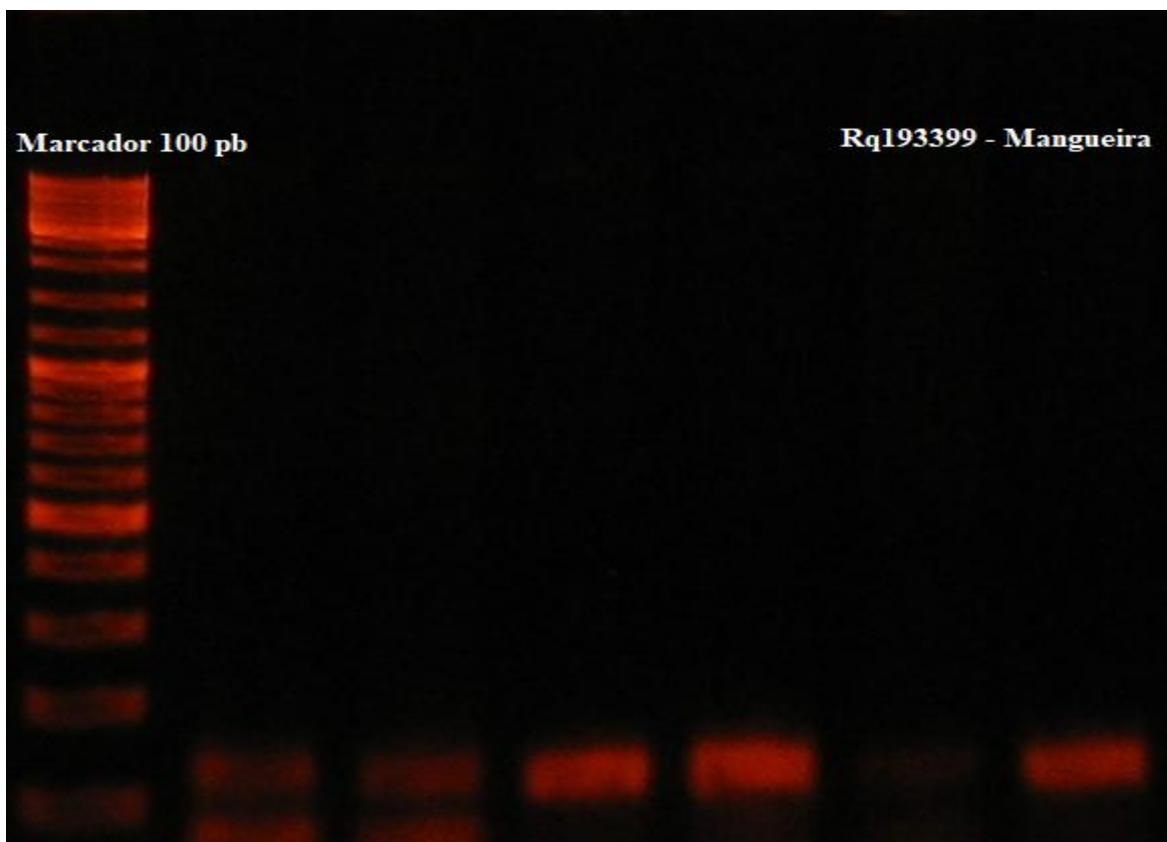


Figura 22 - Amplificação do *locus* Rq193399 em jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.
Fonte: Elaborado pelo autor.

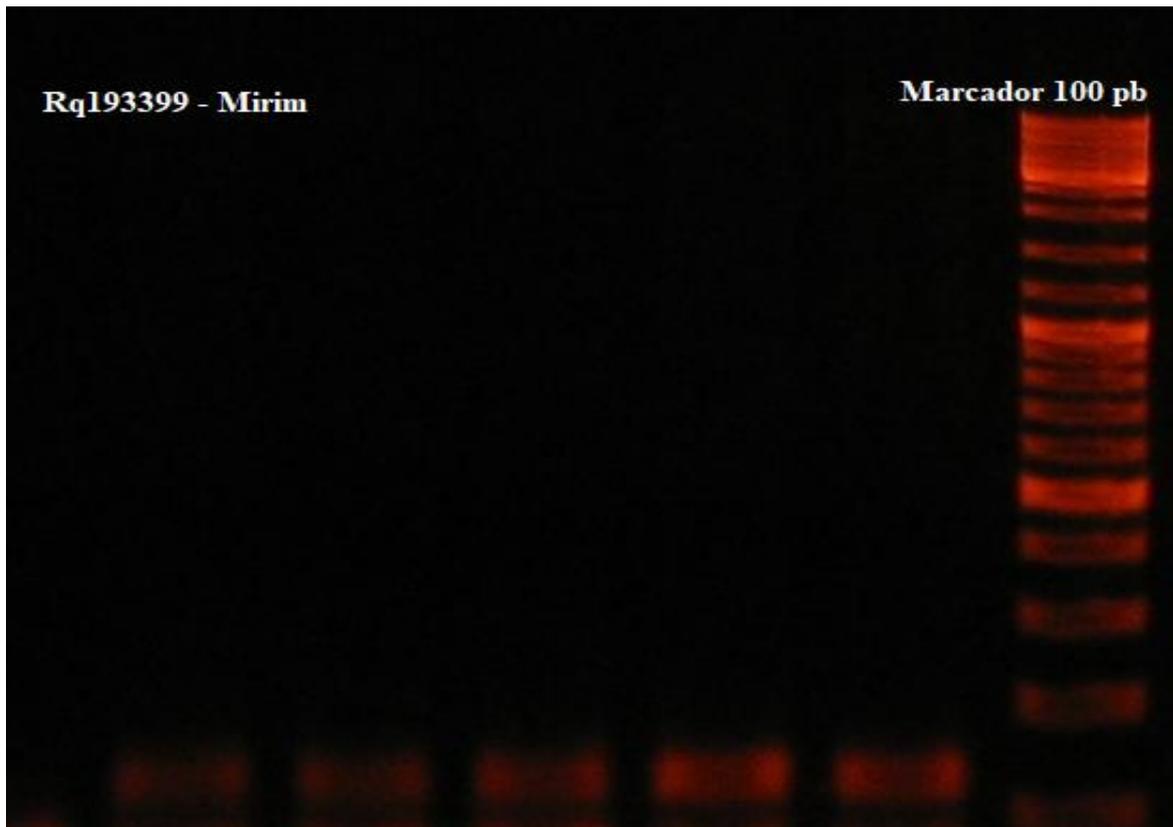


Figura 23 - Amplificação do *locus* Rq193399 em jundiás oriundos da Lagoa Mirim.
Fonte: Elaborado pelo autor.

