



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECONCAVO DA BAHIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS & BIOLÓGICAS  
ENGENHARIA DE PESCA

CLAUDIVANE DE SÁ TELES OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) CULTIVADAS  
EM ESTAÇÕES DE PISCICULTURA DA BAHIA PESCA, BAHIA

CRUZ DAS ALMAS

2016

CLAUDIVANE DE SÁ TELES OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma Macropomum*, CUVIER, 1818) CULTIVADAS  
EM ESTAÇÕES DE PISCICULTURA DA BAHIA PESCA, BAHIA

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Soraia Barreto A. Fonteles, D.Sc

CRUZ DAS ALMAS

2016

CLAUDIVANE DE SÁ TELES OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CUVIER, 1818) CULTIVADAS EM ESTAÇÕES DE PISCICULTURA DA BAHIA PESCA, BAHIA

Este Trabalho de Conclusão de Curso submetido à Coordenação do Curso de Graduação em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, como necessário à obtenção do grau de Bacharel em Engenharia de Pesca, outorgado pela Universidade Federal do Recôncavo da Bahia,

Data de aprovação 19 / 02 / 2016



Prof. Soraia Barreto A. Fonteles, D.Sc

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

(Orientadora)



Prof. Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira, D.Sc

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia



Darcilúcia Oliveira do Carmo de Almeida, D.Sc

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

*“Não to mandei eu? Sê forte e corajoso!*

*Não se apavore nem desanime, por que o Senhor, o seu Deus,*

*estará com você por onde você andar”*

*Josué 1:9(ARA)*

## Agradecimento

Primeiramente agradeço a Deus, o centro e o fundamento de tudo em minha vida, por renovar a cada momento a minha força e disposição e pelo discernimento concedido ao longo dessa jornada. Por isso lutar, conquistar, vencer e até mesmo cair e perder, e o principal, viver é o meu modo de agradecer sempre.

Aos meus pais, Venilson e Valdice, por sempre me incentivar na constante busca pelo conhecimento não medindo esforços para que eu tivesse a melhor educação possível. A minha irmã Cacau e meu irmão Venâncio, pelo carinho, atenção e apoio durante minha graduação. Aos meus familiares pelo apoio e suporte quando foi preciso. Ao meu amor, Dony Soares, pelo companheirismo durante todo esse tempo.

À minha querida e amável Orientadora Dra. Soraia Fonteles, pela dedicação, ensinamentos, pela confiança depositada em mim durante este trabalho e acima de tudo por me instigar no desenvolvimento das pesquisas.

À Darcilúcia de Almeida, bolsista CAPES do Programa Nacional de Pós-Doutorado, pelas contribuições concedidas, pelas palavras de apoio e sobretudo por cada imperativo utilizado, os quais me permitiram grande crescimento.

À Laís Novaes, por toda paciência para conceder a mim seu conhecimento, pelo auxílio, pelo tempo dedicado.

Aos docentes do curso Engenharia de Pesca, pela convivência harmoniosa, pelas trocas de conhecimento e experiências que foram tão importantes na minha vida acadêmica/pessoal. E contribuíram para o meu novo olhar profissional

Aos meus colegas do Laboratório Análise Genética de Organismos Aquáticos - LAGOA: Milena, Rodrigo, Rafael Bittencourt, Rafael Leite, Jenildo, Vitória e PIBIC's – Ensino Médio, pelo conhecimento compartilhado, apoio nas atividades laboratoriais e momentos de descontração.

A Bahia Pesca em especial aos gerentes das estações de Piscicultura Paulo Reis, Felipe e Hegel Rafael pela colaboração.

Ao Prof<sup>o</sup> Ricardo Franco Cunha Moreira, pelo auxílio nas análises estatísticas.

Ao Núcleo dos Estudos em Insetos – INSECTA da UFRB em particular ao Dr. Carlos Alfredo Lopes Carvalho e a Flaviane Souza, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Agrárias da UFRB (CCAAB), pela confiança ao me possibilitar as análises de DNA em seu laboratório .

Aos meus colegas de Graduação, em especial a turma de 2010, pela cumplicidade do dia a dia.

À republica LOUKASA e os que dela se sentem membro pela companhia e afeto.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, o meu MUITO OBRIGADA!

## RESUMO

A espécie *Colossoma macropomum*, popularmente conhecida como tambaqui, é um peixe nativo da região neotropical brasileira que se destaca na aquicultura nacional como maior espécie nativa cultivada. Tal espécie é de grande importância na aquicultura baiana uma vez que é a segunda espécie mais distribuída pela estatal Bahia Pesca. Este trabalho objetivou avaliar a diversidade genética em três estoques de tambaqui de diferentes estações de Piscicultura da Bahia Pesca, por meio do marcador ISSR. Foram utilizados 5 iniciadores para analisar 75 indivíduos coletados na piscicultura de Pedra do Cavalo, JoanesII/Camaçari e Paraguaçu/Boa vista do Tupim. Foram encontradas diferenças na frequência de 62 fragmentos. Observou-se moderados valores de polimorfismo (43,1% a 63,64%), diversidade de Nei (0,1462 a 0,2017) e índice de Shannon (0,2465 a 0,3083). A análise de variância molecular, demonstrou que a maior variação está intrapopulacional (75,08%) e não interpopulacional (24,92%). A diferenciação genética foi moderada de ( $F_{st}=0,24919$ ) e o número de migrante por geração foi baixo (2,3). Os estoques apresentam moderada variabilidade genética e baixa diferenciação e distância genética entre si.

**Palavras chave:** Genética de populações, Marcadores moleculares, Fluxo gênico, Aquicultura.

## **ABSTRACT:**

The species *Colossoma macropomum*, popularly known as tambaqui, it is a fish native to the Brazilian neotropical region that stands out in the national aquaculture as most native species cultivated. This species is of great importance in Bahia aquaculture since it is the second most species distributed by the state Bahia Pesca. This study aimed to evaluate the genetic diversity in three tambaqui stocks of different fish farming stations Bahia Pesca, through ISSR marker. They used 5 primers to analyze 75 individuals collected in the fish farming Pedra do Cavalo, JoanesII / Camaçari and Paraguaçu / Boa Vista do Tupim. Differences were found at a frequency of 62 fragments. There was moderate polymorphism values (43.1% to 63.64%), the diversity of Nei (0.1462 to 0.2017) and Shannon index (0.2465 to 0.3083). The analysis of molecular variance, demonstrated that the greatest variation is intrapopulacional (75.08%) and non interpopulacional (24.92%). Genetic differentiation was moderate ( $F_{ST} = 0.24919$ ) and the number of migrants per generation was low (2.3). Inventories have high genetic variability and short differentiation and genetic distance between them.

**Keywords:** Population Genetics, Molecular markers, gene flow, Aquaculture

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Especificação quanto ao local de coleta e classificação etária das amostras de <i>C. macropomum</i> .....	23
<b>Tabela 2.</b> Primers utilizados para amplificação de DNA da espécie <i>Colossoma macropomum</i> .....	27
<b>Tabela 3.</b> Iniciadores ISSR selecionados na análise de variabilidade genética entre as diferentes populações da espécie <i>Colossoma macropomum</i> e suas características moleculares.....	29
<b>Tabela 4.</b> Distância genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as populações da espécie <i>C. macropomum</i> .....	30
<b>Tabela 5.</b> Diversidade genética entre populações de tambaqui cultivado em estações da Bahia Pesca.....	30
<b>Tabela 6:</b> Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para populações da espécie <i>C. macropomum</i> .....	31
<b>Tabela 7:</b> Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie <i>Colossoma Macropomum</i> .....	32

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Dentição do Tambaqui: pré-maxiliares bem desenvolvidos. ....	15
<b>Figura 2.</b> Características externas tambaqui: a) Juvenil de <i>C. macropomum</i> com 10,5 cm de comprimento total; b) Reprodutor de <i>C. macropomum</i> .....	16
<b>Figura 3</b> Atividades desenvolvidas pela Bahia Pesca/SA: a) Bolsas para peixamento; b) Povoamento de áreas; c) Cursos de capacitação.....	18
<b>Figura 4.</b> Vista panorâmica da Estação de Piscicultura Joanes II/Camaçari.....	18
<b>Figura 5.</b> Vista panorâmica da Estação de Piscicultura Pedra do Cavalo (Rodolpho Von Inhering). .	19
<b>Figura 6:</b> Vista panorâmica da Estação de Piscicultura Paraguaçu/Boa Vista do Tupim.....	20
<b>Figura 7.</b> Coleta de material biológico: a) borrifando local com álcool 70%;; b) coleta c) Inserção do material em tubo tipo eppendorf.....	24
<b>Figura 8.</b> Extração de DNA. a) Preparação para etapa de lise; b) Purificação; c) Material após precipitação na centrifuga .....	25
<b>Figura 9.</b> Dendrograma derivado através de UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) das populações de <i>C. macropomum</i> baseado na distância genética de Nei (1972). ....	31

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2. REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
<b>2.1 Aquicultura</b> .....	12
<b>2.2 Biologia da Espécie</b> .....	13
<b>2.3 A Bahia Pesca</b> .....	17
<b>2.4 Marcadores Moleculares</b> .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	22
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	22
<b>4. MATERIAS E MÉTODOS</b> .....	23
<b>5. RESULTADOS</b> .....	29
<b>5.1 Reação ISSR-PCR</b> .....	29
<b>5.2 Estrutura Populacional e Diversidade Genética das Populações</b> .....	29
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	33
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	37
<b>8. REFERÊNCIAS</b> .....	38
<b>9. ANEXOS</b> .....	45

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura é o setor de produção de alimentos de origem animal com o maior crescimento, sendo que essa esfera vem aumentando em números e expandindo fronteiras ano após ano. Entre os anos de 1980 a 2012, a produção mundial de peixes proveniente da aquicultura veio aumentando a uma taxa média anual de 8,6% (FAO, 2014).

Uma rica biodiversidade de peixes com grande potencial para produção em larga escala, acompanhado de excelentes recursos naturais tornam o Brasil uma potência promissora na produção de organismos aquáticos. Em nosso país, a maioria dos cultivos é desenvolvido com a utilização de espécies exóticas, principalmente a tilápia com 46% da piscicultura continental (MPA, 2013), que passou por programas de melhoramento genético. Este cenário é relativamente admirável e demonstra a carência por projetos de melhoramento genético com enfoque nas espécies nativas.

Kubitza (2004) em sua coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui resalta a importância do número efetivo de estudos científicos quanto aos aspectos biológicos e de cultivo do gênero *Colossoma* tanto no Brasil quanto em países vizinhos como Peru, Venezuela e Colômbia. Tais estudos se encontram acessíveis em revistas científicas, livros nacionais e internacionais, anais de simpósios e congressos, além de outros meios. De forma equivalente, o conhecimento empírico também se desenvolveu nas pisciculturas em todo território nacional.

Existem vários fatores que favorecem o cultivo de tambaqui, como a fácil obtenção de juvenis, o elevado potencial de crescimento, a alta produtividade, sua rusticidade e, sobretudo a adaptação a criação em cativeiro além da fácil aceitação as rações comerciais (ARAÚJO-LIMA E GOULDING, 1998, KUBITZA 2004; FARIAS et al., 2013). Deste modo, o desejo de se estabelecer um pacote tecnológico para cultivo da espécie tornou-se elevado (GOMES et al., 2003; JACOMETO, 2010).

Devido a sua valorização econômica nacional, a espécie *C. macropomum* foi inserida no programa brasileiro de melhoramento genético, coordenado por várias instituições de pesquisas sendo oito unidades da Embrapa, dez universidades federais, três estaduais, uma universidade norte-americana e centros de pesquisa e

iniciativa privada. Tal programa alavancou estudos sobre o melhoramento genético na aquicultura brasileira (RESENDE 2011; RIBEIRO, 2011).

Os processos de domesticação e a maioria dos sistemas de cultivo de animais levam à perda natural de variabilidade genética dos estoques ainda que este fator seja crucial em programas de melhoramento genético (LOPES et al., 2009; EMBRAPA, 2012). A piscicultura brasileira tem uma forte tendência de formação dos plantéis de matrizes por peixes que possuem baixa variabilidade genética ou alto grau de parentesco, bem como um número reduzido de espécimes.

Phinchongsakuldit et al. (2013) afirmam que para o desenvolvimento da aquicultura e formulação de políticas direcionadas a gestão e conservação da pesca torna-se necessário o conhecimento genético de populações selvagens, bem como informações sobre a diversidade genética dessas populações. Estes princípios são componentes essenciais para o início de qualquer programa de melhoramento genético no desenvolvimento de estoques domesticados para a aquicultura.

A variabilidade genética de um plantel de reprodutores pode ser estimada por meio da análise de DNA através de marcadores genéticos (EMBRAPA, 2012). Esse tipo de avaliação permite estimar o grau de parentesco entre os indivíduos em decorrência de comparações de variações nas sequências de DNA.

Devido ao aumento de estoques de peixes e dada a importância da variabilidade genética em programas de melhoramento, o monitoramento genético dos estoques de reprodutores é fundamental, e a utilização dos marcadores moleculares como ferramenta para esse propósito tem se mostrado eficiente (WASKO et al., 2004; HISDORF et al., 2006, LOPES et al., 2009).

No presente estudo caracterizou-se a variabilidade genética decorrente de três populações de *C. macropomum* nas estações de piscicultura da Bahia Pesca/SA uma vez que investimentos em pesquisas deste cunho tendem a fornecer estratégias de monitoramento, manejo e conservação genética destes estoques que são de grande importância para o desenvolvimento da aquicultura no estado da Bahia.

## **2. REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Aquicultura**

A aquicultura é uma atividade tradicional, desenvolvida em várias culturas mundialmente. Há comprovações históricas evidenciando a técnica em documentos e manuscritos chineses datados de séculos 5 a.C com espécies marinhas, sendo a piscicultura citada em hieróglifos egípcios do Reino Médio (2052-1786 a.C) e a ostreicultura mencionada em registros romanos (FARIAS et al., 2013; AQUAONLINE, 2014). Praticada de forma bem simples e diferente da técnica adotada hoje onde apenas se condicionava exemplares em ambientes propícios, sem muita preocupação com insumos e recursos externos (CYPRINO et al.,1997; OLIVEIRA, 2009; AQUAONLINE, 2014).

Tradicionalmente definida como o cultivo de organismos aquáticos sejam eles plantas aquáticas, moluscos, crustáceos, peixes e reptéis em áreas costeiras e interiores que envolvem manejo durante o processo de criação para aumentar a produção e rentabilidade, a aquicultura é provavelmente o setor industrial ligado à produção de alimentos com mais rápido crescimento (FAO, 2016).

Diferente da pesca onde há exploração de recursos naturais de propriedade públicas, o cultivo de organismos aquáticos, possibilita produtos mais homogêneos com regularidade e com possibilidade de rastreio durante toda cadeia (OLIVEIRA, 2009; EMBRAPA, 2015).

Segundo o Ministério da Pesca e da Aquicultura (MPA, 2013), a produção aquícola nacional alcançou no ano de 2011 o volume de 628 mil toneladas e a pesca extrativa 800 mil toneladas, representando 1,4 milhão de toneladas de pescados por ano. Em comparação com o levantamento realizado no ano anterior, a produção de espécies cultivadas aumentou 31% e a da pesca extrativa 2%. O desenvolvimento da aquicultura é alavancado basicamente pela piscicultura continental, que cresceu 38,1% no mesmo período e representa 86,6% do volume cultivado.

Com recursos hídricos em abundancia, um clima tropical e espécies piscícolas, o Brasil possui um grande potencial para a produção de peixes, sem concorrer em espaço físico com a agropecuária (CYPRINO et al.,1997). Apesar de todas essas conveniências antes de dar início a atividade alguns fatores devem ser levados em consideração como a necessidade de um mercado favorável, aceitação

da localidade e disponibilidade de evacuação da produção torna-se necessário, outro fator é a disponibilidade de alevinos, insumos, equipamentos, serviço de assistência e controle sanitário e mercado financeiro favorável. Desse modo indicadores econômicos favoráveis são cruciais para obtenção de lucros na atividade (SEBRAE, 2013).

Há vários fatores que favorecem o cultivo de tambaqui, como a fácil obtenção de juvenis, o elevado potencial de crescimento, a alta produtividade, sua rusticidade e sobretudo a adaptação a criação em cativeiro além da fácil aceitação as rações comerciais (ARAÚJO-LIMA & GOULDING, 1998; KUBITZA, 2004; JACOMETO et al., 2010).