1
2 **5 Artigo submetido a Revista Ciência Agronômica**
3
4

5 **Extração de DNA genômico e amplificação de *loci* microssatélites em populações**
6 **selvagens de jundiá (*Rhamdia quelen*)**
7

8 Genomic DNA extraction and amplification of microsatellite *loci* in wild populations of
9 jundiá (*Rhamdia quelen*)
10

11 **RESUMO** - Dentre as espécies nativas de interesse econômico no sul do país destaca-se o
12 jundiá (*Rhamdia quelen*), como possível candidato a inclusão em programas de melhoramento
13 genético, objetivando a maximização da produção da espécie em cativeiro. Todavia, o sucesso
14 da implementação de programas de melhoramento genético está fundamentado no
15 conhecimento genético da população base, sendo a extração de DNA de boa qualidade fator
16 preponderante para a avaliação dos mesmos. De igual forma, marcadores microssatélites têm
17 sido amplamente utilizados para avaliação genética de populações. O objetivo deste trabalho
18 foi testar um protocolo de baixo custo para extração de DNA genômico de duas populações
19 selvagens de jundiás a partir de duas fontes de material biológico e posteriormente testar a
20 amplificação de 8 *loci* microssatélites tetranucleotídeo. Os animais foram coletados das Lagoas
21 Mangueira e Mirim, juntamente a pescadores locais. A extração de DNA genômico foi
22 conduzida a partir de fragmentos de tecido muscular e nadadeira de cada animal coletado a
23 fim de comparação, utilizando um protocolo de separação orgânica por NaCl. Por fim,
24 realizou-se a reação de PCR a fim de verificar a amplificação dos microssatélites. Ambas

25 fontes de material biológico mostraram-se eficientes para extração de DNA genômico da
26 espécie, de igual modo ocorreu amplificação dos 8 *loci* microssatélites nas duas populações de
27 estudo, sendo os resultados obtidos satisfatórios para maiores estudos abordando a
28 caracterização genética da espécie em questão.

29 **Palavras-chave:** marcadores moleculares. melhoramento animal.SSR.

30 **ABSTRACT-** Among the native species of economic interest in the south of the country,
31 catfish (*Rhamdia quelen*) stands out as a possible candidate for inclusion in genetic
32 improvement programs, aiming to maximize captive species production. However, the success
33 of the implementation of genetic improvement programs is based on the genetic knowledge of
34 the base population, and the extraction of DNA of good quality is a preponderant factor for their
35 evaluation. Similarly, microsatellite markers have been widely used for genetic evaluation of
36 populations. The objective of this work was to test a low cost protocol for extraction of genomic
37 DNA from two wild populations of jundia from two sources of biological material and later to
38 test the amplification of 8 *loci* microsatellite tetranucleotide. The animals were collected from
39 Mangueira and Mirim Lagoons, together with local fishermen. Genomic DNA extraction was
40 conducted from fragments of muscle tissue and fin of each animal collected for comparison,
41 using an organic NaCl separation protocol. Finally, the PCR reaction was performed to verify
42 the amplification of the microsatellites. Both sources of biological material were efficient for
43 extracting genomic DNA from the species, as well as amplification of the 8 microsatellite *loci*
44 in the two study populations, and the results obtained were satisfactory for further studies
45 addressing the genetic characterization of the species in question.

46 **Key words:** molecular markers. animal breeding.SSR.

47 **INTRODUÇÃO**

48 A aquicultura consiste em uma atividade em franca expansão, sendo a mesma uma promissora
49 alternativa para suprimir a crescente demanda por alimentos no mundo, reflexo este do exponen

50 cial crescimento populacional nos últimos 50 anos. Segundo relatório publicado pela *Food and*
51 *Agriculture Organization of the United Nations* (FAO, 2016), o *The State of World Fisheries*
52 *and Aquiculture*, o Brasil especificamente deve registrar um crescimento de 104% na produção
53 pesqueira e aquicultura até o ano 2025, possibilitando a geração de empregos no setor, e
54 conseqüentemente aumentando a participação do país no agronegócio mundial.

55 Em consonância com esta previsão, se faz necessário maior competitividade e
56 produtividade no setor aquícola, sendo o melhoramento genético estratégia primordial para o
57 fortalecimento da cadeia produtiva. Por sua vez, o sucesso da implementação destes programas
58 está fundamentado na formação da população base, através do cruzamento de populações de
59 diferentes origens e posterior controle da variabilidade genética e da endogamia dos plantéis
60 (PETERSEN *et. al*, 2012; TAVARES *et al.*,2014).

61 Com o avanço da genética molecular no decorrer das últimas 3 décadas, diversas técnicas
62 moleculares vêm sendo utilizadas para fins práticos em programas de melhoramento genético,
63 dentre eles, os marcadores moleculares do tipo microssatélite ou *SSR (Simple Sequence*
64 *Repeats)* destacam-se como uma importante ferramenta na avaliação de composição genética
65 de populações, apresentando ampla distribuição no genoma, natureza codominante e caráter
66 altamente polimórfico; sendo a mesma utilizada em sistemas de monitoramento genético em
67 peixes (BENTSEN;OLESEN, 2002; FESSEHAYE *et al.*, 2006; SILVA,2012; TENEVA,
68 2009). Da mesma forma, estudos que visem a utilização de métodos eficientes e de baixo custo
69 para a obtenção de DNA podem ser considerados de grande relevância científica, visto que
70 possibilita a inclusão de espécies não modelo para seleção genética em virtude do baixo
71 investimento inicial para a obtenção do material genético (PARPINELLI; RIBEIRO, 2009).