Em contraste com as populações selvagens, os estoques de tambaqui estão aumentando em decorrência da atividade piscícola, caracterizando-a como as espécies nativas ocorre mais comumente produzida no Brasil com 88,719 toneladas em 2013, representando 22,6 % da produção total, atrás apenas da tilápia (169,306 toneladas). A região nordeste produziu 12.771 toneladas de tambaqui em 2013, representando 14,39% do total produzido no país (IBGE, 2014).

## **2.2 Biologia da Espécie**

### **ORDEM CHARACIFORMES**

A incerteza quando o histórico evolutivo dos peixes da ordem Characiformes persiste até os dias de hoje. Os peixes que agrupam essa ordem estão entre os mais diversos e abundantes componentes de água doce do mundo, mais de 1700 espécies descritas, distribuídas em 18 famílias que habitam a região neotropical e a África (PEREIRA, 2010; OLIVEIRA et al., 2011; MOTA, 2015; ESCHMEYER & FONG, 2015). Representantes desta ordem são encontrados em águas continentais do sul dos Estados Unidos, México, América central e do Sul e no África (MOREIRA, 2007).

São encontrados em variados ambientes desde lênticos até os lóticos com espécies que em período reprodutivo sobem rios em situações extremas até mesmo transportando quedas d'água por salto.

A diversidade de tamanhos se torna notável uma vez que nesta ordem encontram-se espécies que não ultrapassam 26 mm como é o caso da *Xenoribrucon polyancistrus*, até espécies que alcançam um metro de comprimento como comprovado com *Hydrocynus vittatus*.

A variedade no habito alimentar também é marcante nesta ordem nela encontramos algumas espécies iliofagas como é a *Prochilodus lineatus*; predadoras *Pygocentrus piraya*; herbívora *Colossoma macropomum*; e até mesmo espécies que se alimentam de escama e nadadeira de outros peixes *Catoprion mento* e *Phago loricatus*, respectivamente.

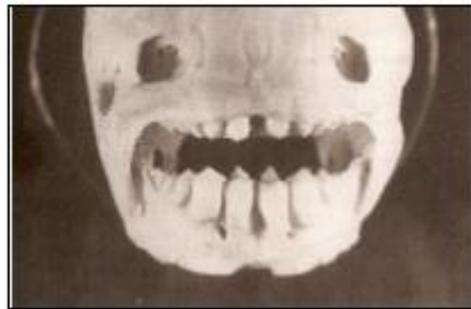
Possuem notável importância ecológica, em função da sua diversidade e abundância, além de muitos serem comercialmente importantes na aquicultura e na pesca para produção de alimento e na aquariofilia na produção de peixes ornamentais (MALABARBA & WEITZMAN 2003; OYAKAWA, 1998).

Moreira (2007) ressalta a dificuldade quanto ao conhecimento filogenético entre os subgrupos desta ordem ainda que a mesma possua uma ampla história taxonômica. A grande diversidade morfológica, ainda que a morfologia externa seja ínfima em alguns grupos, é apontada como principal dificuldade no desenvolvimento de estudos mais abrangentes das relações em Characiformes.

## **FAMILIA CHARACIDAE**

Nelson (2006) classifica a família Characidae de forma similar a Buckup (1998), descrevendo-a como uma das principais dentro da ordem Characiforme, tal destaque se dá em função da riqueza de famílias (18), gêneros (270) e aproximadamente 1700 espécies reconhecidas e descritas, sendo que 21% são descritos na ictiofauna neotropical e 65% Characiformes com as seguintes características: lamela ventral do osso mesetmóide bem desenvolvida, duas ou mais séries de dentes no pré-maxilar (Figura 1) e escamas sem círculos na superfície posterior (REIS et al., 2003).

**Figura 1.** Dentição do Tambaqui: pré-maxiliares bem desenvolvidos.



Fonte: Reis, 2003

Há pouco mais de uma década, a classificação dos Characiformes vem passando por grandes modificações, com vários estudos (CALCAGNOTTO et al., 2005; JAVONILLO et al., 2010; DATOVO & CASTRO, 2012; MATTOX & TOLEDO-PIZA, 2012). A filogenia desse grupo ainda não é bem estabelecida, em parte devido a sua grande diversidade morfológica, pequena variação da morfologia externa de alguns grupos, e/ou evolução convergente comum. Contudo, há necessidade de muitos outros estudos para estabelecer as relações filogenéticas desse grupo (NELSON, 2006).

### **Classificação Sistemática**

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) possui a seguinte classificação sistemática segundo GRAÇA & PAVANELLI (2007):

Classe Osteichthyes = Actinopterygii

Superordem Ostariophysi

Ordem Characiformes

Família Characidae

Subfamília Serrasalminae

Gênero *Colossoma* (Eigenmann & Kennedy, 1903)

Espécie *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)

Taxonomicamente, o tambaqui, pertence à subfamília Serrasalminae, que possui 15 gêneros e 80 espécies com distribuição restrita à região Neotropical, embora algumas espécies possam ser encontradas em outras regiões do mundo como resultado de introduções (REIS et al., 2003; NELSON, 2006).

Considerado o segundo maior peixe de escamas da América do Sul, perdendo apenas para pirarucu (*Arapaima gigas*), o tambaqui pode alcançar 30 Kg e atingir 1 metro de comprimento (ARAÚJO-LIMA & GOMES, 2005; MOURAD, 2012).

O tambaqui é um peixe de escamas, com corpo romboidal, alto, achatado e serrilhado no peito. Os juvenis são cinza-claro com manchas escuras espalhadas na metade superior do corpo (Figura 2 a), nesta fase sua alimentação deixa de ser essencialmente fitoplactofago, passando assim a se alimentar de pequenas sementes. Quando adulto é facilmente caracterizado por seu formato arredondado e a variação de coloração sendo parda na metade superior e preta na metade inferior do corpo (Figura 2 b) que pode variar para mais clara ou mais escura dependendo da cor da água. Possui nadadeira adiposa curta, com raios nas extremidades.

**Figura 2.** Características externas tambaqui: a) Juvenil de *C. macropomum* com 10,5 cm de comprimento total; b) Reprodutor de *C. macropomum*.



Fonte: a) acervo da autora; b) [www.cpt.com.br](http://www.cpt.com.br)

Comparado com grande parte dos peixes oriundos da bacia amazônica, tal animal possui lábios bastante carnosos; boca terminal com fortes dentes molariformes e incisivos apresenta rastros branquiais desenvolvidos (espinhos longos e finos) que estão associados à filtragem do zooplâncton. Tais características permitem que sua alimentação seja onívora com tendência a herbívora, mas há relatos do mesmo como filtrador e frutívoro (ABELHA et al., 2001; NUNES et al.,

2006; RODRIGUES, 2014). Adapta-se com facilidade a alimentação artificial, pois possui grande capacidade de digerir proteína animal e vegetal (NUNES et al., 2006; MOURAD, 2012).

Trata-se de um peixe de piracema que em ambiente natural percorre grandes trechos no período reprodutivo, tal período ocorre de novembro a março (época das cheias) (VAZZOLER & MENEZES, 1992). Atingem a maturidade sexual entre o terceiro e o quarto ano de vida, porém em regiões de clima frio essa maturação ocorre de forma mais tardia (GRAÇA & PANAVIELLI, 2007). Possui alta taxa de fecundidade e desova total, quando confinado sua reprodução é induzida por hormônios sintéticos (ARAÚJO-LIMA & GOUDING, 1998; ARAÚJO-LIMA & GOMES 2005; MOURAD, 2012).

### **2.3 A Bahia Pesca**

Vinculada à Secretaria de Agricultura, Irrigação e Reforma Agrária da Bahia – SEAGRI, a estatal Bahia Pesca foi criada no ano de 1982, e tem como finalidade promover a aquicultura e a pesca, através da implantação de projetos sustentáveis observando a natureza econômica, social, ambiental e cultural, como forma de contribuir para o desenvolvimento do estado da Bahia (ASCOM, BAHIA PESCA, 2015).

A empresa atua na atração de investimentos, desenvolvimento científico/tecnológico, criação de polos produtores e fortalecimento das cadeias produtivas. Dentro das atividades para o desenvolvimento do setor produtivo do estado da Bahia, a aquicultura vem ganhando cada vez mais espaço, a piscicultura em especial tem apresentado um bom crescimento nos últimos anos.

Segundo os dados informados no site da própria empresa (<http://www.bahiapesca.ba.gov.br>) a mesma tem desenvolvido direto ou indiretamente diversas atividades (Figura 4 *a b e c*) que cooperam grandiosamente com o desenvolvimento da aquicultura no estado como: peixamento, venda e doação de alevinos, assistência técnica, capacitação de mão-de-obra, venda de pós-larva de camarão, etc.

**Figura 3** Atividades desenvolvidas pela Bahia Pesca/SA: a) Bolsas para peixamento; b) Povoamento de áreas; c) Cursos de capacitação



Fonte: Bahia Pesca

A aquicultura continental baiana ainda tem muito a crescer, com um potencial de produção em 60 bilhões de m<sup>3</sup> de águas continentais, existindo atualmente um polo já consolidado no território de Itaparica (com pisciculturas nos municípios de Paulo Afonso e Glória) (BAHIA PESCA, 2015).

### Estações de Piscicultura

Dentre as 8 estações de piscicultura que a estatal possui, 3 praticam de forma efetiva a reprodução e venda de juvenis de tambaqui. São estas Joanes II/Camaçari, Pedra do Cavalo e Paraguaçu/Boa Vista do Tupim. Todas trabalham com peixes de água doce e trazem como objetivo a formação de plantéis de matrizes e reprodutores para produção de larvas, pós-larvas e juvenis e estes seguem para distribuição e povoamento de corpos d'água públicos, além da comercialização para aquicultores particulares.

**Estação Joanes II/Camaçari:** Localizada no município de Dias D'Ávila na Barragem de Joanes II (Rodovia BA 093, km 14), possui uma área inundada de aproximadamente 1,1 hectares (Figura 5).

**Figura 4.** Vista panorâmica da Estação de Piscicultura Joanes II/Camaçari



Fonte: Google imagens

Segundo a Bahia Pesca (2015), a estação trabalha com espécies nativas e exóticas. Dentre as seguintes espécies de peixe nativas estão: Curimatá (*Prochilodus marginatus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Matrinchã (*Brycon* sp), Surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*), Piau Verdadeiro (*Leporinus* sp), Piau Comum (*Leporinus* sp) e o híbrido Tambacu.

Das espécies exóticas trabalhadas encontram-se: Carpa Comum (*Cyprinus carpio*), Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus* var. chitralada).

A estação tem uma produção média de 2.000.000 alevinos/ano e assiste principalmente os municípios próximos, como: Salvador, Camaçari, Dias D'Avila, Lauro de Freitas, Pojuca, Esplanada, Alagoinhas, Iará, Araçás, Serrinha, Catu.

### **Pedra do Cavalo (Rodolpho Von Inhering)**

Criada em 1984 pela Cia. de Desenvolvimento do Vale do São Francisco – DESENVALE a estação foi repassada para a Bahia Pesca no Ano de 1988 no Governo de Waldir Pires. Está localizada no município de Cachoeira- BA (Rodovia 101, Km 12) na barragem Pedra do Cavalo (Figura 6). Possui uma área inundada de aproximadamente 1,2 hectares.

**Figura 5.** Vista panorâmica da Estação de Piscicultura Pedra do Cavalo (Rodolpho Von Inhering).



Fonte: Google imagens

Dentre as espécies trabalhadas se encontram entre as nativas o Tambaqui (*Colossoma macropomum*), Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e o híbrido Tambacu, em relação às exóticas estão a Carpa Comum (*Cyprinus carpio*) e a Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*).

A estação tem uma produção média de 5.000.000 alevinos/ano e assiste diversos municípios baianos como Maraú, Conceição da Feira, Conceição do

Almeida, Feira de Santana, São Filipe, Senhor do Bonfim, Gandú, Presidente Tancredo Neves, Tucano, Cruz das Almas.

### **Paraguaçu/Boa Vista do Tupim**

Localizada no município de Boa Vista do Tupim –BA no Açude Riacho dos Poços a estação (Figura 7) possui uma área inundada de aproximadamente 1,1 hectares. Abastecida pela Barragem Riacho dos Poços que fica situada na comunidade do Açude a 8 km da sede do município de Boa Vista do Tupim. A Barragem Riacho dos Poços tem por finalidade o abastecimento para a população da zona urbana, Irrigação e Piscicultura.

**Figura 6:** Vista panorâmica da Estação de Piscicultura Paraguaçu/Boa Vista do Tupim



Fonte: Tamires Batista

A piscicultura Paraguaçu trabalha com espécies nativas e exóticas sendo estas Tambaqui (*Colossoma macropomum*) a Carpa Comum (*Cyprinus carpio*) e Tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). Tem uma produção média de 7.000.000 alevinos/ano e tem auxiliado a piscicultura nos municípios de Itaberaba, Iaçú, Boa vista do Tupim, Nova redenção, Ruy Barbosa, Utinga, Vagner, Seabra, Lençóis, Barreiras.

## **2.4 Marcadores Moleculares**

Um marco importante quanto aos marcadores moleculares foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*) que desencadeou o sequenciamento da molécula de DNA (HILSDORF, 2013). Entre a década de 80 e 90 com o aperfeiçoamento e melhor compreensão das técnicas de sequenciamento e PCR, um grande número de marcadores foram

desenvolvidos para evidenciar e explorar a variação contida na molécula de DNA (FALEIRO, 2007; FINGER & KLANK 2010 apud HILSDORF, 2013;).

Nos últimos anos, um grande número de tecnologias da genética molecular é utilizada para fornecimento de informações favoráveis ao desenvolvimento dos programas de conservação e uso de recursos genéticos. A escolha desta técnica dependerá do objetivo do estudo, da infra-estrutura local, dos recursos financeiros e humano disponíveis além do nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada.

Dentre tantos marcadores, o marcador ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*) são fragmentos de DNA de 100 a 3000 pares de bases amplificados via PCR usando um único *primer* sendo este com 16 a 20 pares de bases construído a partir de uma sequência de microssatélite (REDDY et al., 2002; GASQUES et al., 2013).

Kumar e Gurusubramanian (2011) citam como vantagem deste iniciador o fato de tornar-se desnecessário o conhecimento prévio do genoma da espécie em estudo para desenho dos iniciadores (*primers*) além de necessitar de pequenas quantidades de DNA por reação. Trata-se de um marcador relativamente barato comparados aos demais. Em contrapartida este marcador possui desvantagens que merecem certa atenção como o fato de ser um marcador dominante o que impossibilita a identificação direta de heterozigose.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a diversidade genética de estoques de reprodutores da espécie *C. macropomum* em três estações da Bahia Pesca, por meio do marcador molecular ISSR.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar a espécie *C. macropomum* através de marcadores moleculares tipo ISSR;
- Verificar se há efeito fundador;
- Caracterizar a diversidade genética dentro dos estoques de *C. macropomum* amostrados nas estações de piscicultura da Bahia Pesca –BA.
- Fornecer informações genéticas aplicáveis na melhoria dos cultivos do *C. macropomum* realizados nas estações de piscicultura da Bahia Pesca –BA.

#### 4. MATERIAS E MÉTODOS

O experimento foi realizado durante o período de abril de 2014 a janeiro de 2016, no Núcleo de Estudo em Pesca e Aquicultura- NEPA, situado na Universidade Federal do Recôncavo da Bahia - UFRB, ligada ao Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas - CCAAB, no campus de Cruz das Almas-BA.

Foram coletadas 75 amostras (Tabela 1) de nadadeira caudal obtido do estoque de reprodutores e futuro reprodutores de *Colosssoma macropomum* em três estações de pisciculturas da Bahia Pesca. São estas: Joanes II/Camaçari (Rodovia BA 093, km 14, Dias D'Ávila – BA), Pedra do Cavalo-Rodolpho Von Inhering (Rodovia 101, Km 12, Cachoeira- BA) e Paraguaçu/Boa Vista do Tupim (Açude Riacho dos Poços, Boa Vista do Tupim –BA).

**Tabela 1.** Especificação quanto ao local de coleta e classificação etária das amostras de *C. macropomum*

Estação	Reprodutor	Juvenil	Total
Joanes II/Camaçari	30	0	30
Pedra do Cavalo	30	0	30
Paraguaçu /Boa Vista do Tupim	3	12	15
<b>Total</b>	<b>63</b>	<b>12</b>	<b>75</b>

#### COLETA DE MATERIAL

Cada espécime teve o tecido (nadadeira) coletado (Figura 8 a e b) e armazenado separadamente em tubos plásticos individuais do tipo eppendorf (Figura 8 c). A cada animal coletado, foram tomados os cuidados necessários para que não houvesse a contaminação cruzada da amostra.