72 Dentre as espécies candidatas para inserção futura em programas de melhoramento
73 genético, destaca-se o jundiá (*Rhamdia quelen*), peixe endêmico da América do Sul e de grande
74 importância econômica para a região sul do Brasil, sendo conhecido por suas características

75 zootécnicas favoráveis tais como : rusticidade, hábito alimentar onívoro e facilidade de manejo,
76 além de possuir boa aceitação pelo mercado (BALDISSEROTTO;RADÜNZ NETO, 2004 ;
77 CARNEIRO;MIKOS, 2005; POUHEY *et al.*, 2011).

78 O objetivo deste estudo foi realizar o isolamento de DNA genômico de jundiás oriundos
79 de duas populações selvagens através da utilização de um protocolo de extração de baixo
80 custo, e posteriormente testar a amplificação de *loci* microssatélites tetranucleotídeo
81 específicos para espécie, tendo por escopo contribuir para o conhecimento genético destes
82 plantéis.

83 MATERIAL E MÉTODOS

84 Coleta dos animais

85 Os animais utilizados para o estudo foram oriundos de duas populações selvagens de
86 jundiás, residentes nas Lagoas Mangueira (33°05'27.02''S e 52°46'03.01''O) localizada no sul
87 do Estado do Rio Grande do Sul - Brasil e Mirim (31° 30' a 34° 35' S e 53° 31' a 55° 15' O)
88 (Figura 24) situada na fronteira entre o estado do Rio Grande do Sul e norte do Uruguai, onde
89 a coleta dos peixes foi conduzida por pescadores artesanais atuantes nas duas lagoas e
90 licenciados pelo IBAMA e MAP para exercer a atividade da pesca.

91 **Figura 24 -** Localização das lagoas Mangueira e Mirim.

92
93 Para captura dos jundiás utilizou-se redes de emalhe, sendo a pesca realizada no
94 período da noite durante 12 horas e posterior coleta pela manhã, obtendo-se um total de 80
95 exemplares de jundiás, sendo 40 animais oriundos da Lagoa Mangueira e 40 animais da Lagoa
96 Mirim. Como fonte de material biológico para posterior isolamento de DNA genômico, retirou-
97 se fragmentos de tecido muscular e nadadeira caudal de cada indivíduo coletado (200 300mg),
98 totalizando 160 amostras a fim de estabelecer quais das duas fontes seria mais eficiente
99 para utilização no protocolo de extração de DNA. Os materiais biológicos obtidos foram
100 armazenados em microtubos tipo *ependorf* (1,5mL), contendo etanol 70% e
101 acondicionados a - 20 °C até o momento da extração.

102 **Extração de DNA**

103 Para extração do DNA utilizou-se um protocolo de separação orgânica por Cloreto de
104 Sódio (BARRERO *et al.*,2008) com modificações, que consistiu em três etapas: lise, limpeza e
105 precipitação.

106 Primeiramente realizou-se a maceração da amostra, objetivando a ruptura da parede e
107 membranas celulares, promovendo assim a liberação da molécula de DNA; após adicionou-se

108 as soluções tampão TNE1 (tris HCl 1 Molar pH 8,0, EDTA, NaCl) , tendo por finalidade
109 promover a lise das células, porém preservando sua estrutura, acidez e osmolaridade e TNE2
110 (tris HCl 1 Molar pH 8,0; EDTA, NaCl ; SDS 20%), como solução detergente para solubilização
111 das membranas e auxiliando na inativação de enzimas. Posteriormente as amostras foram
112 incubadas *overnight* a 55°C com proteinase K para a desnaturação proteica. Após incubação,
113 para precipitação de proteínas e restos celulares adicionou-se NaCl 5M; sendo transferido o
114 sobrenadante para novos microtubos, onde foram acrescentados etanol absoluto gelado para a
115 precipitação do DNA e armazenados por 1 hora a -20°C. Após, realizou-se a lavagem do material
116 com etanol 70% gelado, descartando-se a fase líquida das amostras e secando-as em estufa a
117 40°C. Por fim, o DNA foi ressuspendido com água milli-q.

118 A integridade do DNA obtido foi checada por meio de eletroforese horizontal em gel
119 de agarose 1% e tampão SB 1X (H₃BO₃, NaOH) durante 30 minutos a 120 volts. Para tal, usou-
120 se alíquota de 7 µL de DNA sendo o mesmo corado com *GelRed* (Biotium,USA) e visualizados
121 em transiluminador (L-Pix, Loccus Biotecnologia).

122 **Amplificação dos microssatélites**

123 Foram selecionados 8 marcadores microssatélites desenvolvidos anteriormente por
124 RODRIGUES et. al (2015) , no qual a amplificação dos mesmos foi realizada por meio do uso
125 da técnica de reação de PCR (*polymerase chain reaction*), cujo o volume final foi de 25µL,
126 contendo 1µL de DNA genômico, 1,0 µL de cada *primer* (*forward e reverse*), 2,5µL de 10X
127 PCR buffer (*Sigma Aldrich*), 0,5µL de dNTP (10µM), 1,0 µL de JumpStart™ Red taq® DNA
128 Polymerase (*Sigma Aldrich*) e 18,0 µL de água livre de nuclease.

129 As reações foram realizadas em um termociclador *Genetouch*® (*Bioer Technology*),
130 onde a amplificação consistiu em uma desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido
131 por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento conforme a temperatura

132 específica de cada *primer* (Tabela 2) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos,
 133 terminando com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

134 A checagem da amplificação foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a
 135 1%, utilizando uma alíquota de 4 µL de produto de PCR. Após a eletroforese, os produtos
 136 foram analisados em transiluminador sob luz UV e registrados digitalmente.

137

138 **Tabela 2** - Sequências e temperaturas de anelamento dos primers e sequência motif.