Após a coleta das amostras o material foi levado para o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos- LAGOA da UFRB para serem procedidas as extrações de DNA.

**Figura 7.** Coleta de material biológico: a) borrifando local com álcool 70%;; b) coleta c) Inserção do material em tubo tipo eppendorf



Fonte: acervo da autora.

### Extração de DNA

O DNA da espécie foi extraído segundo o protocolo descrito por Sambroock et al. (1989) e detalhado subsequentemente:

a) O tecido, já fixado em álcool 94%, em tubos eppendorf, é cuidadosamente picotado e deixado em estufa a 37°C para retirar o excesso de álcool da fixação;

b) Adiciona-se o tampão de extração (Figura 9 a) aos tubos: 4 µl de Tris-Cl 1M pH 8,0 + 160 µl de EDTA 0,25M pH 8,0 + 20 µl de SDS 10% + 216 µl de água destilada;

c) As amostras permanecem em estufa a 37°C durante 1 hora e posteriormente se adiciona 3 µl de Proteinase K. Após são colocadas em banho-maria a 37°C, onde permanecem por 24 para que o material se dissolva;

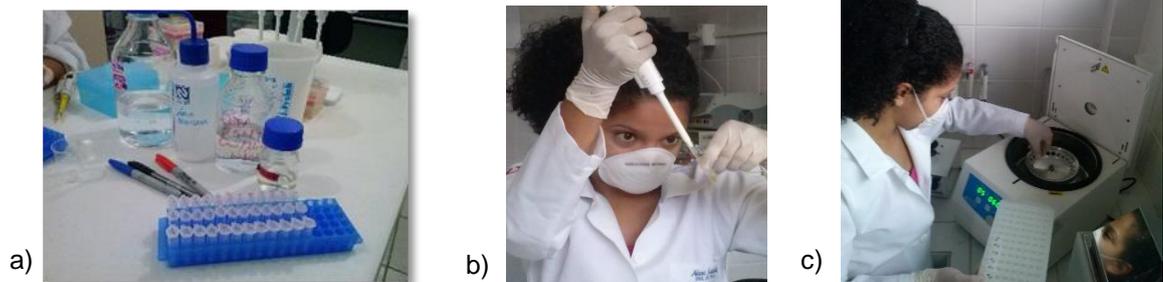
d) Decorrido este tempo, se coloca um volume de Fenol correspondente a 400 µl, agita-se durante 15 minutos e em seguida centrifuga a 6.000 rpm durante 5 minutos;

e) Retira-se 350 µl do sobrenadante e o preserva em outro tubo eppendorf (Figura 9 b);

f) Acrescenta (eppendorf com sobrenadante) um volume de Fenol correspondente a 350 µl, agita 15 minutos e centrifuga 5 minutos a 6.000 rpm;

- g) Retira-se 300  $\mu$ l do sobrenadante e preservando novamente em outro tubo eppendorf;
- h) Adiciona-se (ao eppendorf com sobrenadante) 300  $\mu$ l de Álcool isoamílico-clorofórmio (1:24), agita durante 15 minutos e centrifuga 10 minutos a 6.000 rpm;
- i) Conserva 250  $\mu$ l do sobrenadante e coloca em outro tubo eppendorf, adicionando 10% do volume final de NaCl 6M e agitando levemente;
- j) Insere-se Etanol absoluto gelado num volume correspondente a 2,5 vezes do total que ficou no tubo e agita-se cuidadosamente, verifica-se a formação da nuvem de DNA;
- k) Centrifuga a 13.000 rpm durante 5 minutos;
- l) Retira-se o álcool absoluto com cuidado para não descartar o pellet de DNA;
- m) Adiciona aproximadamente 1 ml de álcool 70%. Após colocou-se na centrifuga a 13.000 rpm durante 10 minutos (Figura 9 c), para lavagem do material;
- n) Despeja-se o álcool e posiciona-se os tubinhos num suporte deitados para secar over night;
- o) Dilui-se em 100  $\mu$ l de solução tampão TE 1M pH 8,0 e deixando em banho-maria 37°C num período de 48 horas;
- p) Estoca-se o material sob refrigeração à -20°C.

**Figura 8.** Extração de DNA. a) Preparação para etapa de lise; b) Purificação; c) Material após precipitação na centrifuga



Fonte: acervo da autora.

### **Quantificação do DNA**

O material resultante do processo de extração foi levado ao espectrofotômetro do modelo BioSpectrometer de Eppendorf para medir a concentração e qualidade das amostras. Após o isolamento do DNA genômico, as amostras obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%.

As amostras aplicadas foram submetidas a uma voltagem constante de 70 Volts e amperagem de 500 mA por 40 minutos. Após este tempo de eletroforese, o gel foi removido do reservatório e colocado em um transiluminador UV e fotografado, através do sistema de foto-documentação L-PIX Loccus Biotecnologia - Molecular Imaging. Esta eletroforese permitiu verificar a integridade do DNA das amostras indicadas para serem utilizados nas reações de amplificação.

### **Amplificação do DNA via ISSR**

Foram testados um total de dezessete *primers* ISSR (Tabela 2) nas amostras de DNA da espécie *Colossoma macropomum* onde 5 foram selecionados para desenvolvimento deste trabalho por apresentarem boa amplificação. A mistura de reação em cadeia de polimerase teve como componentes os seguintes reagentes, totalizando aproximadamente 30µL da mistura de reação final: 2 – 5 ng DNA, 2,5 µL de solução tampão (10x), 2,5 µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5 µL dNTPs (100mM), 2,5 µL de *primer* (50µM) e 0,2 µL Taq Dna Polimerase.

As amplificações de PCR foram conduzidas em termociclador *Veriti (Applied Biosystems)* e consistiram numa etapa inicial de desnaturação do DNA a 94°C por 1 minuto; seguido por 39 ciclos, cada um apresentando 1 minuto de desnaturação a 94°C; 1 minuto para o pareamento do iniciador a temperatura específica °C de cada *primer* (Tabela 2); 1 minuto de extensão do fragmento do DNA a 72°C; seguido de uma extensão final por 7 minutos; e 14°C ∞.

Os fragmentos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%, submetido por 2,5 horas a 70 volts contendo solução tampão TBE diluído 10x e o gel corado com 2 µL brometo de etídeo. Os poços foram preenchidos com 22 µL da reação, acrescido de 3 µL de corante azul de bromofenol.

Além do material resultante do processo de PCR, foi adicionado ao gel o marcador DNA Ladder 100 bp como padrão molecular para auxiliar a estabelecer o tamanho das bandas. Em seguida os géis eram fotodocumentados em transluminador sob luz ultravioleta do sistema de fotodocumentação L-PIX Loccus Biotecnologia.

**Tabela 2.** *Primers* utilizados para amplificação de DNA da espécie *Colossoma macropomum*

<b>Nome dos <i>primers</i></b>	<b>Sequência 5' – 3'</b>	<b>Temperatura de anelamento (°C)</b>
ISSR 1	(GA)8C	52,8
ISSR 2	(CT)8G	52,0
ISSR 3	(AG)8YA	54,0
ISSR 4*	(GA)8YT	52,8
ISSR 5 *	(CT)8RA	50,0
ISSR 6	(AC)8YG	54,0
ISSR 7	(GGAC)3A	52,0
ISSR 8	(GGAC)3C	51,0
ISSR 9	(GGAC)3T	51,0
ISSR 10	(AACC)4	51,0
ISSR 11*	(GGAC)4	51,0
ISSR 12	(TAGG)4	51,0
ISSR 13	(GACA)4	51,0
ISSR 14*	(GGAT)4	51,0
ISSR 15*	(AAGC)4	51,0
ISSR 16	(CACT)4	51,0
ISSR 17	(GGGT)4	51,0

\* *Primers* selecionados para estudo

## ANALISE DOS DADOS

Os resultados adquiridos a partir da visualização das bandas de DNA nos géis foram transformados em matrizes numéricas binárias com presença (1) e ausência de banda (0), para os fragmentos amplificados, incluindo as bandas de intensidade média e fracas. A avaliação de polimorfismos foi de acordo com Falconer & Mackay (1996), onde um loco para ser considerado polimórfico deve apresentar a frequência do alelo mais comum inferior a 0,95.

Através do sistema de análise binária, as bandas reprodutíveis do marcador ISSR foram avaliadas e com a resultante deste processo calculou-se o número total de bandas amplificadas e o número de bandas polimórficas, com os cinco *primers* selecionados para a análise. A matriz de dados de presença/ausência resultante foi analisada utilizando o programa POPGENE (Population Genetic Analysis) versão 1.32 para estimar o nível de diversidade genética. (YEH et al., 1999)

Entre e dentro das populações foram obtidos os seguintes parâmetros de diversidade genética: percentagem de bandas polimórficas (PBP), índice de Shannon (I), e diversidade de Nei (H).

O programa POPGENE também foi utilizado na análise estimativa da diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ), assim como a distância genética de Nei (1978). O dendrograma foi construído a partir da distância genética de Nei (1978) com o método par a par de médias ponderadas (UPGMA), com 1000 permutações de *bootstrap* utilizando o programa MEGA 6.06 (TAMURA et al., 2013).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Reação ISSR-PCR

Os cinco iniciadores escolhidos geraram um número total de 73 fragmentos polimórficos sem ter sido detectado nenhum fragmento monomórfico, com tamanho de pares de base variando entre 150 pb e 2072 pb, conforme a Tabela 3. Os fragmentos que possuíam o mesmo peso molecular foram considerados como pertencentes ao mesmo locos. O número total de *loci* variou de acordo com os iniciadores, sendo o maior número de *loci* produzidos pelo ISSR 5 e o menor pelo ISSR 14.

**Tabela 3.** Iniciadores ISSR selecionados na análise de variabilidade genética entre as diferentes populações da espécie *Colossma macropomum* e suas características moleculares.

Iniciadores ISSR	Sequência 5' - 3'	Ta*	Tamanho estimado das bandas (pb)	Nº de <i>loci</i> polimórficos
ISSR 4	(GA) 8YT	52,8° C	150 - 1200	14
ISSR 5	(CT)8RA	50,0° C	800 - 2150	20
ISSR 11	(GGAC)4	51,0° C	400 - 2072	16
ISSR 14	(GGAT)4	51,0° C	450 - 1200	9
ISSR 15	(AAGC)4	51,0° C	300 - 1400	14
Total				73

\*ta=temperatura de anelamento;\*pb= pares de bandas

### 5.2 Estrutura Populacional e Diversidade Genética das Populações

Os resultados encontrados nas populações de *C. macropomum* das estações de piscicultura da Bahia Pesca mostram que as medidas para comparação da distância genética de Nei (1972) variaram de 0,9113 a 0,9529 e as medidas para comparação da distância genética variaram de 0,0483 a 0,0929, como pode ser avaliado na Tabela 4.

O valor máximo estimado (0,9562) da distância de Nei ocorreu entre as populações das estações Paraguaçu e Joanes II/Camaçari e o valor mínimo estimado (0,9113) entre a população da estação Paraguaçu e Pedra do Cavalo. Em contrapartida, o valor máximo observado (0,0929) da distância genética está entre as populações da Pedra do Cavalo e Paraguaçu e o valor mínimo observado (0,0483) encontra-se entre as populações de Pedra do cavalo e Joanes II/Camaçari.

**Tabela 4.** Distância genética de Nei (1972) (diagonal superior) e distância genética (diagonal inferior) entre as populações da espécie *C. macropomum*.

População	Pedra do Cavalo	Joanes II	Paraguaçu
Pedra do Cavalo	****	0.9529	0.9113
Joanes II	0.0483	****	0.9562
Paraguaçu	0.0929	0.0448	****

Conforme a Tabela 5, quando analisado os dados para o índice de Shannon (I) a diversidade genotípica variou entre as populações sendo de 0,2207 ( $\sigma \pm 0,2764$ ) na estação Paraguaçu a 0,3083 ( $\sigma \pm 0,2712$ ) na estação Joanes II/Camaçari. A respeito do número de alelos observados, houve variação de 1,4318 ( $\sigma \pm 0,5011$ ) a 1,6364 ( $\sigma \pm 0,4866$ ). Quanto ao número de alelos efetivos, os valores ficaram entre 1,2443 ( $\sigma \pm 0,3400$ ) e 1.3308 ( $\sigma \pm 0,3430$ ). A média de diversidade genética de Nei (H) teve variação entre 0,1462 ( $\sigma \pm 0,1898$ ) e 0,2017 ( $\sigma \pm 0,1887$ ).

**Tabela 5.** Diversidade genética entre populações de tabaqui cultivado em estações da Bahia Pesca.

Estação	na	ne	H	I	N° de loci polimórficos	Percentual de loci polimórficos
Pedra do Cavalo	1.4545 ( $\sigma \pm 0.5037$ )	1.2826 ( $\sigma \pm 0.3679$ )	0.1652 ( $\sigma \pm 0.1993$ )	0.2465 ( $\sigma \pm 0.2878$ )	20	45.45
Joanes II/Camaçari	1.6364 ( $\sigma \pm 0.4866$ )	1.3308 ( $\sigma \pm 0.3430$ )	0.2017 ( $\sigma \pm 0.1887$ )	0.3083 ( $\sigma \pm 0.2712$ )	28	63.64
Paraguaçu	1.4318 ( $\sigma \pm 0.5011$ )	1.2443 ( $\sigma \pm 0.3400$ )	0.1462 ( $\sigma \pm 0.1898$ )	0.2207 ( $\sigma \pm 0.2764$ )	19	43.18

\*na = número de alelos observados; \*ne = número efetivo de alelos; \*H = diversidade genética de Nei (1972); \*I = índice de informação de Shannon

A média da diversidade genética total ( $H_T$ ) para todas as populações foi 0,204 ( $\sigma \pm 0,0332$ ) e a média de diversidade esperada 0,1710 ( $\sigma \pm 0,0236$ ). A diferenciação genética estimada pela média  $G_{ST}$  resultou em 0.1634 e o número de migrantes nas populações indicado pelo fluxo gênico, resultou em  $N_m = 2,5606$  (Tabela 6).

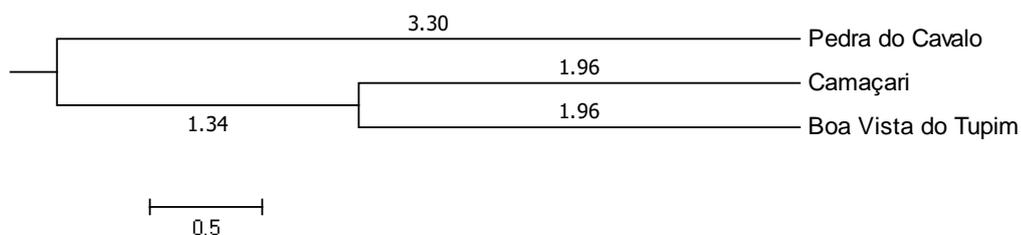
**Tabela 6:** Estimativa de diversidade genética, diferenciação populacional ( $G_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) para populações da espécie *C. macropomum*

	$H_T$	$H_s$	$G_{ST}$	$N_m$
<b>População total</b>	0,2044 ( $\sigma \pm 0.0332$ )	0,1710 ( $\sigma \pm 0.0236$ )	0,1634	2,5606

$H_T$  = diversidade total;  $H_s$  = diversidade esperada;  $G_{ST}$  = diferenciação populacional;  $N_m$  = estimativa do fluxo gênico

Como mostra a Figura 10, a estruturação da variabilidade das populações foi visualizada através do dendrograma construído no programa MEGA (TAMURA et al., 2013) a partir dos dados obtidos no POPGENE, onde foi identificado a formação de dois principais grupos, sendo o grupo I composto pelos indivíduos que compõem a estação de piscicultura Pedra do Cavalo apresentando maior distância genética, no grupo II estão as estações Joanes II/Camaçari e Paraguaçu/Boa Vista do Tupim. Conforme o dendrograma as populações das estações Joanes II/Camaçari e Paraguaçu/Boa Vista do Tupim são mais próximas geneticamente, enquanto a população da estação Pedra do Cavalo é a mais distante.