<i>Locus</i>	Sequência primers (5'-3')	Sequência motif	Ta (°C)	Tamanho do fragmento (pb)
Rq137981	F: TGACAATAAAGCAAGGTCATTTTCG R: GGGTCTGAATCACCAGTTGC	AAAT	60,5	120-140
Rq155485	F: CTTCATGGTCAGCTGTGAGG R: GTGATGCGTTGCTTTTCGG	TGCG	54,9	120-130
Rq158947	F: CCTGCACTGTGCCAGAAGG R: ATCCATGCGTTTGTCCATGC	TCCG	55,6	140-160
Rq164109	F: TGATACACTGGTGCGAATCC R: TCCACTCTAAACGACACTGATGC	AAAC	57,0	140-160
Rq193810	F: TTACTGAATGATCGATATTATTGACG R: AAAGGATGGATAGTCTCGCC	ATCT	66,0	60-80
Rq51373	F: CACTCCATTGCAGCTTCTTCC R: ATCGAGTGAAATGCAGCAGG	ATGG	61,7	80-100
Rq68040	F: GGTAAAGTGAGCTCAGGCAGG R: GGCGGAGGAGAGAAAGGG	AATG	59,2	120-140
Rq193399	F: TGCTGAACTTCCAAACGTTCC R: GACTAAAGCCGGGACCTTCC	AGTG	54,3	100-120

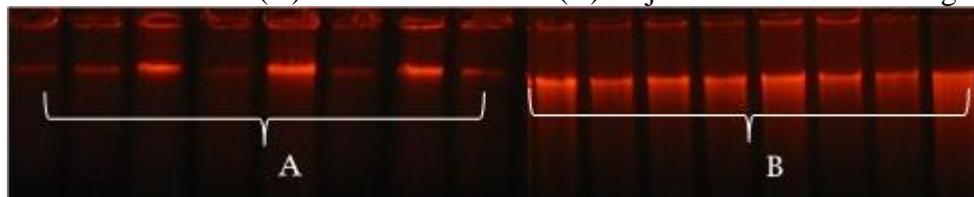
139

RESULTADOS E DISCUSSÃO

140 O protocolo de extração de DNA genômico por NaCl mostrou-se eficiente configurando
 141 em amostras de boa qualidade para as duas fontes de material biológico utilizadas (Figuras 25
 142 e 26). Resultados semelhantes podem ser observados em trabalhos abordando diferentes
 143 espécies de peixes, como pacu (LOPERA-BARRERO *et al.* 2010), peixe-rei (TAVARES *et*
 144 *al.*, 2014), tilápia (BLANCK *et al.* 2009) e carpas (COSTA FILHO *et al.*, 2015) onde os autores
 145 apontam o protocolo NaCl como uma metodologia não-tóxica e de baixo custo, fornecendo
 146 DNA íntegro e sem contaminação, sendo estes requisitos primordiais para análises genéticas

147 que tenham por base a utilização de PCR.

148 **Figura 25** - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo extrações de DNA genômico a partir
 149 de tecido muscular (A) e nadadeira caudal (B) de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.



150

151 **Figura 26** - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo extrações de DNA genômico a partir
 152 de tecido muscular (A) e nadadeira caudal (B) de jundiás oriundos da Lagoa Mangueira.

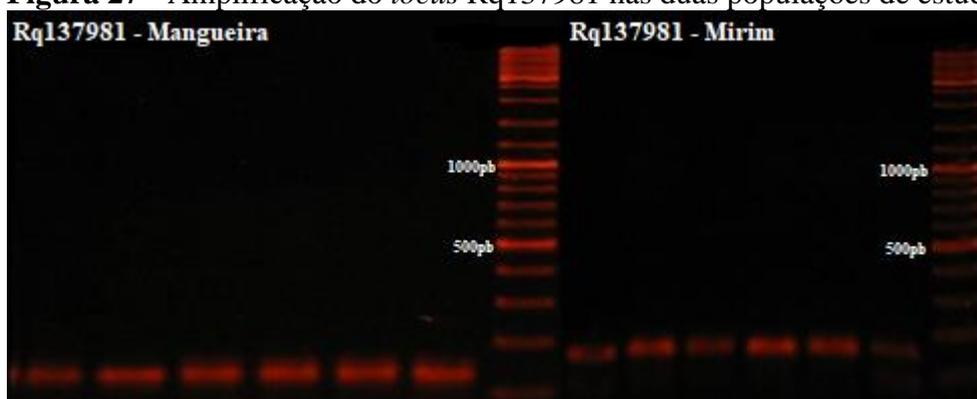


153

154

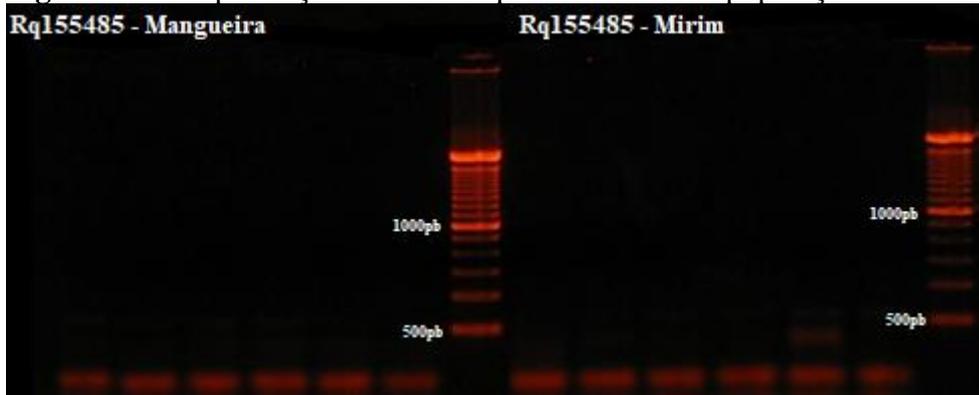
155 Os 8 *loci* microssatélites utilizados neste estudo amplificaram em todos os indivíduos das
 156 duas populações abordadas (Figuras 27;28;29;30;31;32;33 e 34) semelhante ao encontrado
 157 por Rodrigues *et al.* (2015) ao estimar a variabilidade genética de diferentes populações de
 158 *Rhamdia sp.* no qual foram amplificados 6 *loci* microssatélites sendo 2 dinucleotídeo e 4
 159 tetranucleotídeos dentre eles Rq164109, Rq137981, Rq5137 e Rq68040 os mesmos utilizados no
 160 presente estudo, porém avaliando populações em cativeiro.

161 **Figura 27** - Amplificação do *locus* Rq137981 nas duas populações de estudo.