**Figura 9.** Dendrograma derivado através de UPGMA (Unweighted pair group method, arithmetic mean) das populações de *C. macropomum* baseado na distância genética de Nei (1972).



Com base nos resultados da AMOVA e dos índices de fixação ( $F_{ST}$ ), conforme a Tabela 7, verificou-se diferenciação significativa entre as populações

estudadas as quais foram analisadas de uma forma geral. Para a análise de estruturação populacional (WRIGHT, 1978), os valores de  $F_{ST}$  que se encontram entre 0 e 0,05 configuram baixa estruturação genética; entre 0,05 e 0,15, estruturação moderada; entre 0,15 e 0,25, estruturação alta e acima de 0,25, forte estruturação genética. A análise de variância molecular ao considerar todas as populações avaliadas, evidenciou que 75,08% da variação total encontra-se dentro das populações estudadas e 24,92% entre as populações, gerando um índice  $F_{ST}$  de 0,24919.

**Tabela 7:** Análise de variância molecular dentro e entre as populações da espécie *Colossoma Macropomum*.

<b>Fontes de Variação</b>	<b>Grau de Liberdade (gl)</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes de variância</b>	<b>Percentual de variação</b>
<b>Entre populações</b>	2	25,187	0,46620 Va	24,92%
<b>Dentro das populações</b>	72	101,133	1,40463 Vb	75,08%
<b>Total</b>	174	126320	1,87083	

\*Índice de fixação População total  $F_{ST}=0,24919$

## 6. DISCUSSÃO

Uma das finalidades do estudo da genética de populações é identificar e quantificar a variação analisada dentro e entre as populações para o estudo de fluxo gênico, deriva genética, mutação e seleção natural (SUGANUMA, 2008). Quando se avalia este estudo em relação a populações cultivadas, a variabilidade genética é uma importante característica de espécies que estão em processo de domesticação, uma vez que aquelas com níveis mais elevados de diferenciação são mais propensas a oferecer atributos genéticos para características produtivas (ALARCÓN et al., 2004).

Nesta pesquisa, marcadores moleculares ISSR foram aplicados com o objetivo de avaliar a diversidade genética entre as populações cultivadas da espécie *C. macropomum* que está presente em pisciculturas de praticamente todos os estados brasileiros e se faz uma espécie de grande valia na piscicultura baiana, sobretudo nas estações da Bahia Pesca. Por esta conjuntura a utilização do ISSR se mostrou eficiente ao fornecer informações que corroboram com estudos genéticos em populações cativas, realizados para a espécie em diferentes estações onde ela pode ser encontrada revelando níveis altos, moderados e baixos de diversidade genética, como demonstrado por Jacometo et al., (2010) e Lopes et al. (2009).

De acordo com o dendrograma gerado, a população da estação Joanes II/ Camaçari apresentou maior diversidade ( $H= 0,2017$ ) e quantidade de alelos ( $na=1.6364$ ) quando comparadas as outras estações. Tal fator se deve provavelmente a introdução de novos indivíduos no plantel de reprodutores que elevou a variabilidade genética do plantel local.

Em pesquisas realizadas por outros autores, que tinham por objetivo caracterizar o perfil genético das populações de tambaqui na piscicultura, foram encontrados níveis altos de diferenciação estimados a partir do índice Shannon, a exemplo de Lopes et al. (2009) analisando dois estoques de Rondônia (Pimenta Bueno-RO e Ouro Preto do Oeste-RO), encontraram valores de 0,47 e 0,44 e percentagem de fragmentos polimórficos de 77,0% e 75,0%, deste modo encontrando alta variabilidade genética nos estoques estudados.

Jacometo et al. (2010) ao avaliarem quatro estoques de Tambaqui em diferentes regiões do Brasil (Urupá-RO, Teixeirópolis-RO, Neópolis-SE e Sorriso-MT), calcularam o índice de Shannon destas pisciculturas e encontraram 0,39; 0,45; 0,45 e 0,40 com porcentagem de fragmentos polimórficos de 72,92%; 82,64%; 83,33% e 73,61%, respectivamente e concluíram que os estoques estudados apresentaram alta variabilidade e baixa diferenciação e distância genética entre si.

Nas populações estudadas da estatal Bahia Pesca, objetos desse trabalho, foram calculados os seguintes valores de índice de Shannon para a estação Pedra do Cavalo o valor 0,2465, para estação Paraguaçu/Boa Vista do Tupim 0,2207 e para estação Joanes II/ Camaçari o valor 0,3083, encontrando como valor percentual de loci polimórfico 45,45 %, 43,18 % e 63,64 % respectivamente. Comparando os resultados dos dois trabalhos supracitados com os apresentados nas populações aqui avaliadas pode-se concluir que as populações desse estudo apresentam baixa diversidade genética, a exceção de Joanes II/ Camaçari que possui uma diversidade genética moderada. Deixando explícito que cada estação deve ser avaliada separadamente uma vez que possuem valores bem distintos.

Segundo Frankham et al. (2008), os principais motivos de populações de cativeiro perderem diversidade genética se dá em decorrência dos gargalos ocorridos durante a fundação e devido ao subsequente tamanho populacional. Ao assumir indivíduos fundadores como espécimes representativas da diversidade genética presente na população, o objetivo principal tornar-se minimizar qualquer mudança no *pool* genético fundador ao longo das gerações, com a finalidade de cessar a evolução na população cativa.

O nível de variabilidade genética dos estoques de reprodutores depende da origem, do número de reprodutores utilizados (estoque fundador e reprodutor), do manejo reprodutivo adotado e da diversidade genética dos peixes que formaram os estoques. Estes mesmos fatores podem justificar a baixa diferença de variabilidade genética observada entre os três estoques de reprodutores.

A proporção da diversidade genética entre as populações ( $G_{ST}$ ) foi de 0,1634, indicando que a variabilidade entre e dentro das populações contribuiu com 16,3% e 83,6% da diferenciação total, respectivamente. O fluxo genico ( $Nm$ ), estimado com base nos valores de  $G_{ST}$  foi de 2,5606. Este resultado é condizente

com a moderada diferenciação genética entre as populações havendo um número de 2,5 migrantes por geração, no qual teoricamente, um fluxo gênico maior do que quatro migrantes é suficiente para contrapor os efeitos de deriva genética (SLATKIN, 1987).

Conforme a construção do dendrograma observa-se a formação de dois agrupamentos, nos quais os indivíduos que compõem o cultivo da Pedra do Cavalo se agregam de forma isolada, formando o grupo I, e as populações de Camaçari e Paraguaçu/Boa Vista do Tupim formaram o grupo II. A união dos indivíduos que estão no grupo II pode ser explicada através da constituição do cultivo de Paraguaçu/Boa Vista do Tupim cujo plantel de reprodutores avaliado nesse estudo foi formado a partir de espécimes oriundos da Estação de Joanes II/Camaçari. Portanto a similaridade genética existente entre essas duas populações (Joanes II/Camaçari e Paraguaçu/Boa Vista do Tupim) é justificada em decorrência da origem das amostras utilizadas nesse estudo.

A análise de variância molecular revelou que existe maior diferença dentro (75,08 %) das populações de tambaqui do que entre delas (24,92 %). O resultado da AMOVA está em acordo com estudos de variabilidade genética de populações encontradas no estado de Rondônia por Lopes et al. (2009), e em diferentes regiões do país obtidos por Jacometo et al. (2010) que encontraram a maior parte da variação dentro de cada grupo (entre 70 % e 95 %, respectivamente) e entre os grupos (4,54 % e 14,56 % respectivamente). Desse modo, para atuar em trabalhos para fins de melhoramento genético e conservação da espécie deve-se levar em conta as particularidades dentro de cada população. O estudo de cada local separadamente deve ser realizado já que cada estação apresenta diferentes especificidades ainda que possuam moderada variabilidade genética.

Em consequência da moderada variabilidade genética das populações estudadas, além fato que as pisciculturas brasileiras possuem a tendência de formação de plantel com poucos reprodutores e muitas vezes são induzidas a realização endocruzamentos (acarretando a perda da diversidade genética), pode-se deduzir que tais fatores confirmam o estabelecimento de um efeito fundador nas estações de piscicultura da estatal Bahia Pesca que foram contempladas com este estudo.