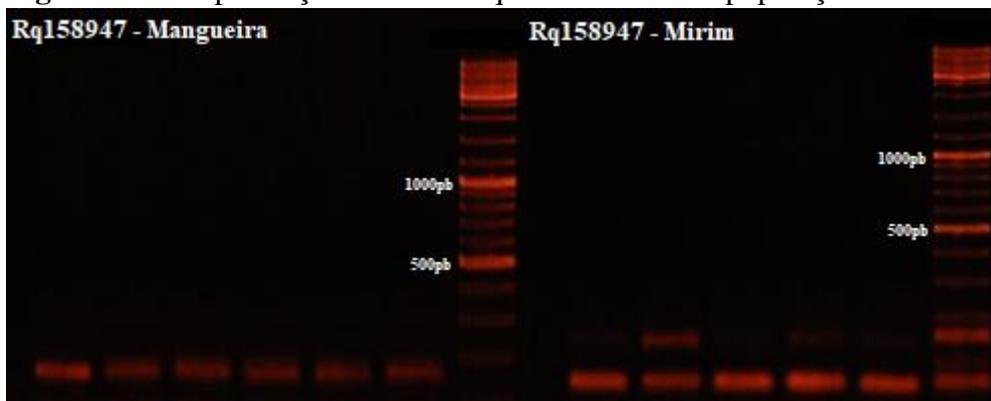
162

163 **Figura 28** - Amplificação do *locus* Rq155485 nas duas populações de estudo.



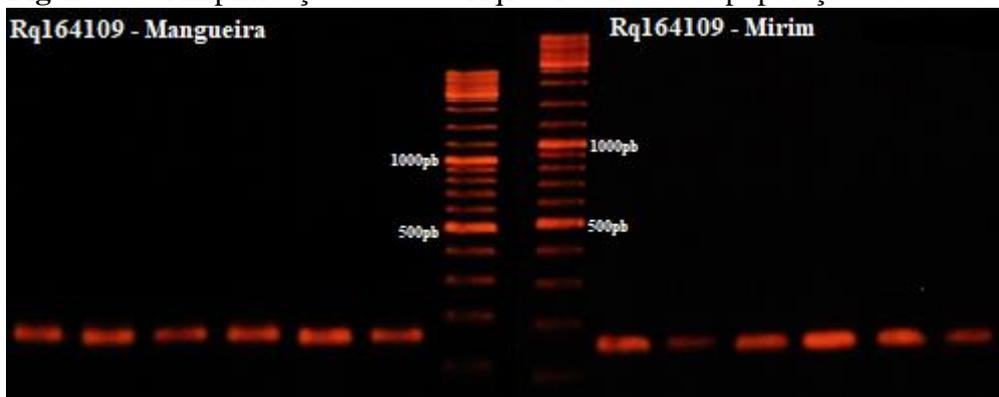
164

165 **Figura 29** - Amplificação do *locus* Rq158947 nas duas populações de estudo.



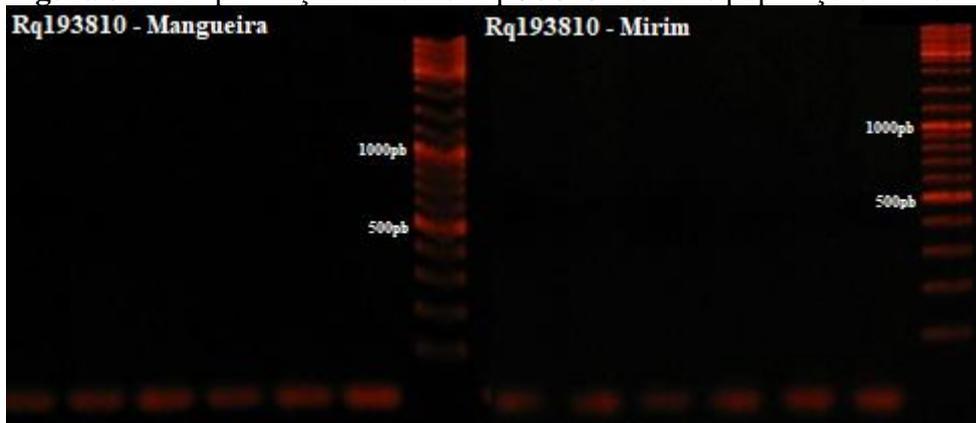
166

167 **Figura 30** - Amplificação do *locus* Rq164109 nas duas populações de estudo.



168

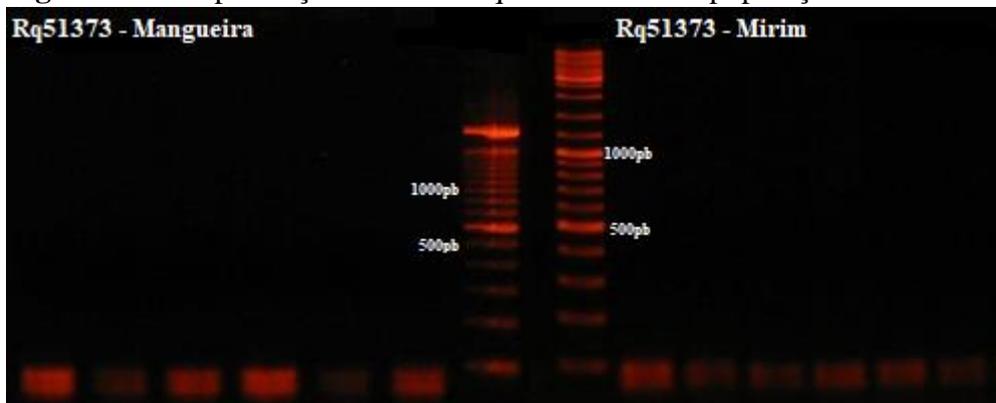
169 **Figura 31** - Amplificação do *locus* Rq193810 nas duas populações de estudo.



170

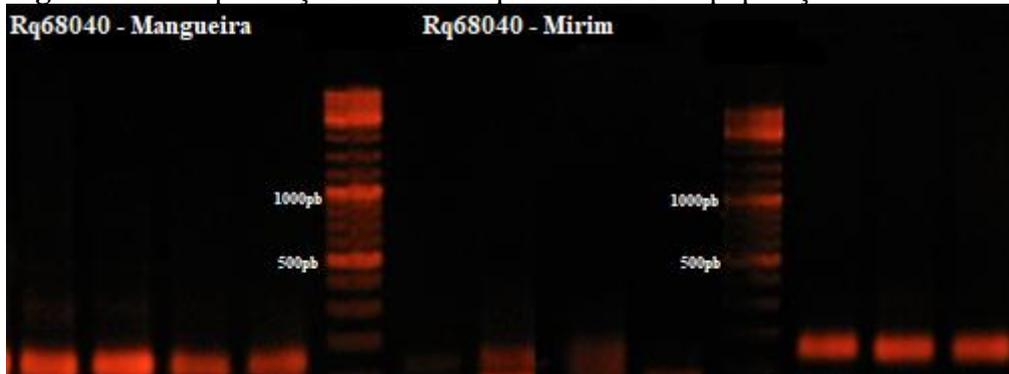
171

172 **Figura 32** - Amplificação do *locus* Rq51373 nas duas populações de estudo.



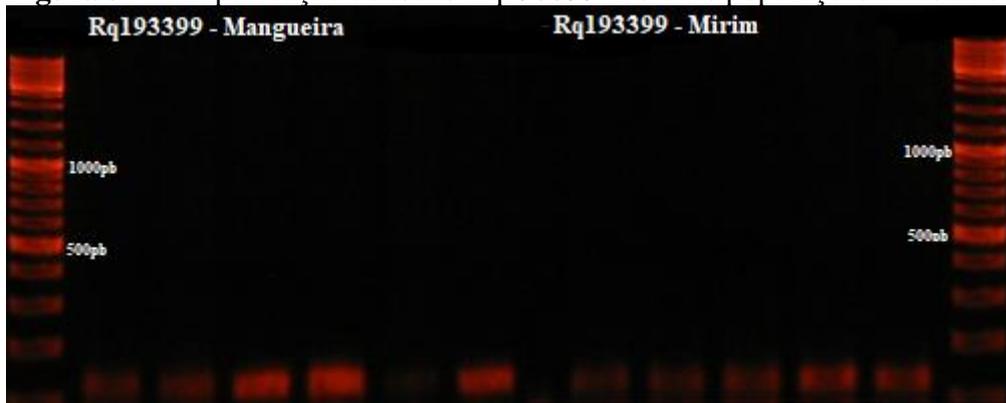
173

174 **Figura 33** - Amplificação do *locus* Rq68040 nas duas populações de estudo.



175

176 **Figura 34** - Amplificação do *locus* Rq193399 nas duas populações de estudo.



177

178 Da mesma forma, ao conduzir um estudo no qual avaliavam a contribuição individual de
 179 machos de *Rhamdia quelen* em fertilização com *pool* de sêmen Ribolli e Zaniboni-Filho
 180 (2009) amplificaram 5 *loci* microssatélites (Pcor 1, Pcor 2, Rh 1, Pc 17 e P 97) todos
 181 dinucleotídeo para populações cativas. Por sua vez, RÍOS *et al.* (2013) validaram 10
 182 microssatélites para populações selvagens de *Rhamdia quelen* oriundas da Laguna del Sauce no
 183 Uruguai, dentre os quais 9 *loci* eram dinucleotídeo e um do tipo pentanucleotídeo.
 184 Evidenciando-se assim a escassez de estudos que abordem à amplificação de marcadores
 185 microssatélites aplicadas a populações naturais e/ ou a carência de um painel microssatélite
 186 unicamente tetranucleotídeo para jundiás, visto que o padrão de qualidade recomendado pelo
 187 *International Society for Forensic Genetics (ISFG)* aponta o motivo tetranucleotídeo o
 188 mais confiável para investigações genéticas, permitindo uma interpretação mais robusta
 189 dos genótipos em comparação aos dinucleotídeos (KISHINE; TSUTSUMI; KITTA, 2017).
 190 Além disso, BACHER *et al.* (1999) relata que a utilização de microssatélites dinucleotídeos
 191 podem acarretar em uma maior incidência de artefatos de amplificação, tais como bandas tipo
 192 *stutters* durante a reação de PCR, dificultando sua interpretação e posterior genotipagem.

193

CONCLUSÃO

194

195

196

Com base nos resultados expostos, o protocolo de extração empregado mostrou-se eficaz para isolamento de DNA genômico em jundiás, não havendo alteração na qualidade do mesmo com o uso de diferentes fontes biológicas. De igual forma, a amplificação dos *loci*

197 microssatélites tetranucleotídeo foram satisfatórias nas duas populações abordadas, sendo de
 198 vital importância como embasamento para que mais estudos abordando a caracterização
 199 genética de jundiá sejam realizados.

200 REFERÊNCIAS

- 201 BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. 1 ed. Santa Maria. UFSM,
 202 2004.232p.
- 203 BARRERO, N.M.L *et al.* Comparison of DNA extraction protocols of fish fin and larvae
 204 samples:modified salt (NaCl) extraction. **Ciencia e Investigacion Agraria**, v.35, n.1, p. 65-
 205 74. 2008
- 206 BENTSEN, H.B.; OLESEN, I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high
 207 inbreeding rates. **Aquaculture**, v.204, n.3-4, p. 349-359. 2002
- 208 BLANCK, D.V. *et al.* Polimorfismo do gene GH1- PstI associado a características corporais
 209 de linhagens de tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.44, n.6, p.599- 604.
 210 2009.
- 211 CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de
 212 jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, v.35, n.1, p.187-191. 2005
- 213 COSTA FILHO, J. *et al.* Efficiency of DNA extraction from different carp tissue using the
 214 sodium chloride (NaCl) protocol. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, v.14, n.1, p.84-88.
 215 2015.
- 216 FAO – Food and Agriculture Organization. Fisheries and Aquaculture Department. Th
 217 e state of world fisheries and aquaculture. Rome, 530p. 2016.
- 218 FESSEHAYE, Y. *et al.* Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia
 219 (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture**, v.256, n.1,
 220 p.148- 158. 2006.

- 221 SILVA, M.B. Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and
222 challenges. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**, v.34 n.1, p. 157- 163. 2012.
- 223 SUNDARAY, J.K. *et al.* Simple sequence repeats (SSRs) markers in fish genomic research
224 and their acceleration via next-generation sequencing and computational approaches.
225 **Aquaculture International**, v.24, n.1, p.1089–1102.2016.
- 226 TAVARES, R.A. *et al.* Identification of microsatellite loci with amplification potential in
227 "pejerrey" (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e**
228 **Zootecnia**, v. 66, n.6, p.1941-1945. 2014
- 229 TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal**
230 **Husbandry**, v.25, n.5-6, p.1267-1284. 2009.
- 231 KISHINE, M.; TSUTSUMI, K.; KITTA, K. A set of tetra-nucleotide core motif SSR markers
232 for efficient identification of potato (*Solanum tuberosum*) cultivars. **Breeding Science**. v.67,
233 n. 1, p.544–547.2017.
- 234 LOPERA- BARRERO, R.P. *et al.* Avaliação genética de populações naturais e de estoques
235 de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores
236 microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.4, p. 954-
237 963. 2010.
- 238 PARPINELLI, R.S.; RIBEIRO RP. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA
239 em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science**
240 **Technology**, v.2, n.1, p. 22-33. 2009.
- 241 PETERSEN, R.L. *et al.* Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de
242 Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microssatélites. **Boletim Instituto da Pesca**,
243 v.38, n.4, p.313 –321. 2012.
- 244

- 245 POUEY, J. L. O. F. *et al.* Desempenho produtivo de juvenis de jundiá (*Rhamdia sp.*)
246 submetidos a diferentes densidades de estocagem. **ARS veterinária**, v.27, n.4, p.241-245.
247 2011.
- 248 RIBOLLI, J.;ZANIBINI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of
249 silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n.4, p. 629-634. 2009.
- 250 RÍOS, N. *et al.* Pyrosequencing for microsatellite discovery and validation of markers for
251 population analysis in the non-model neotropical catfish *Rhamdia quelen*. **Molecular Ecology**
252 **Resources**,v. 13,n.1 ,p.546-549. 2013.
- 253 RODRIGUES, M.D.N. *et al.* Development of microsatellite for use in breeding catfish,
254 *Rhamdia sp.* **African Journal of Biotechnology**, v.14, n.5, p.400-411. 2015.

6 Considerações Finais

Com base nos resultados obtidos até a presente etapa deste projeto, as extrações de DNA genômico bem como os 8 *loci* microssatélites testados para amplificação nas duas populações abordadas neste estudo mostraram-se eficientes, demonstrando qualidade e robustez para utilização como material embasador das etapas subsequentes deste trabalho, que abrangerão genotipagem dos indivíduos e posterior avaliação da variabilidade genética intra e interpopulações.

Referências

ALI, B.A.; HUANG, T.H.; QIN, D.N.; WANG, X.M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish Research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 14, p. 443-453, 2005.

ALMEIDA, I.G. Prospecção de marcadores moleculares sexo-específicos e análise de estrutura populacional de pirarucu (*Arapaima gigas*) na região de Santarém, Pará. 2012.110f. **Dissertação (Ciências Animais)**. Universidade de Brasília. Brasília- DF.

AQUACULTURE. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations - **FAO, Fisheries and Aquaculture Department**. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/aquaculture/en>>. Acesso em: mar. 2015.

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

ARTIOLI, L.G.S., VIEIRA, J.P., GARCIA, A.M., BEMVENUTI, M.A.. Distribuição, dominância e estrutura de tamanhos da assembleia de peixes da lagoa Mangueira, sul do Brasil. Iheringia, Sér. Zool., Porto Alegre, 99(4):409-418, 30 de dezembro de 2009.

BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Ed. UFSM, 232p.2004.

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

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

BENTSEN, H.B. and OLESEN, I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**. V. 204, p. 349-359, 2002.

BLANCK, D.V.; GASPARINO, E.; RIBEIRO, R.P.; MARQUES, D.S. Polimorfismo do gene GH1- PstI associado a características corporais de linhagens de tilápia do Nilo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**. v. 44, p. 599- 604, 2009.

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

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

CARNEIRO, P.C.F.; MIKOS, J.D. Frequência alimentar e crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**. v. 35, p.187-191,2005

CASTOE, T. A., POOLE, A. W. ;KONING, A. P. J.; JONES, K. L.; TOMBACK, D. F.; OYLER-MCCANCE, S.J.,FIKE, J. A.,LANCE S. L. ;STREICHER J.W.;SMITH & D. D E. N.. Pollock.Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, v.7, n.2,2012

DELANEY, P. J. V. Fisiografia e geologia da superfície da Planície Costeira do Rio Grande do Sul. **Publicação Especial da Escola de Geologia UFRGS**. v. 6, p. 1-195, 1965.

DOMINGUES, R.R.. Identificação molecular, biologia e pesca de tubarões do gênero *carcharhinus* (*Chondrichthyes – Carcharhiniformes*): uma contribuição para a gestão da pesca do estado de São Paulo, Brasil. 2001.71f. **Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca)** Instituto de Pesca APTA-SAA.São Paulo-SP.

EDWARDS,A., CIVITELLO,A,; HAMMOND,H.A.; CASKEY,C.T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats,**The American Journal of Human Genetics**, vol. 49, no. 4, pp. 746–756, 1991. 39

ELER, J.P.. **Teorias e métodos em melhoramento animal I-** Bases do melhoramento genético animal. UNESP – Pirassununga, p.1- 3. 2014.

FAO, 2006. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Disponível em <<http://www.fao.org.br/>>. Acesso em 08 de maio de 2015.

FAO – Food and Agriculture Organization. **Fisheries and Aquaculture Department. The state of world fisheries and aquaculture.** Rome: FAO. 530p, 2016.
FAO, **The State of World Fisheries and Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department,** Roma, p.21-23.2012

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

FESSEHAYE, Y.; EL-BIALY, Z.; REZK, M.A.; CROOIJMANS, R.; BOVENHUIS, H.; KOMEN, H. Mating systems and male reproductive success in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) in breeding hapas: a microsatellite analysis. **Aquaculture** v. 256, p.148- 158,2006.

FREELAND, J. R..**Molecular Ecology.** Chichester: John Wiley & Sons, Ltd. PMCid:548581.2005

FIA, R.; MATOS, A. T.; CORADI, P. C.; RAMIREZ, O. P. Estado trófico da água na bacia hidrográfica da Lagoa Mirim, RS, Brasil. **Revista ambiente e água – Na Interdisciplinary Journal of Applied Science,** Taubaté, v. 4, n. 1. p. 132-141, 2009.

FILHO, J.C.; FABREGAT, T. E. H. P.; HERKENHOFF, M.; PALIDO, E.; BATILLANA, J.; GUIDOLIN A. Efficiency of DNA extraction from different carp tissue using the sodium chloride (NaCl) protocol . **Revista de Ciências Agroveterinárias.** v.14, p. 84-88, 2014.

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

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

IBAMA. **Estatística da pesca Brasil: grandes regiões e unidades da federação,** Brasília, 2007. 174p

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística **Levantamento de recursos naturais**: folha SH.22 Porto Alegre e parte das folhas SH.21 Uruguaiana e SI.22 Lagoa Mirim. Rio de Janeiro, v.33, p. 791, 1986.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária municipal**. Rio de Janeiro, v. 41, p.34,54, 2013.

JICA/SCP - RS. The Study on the Environmental Management of the Hydrographic Basin of Patos and Mirim Lakes in the Federative Republic of Brazil: Final Report. **Kokusai Kogyo/Pacific Consultants International**, v. 4, 2000.

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

LOPERA- BARRERO, R.P. ;RIBEIRO , J.A.; POVH , R.N. ; SIROL , C.A.; MANGOLIN. Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.v. 62, p. 954-963, 2010.

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

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

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

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

PARPINELLI, R.S.e RIBEIRO RP. Estudo comparativo de protocolos de extração de DNA em diferentes tecidos de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). **Global Science Technology**, v. 2, p. 22-33, 2009.

PETERSEN, R.L; GARCIA, J.E.; MELLO, G.; LIEDKE, A.M.R.; SINCERO, T.C.M.; GRISARD, E.C. Análise da diversidade genética de tilápias cultivadas no estado de Santa Catarina (Brasil) utilizando marcadores microsatélites. **Boletim Instituto da Pesca**, v.38,p. 313 – 321, 2012.

POUEY, J. L. O. F.; PIEDRAS, S. R. N.; ROCHA, C. B. ; TAVARES,R. A. ; SANTOS, J. D. M.; BRITTO, A. C. P. Desempenho produtivo de juvenis de jundiá (*Rhamdia sp.*) submetidos a diferentes densidades de estocagem. **ARS Veterinária**. v.27, p. 241-245, 2011.

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

RIBOLLI, J. E ZANIBINI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen* .Neotropical Ichthyology. v. 7, p.629-634. 2009.

RÍOS, N.; BOUZA, C.; PARDO, B.G.; GUERRA-VARELA, J.; GUTIERREZ, V.; MARTINEZ, P. & GARCÍA, G. Pyrosequencing for microsatellite discovery and validation of markers for population analysis in the non-model Neotropical catfish *Rhamdia quelen*. **Molecular Ecology Resources**. v.13, p .546-549,2013.

RODRIGUES, M.D.N.; MOREIRA, C.G.A.; GUTIERREZ,H.J.P.; ALMEIDA,D.B.; STREIT JR.,D.; MOREIRA,H.L.M.. Development of microsatellite for use in breeding catfish, *Rhamdia sp.***African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 400-411.2015.

SCHÄFER, A. **Fundamentos de ecologia e biogeografia de águas continentais**. Porto Alegre, UFRGS,. 532 p. 1984.

SILVA,M.B. Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and challenges. **Estudos de Biologia: Ambiente e Diversidade**. v. 34, p.157- 163, 2012.

SOUSA,A.B.;CARVALHO, D.C.; MELO,D.C.; SEERIG,A.S.; OLIVEIRA, D.A.A.;RIBEIRO, L.P.; TEIXEIRA, E.A.; CREPALD, D.V.; FARIA, P.M.C. A utilização

de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, n. 3/4, p. 100-104, 2006.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p.199-203, 2000.

TAUTZ, D..Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. vol. 17, no. 16, pp. 6463–6471, 1989.

TAVARES, R.A. Estudo genético de duas populações de *Odontesthes bonariensis* através de marcadores microsatélites.2010.70 f.**Dissertação (Programa de Pós Graduação em Zootecnia /Melhoramento Animal)** .Universidade Federal de Pelotas. Pelotas-RS. 2010.

TAVARES, R.A.; PIEDRAS, S.R.N.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B.; MOREIRA, C.G.A.; FERNANDES, J.M. ; FREITAS, S.F. ; MOREIRA, H.L.M. ; POUHEY, J .L. .F. ; DIONELLO, N.J.L Identification of microsatellite loci with amplification potential in "pejerrey" (*Odontesthes humensis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 66, p.1941-1945. 2014

TENEVA, A. Molecular markers in animal genome analysis. **Biotechnology in Animal Husbandry**. v.25, p.1267-1284, 200

TENÓRIO, K.E.R.. Avaliação da estrutura genética e populacional do camarão de água doce em extinção, pitu (*Macrobrachium carcinus*), no Nordeste como ferramenta para apoiar programas de repovoamento.2012.68f **Dissertação (Programa de Pós Graduação em Genética)**. Universidade Federal de Pernambuco.Recife-PE.

TOMAZELLI, L. J. & VILLWOCK, J. A. Mapeamento Geológico de Planícies Costeiras: O Exemplo da Costa do Rio Grande do Sul. **Gravel**, v. 3, p. 109-115, 2005.

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

VAN VLECK, L.D. Selection when traits have different genetic and phenotypic variances in different environments. **J. Dairy Sci.**, v.70, p.337-344, 1987.

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

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

WU, B.; YANG, A.; CHENG, N.; SUN, X.; LIU, Z.; ZHOU, L. Studies on genetic diversity of selected population of hybrid scallop *Chlamys farreri* (♀) × *Patinopecten yessoensis* (♂) by microsatellites markers. **Journal of Molecular Biology Research**; Published by Canadian Center of Science and Education. v.5, n. 1, p.39-44. 2015.