Em avaliação aos valores de variabilidade genética intrapopulacional das estações estudadas, algumas metodologias são indicáveis para melhoria genética do plantel de reprodutores da estatal: A introdução de novos indivíduos com alta variabilidade genética e baixo grau de parentesco com os espécimes já existentes nas populações estudadas, tornar-se-á o fator que acarretará grande melhoria para o potencial genético dos estoques fundadores, reprodutores e futuras gerações nas pisciculturas estudadas. A identificação individual no plantel de reprodutores é uma maneira eficiente de controle da reprodução, que certamente trará um retorno considerável na produtividade dos lotes.

## 7. CONCLUSÃO

Tornou-se possível montar um banco genético “in vitro” de DNA preservado de 75 exemplares cultivados em 3 estações produtoras de Tambaqui pertencentes a estatal Bahia Pesca.

Averiguou-se que a técnica ISSR é viável e eficiente para caracterização genética de peixes neotropicais, em especial o tambaqui (*C. macropomum*).

Através do conjunto de dados adquiridos neste trabalho que revelaram baixa variabilidade genética dos estoques, a falta de informações quanto a sua formação e quanto ao planejamento das reproduções, leva a afirmação com relação ao efeito fundador no estoque fundador das populações cultivadas de *C. macropomum* na estatal Bahia Pesca.

Pode-se evidenciar que os indivíduos das estações Paraguaçu/Boa Vista do Tupim e Pedra do Cavalo apresentam baixa diversidade genética fazendo-se crucial a introdução de novos indivíduos para suplementar a população existente, o que acarretaria na melhoria da variabilidade genética do estoque, enquanto que na estação Joanes II/Camaçari em consequência da sua moderada variabilidade dentro do estoque, essa atividade ainda se faz necessária, porém não com tanta urgência como nas outras estações.

Tornar-se-á crucial para melhor desenvolvimento das reproduções a marcação de indivíduos com microchip, tal técnica levaria a reproduções planejadas para a espécie minimizando a possibilidade de endogamia.

## 8. REFERÊNCIAS

ABELHA, M.C.F; AGOSTINHO A. A; GOULART, A. Plasticidade trófica em peixes de água doce. **Acta Scientiarum**, v. 23, n. 2 Maringá, p 425-434, 2001.

ALARCÓN, J. A.; MAGOULAS, A.; GEORGAKOPOULOS, T.; ZOUROS, E.; ALVAREZ, M. C. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 230, p. 65-80, 2004.

AQUAONLINE. **História da Aquicultura**. Disponível em: <http://www.aquiculturaonline.com.br/noticias/entrevistas/historia-da-aquicultura/>. Acessado em 17 de setembro de 2015.

ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.). **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. Santa Maria: UFSM, 2005 p. 175-202.

ARAUJO-LIMA, C.A.R.M.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Tefé: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: CNPq, 1998. 186p.

ASCOM- ASSESORIA DE COMUNICAÇÃO. BAHIA PESCA. **Novo perfil da pesca e aquicultura na Bahia**. Salvador, 2015.

Bahia Pesca [internet]. **Nossas ações**. Salvador, 2013. Disponível em: <http://www.bahiapesca.ba.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=12>. Acessado em 17 de dezembro de 2015.

BARTHEM, R. B. & FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros na Amazônia. In Ruffino. **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia**. Manaus, 2004. p 17- 62.

BATISTA. V. S. & PETRERE JR M. **Characterization of the commercial fish production landed T Manaus, Amazonas State Brazil**. Acta Amazônica p. 53- 66. Manaus, 2003.

BUCKUP, P. A. Relationships of the Characidiinae and Phylogeny of Characiform Fishes (Teleostei: Ostariophysi). p. 123-144. In Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; LUCENA, Z. M. S.; LUCENA, C. A. S. (Eds). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Edipucrs. Porto Alegre. 603 p., 1998.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 36, n. 1 , 2005, p.135-153.

CENTRO DE PRODUÇÕES TÉCNICAS- PCT. **Peixes de água doce do Brasil - Tambaqui (*Colossoma macropomum*)**. Disponível em: <http://www.cpt.com.br/cursos-criacaodepeixes/artigos/peixes-de-agua-doce-do-brasil-tambaqui-colossoma-macropomum#ixzz41VsgPU84>. Acessado em 27 de outubro de 2015.

CYRINO, J.E.P.; SAMPAIO DE OLIVEIRA A.M.B.M.; COSTA A. B. **Curso – Introdução à Piscicultura**. Departamento de Zootecnia, Setor Não Ruminantes ESALQ/USP. Piracicaba-SP, 1997.

DATOVO, A. & CASTRO, R. Anatomy and evolution of the mandibular, hyopalatine, and opercular muscles in characiform fishes (Teleostei: Ostariophysi). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.54, n.2, p.498, 2010.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **CARTILHA GENÉTICA na piscicultura: importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA**. Brasília- DF, p. 32, 2012.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA- EMBRAPA. **Pesca e aquicultura: sobre o tema**. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-pesca-e-aquicultura>. Acessado em 15 de dezembro, 2015.

ESCHMEYER, W. N.; FONG, J. D. **Species by Family/Subfamily**. Disponível em: <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>. Acesso em: 19 de novembro de 2015.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh : Longman Group Limited, p. 464, 1996.

FALEIRO, D. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programa de conservação e uso de recursos genéticos**. Embrapa Cerrado, p.102. PLANALTINA, 2007.

FARIAS, R. H. S.; MORAIS, M.; SORANNA, M. R. G. S.; W. B. **Manual de criação de peixes em viveiro**. Brasília: Codevasf, 2013.

FINGER, A. & KLANK, C. Molecular methods: blessing or curse? In Habel, J. C. ; Assman, T.(eds), relict species: **Phylogeography and conservation biology**, Springer-Verlah. Berlin, 2010 apud HILSDORF, A. W. S. Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil. Tese: livre docência Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. **Aquaculture. Fisheries and Aquaculture Department**. Disponível Em: <http://www.fao.org/fishery/aquaculture/en>. Acessado em: 12 dezembro 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS -  
 FAO. **Global Aquaculture Production statistics database updated to 2013**  
 Summary information Fisheries and Aquaculture Department. Roma 2014.

Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO. **The State of World Fisheries and Aquaculture – 2008** (SOFIA). Fisheries and Aquaculture Department, Roma. 2009.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Sociedade Brasileira de Genética, p.280, Ribeirão Preto, 2008.

GASQUES, L. S.; BELONI, K. P.; OLIVEIRA, J. R. de. Os marcadores moleculares em peixes e suas aplicações em publicações da base de dados do scielo. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.**, v. 16, n. 1, p. 47-50, Umuarama, 2013.

GOMES, C.L. et al. Avaliação dos efeitos da adição de sal e da densidade no transporte de tambaqui. **Pesquisa agropecuaria brasileira**. Vol 38 no.2 Brasília. 2003.

GRAÇA, W. J.& PAVANELLI, C. S. **Peixes da Planície de inundação do alto Rio Paraná e áreas adjacentes**. Maringá, 2007.

HILSDORF, A. W. S. **Marcadores moleculares e a caracterização dos recursos genéticos de peixes: desenvolvimento sustentável da aquicultura e da pesca de espécies nativas de água doce no Brasil**. Tese: livre docência Universidade de São Paulo, p 159. Pirassununga, 2013.

HILSDORF, A. W. S.& ORFÃO, L. H. Aspectos gerais do melhoramento genético em peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia.**, v.40, p.317-324, 2011.

HILSDORF, W. A. S.; RESENDE, E. K. . MARQUES, D. K. S. **Genética e conservação de estoques pesqueiro de águas continentais no Brasil: situação atual e perspectivas**. EMBRAPA PANTANAL: CORUMBA, 2006.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. Produção da pecuária municipal / IBGE/CDDI/Ger. **Biblioteca e Acervos Especiais**. Rio de Janeiro, v. 42, p.1-39, 2014

JACOMETO, C.B. et al. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 45, n. 5, p 481-487, 2010.

JAVONILLO, R. et al. Relationships among major lineages of characid fishes (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes), based on molecular sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, n.2, p. 498-511, 2009.

KUBBITZA, F. Coletanea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, paco e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura**, v.14, n. 82, 2004.

KUMAR, N. S., GURUSUBRAMANIAN, G. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. **Science vision**, v 11 n. 3 p. 116-124. MIPOGRASS, 2011.

LOPES, T. S. et al. Analise da diversidade genética de dois estoques de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.728-735, 2009.

MALABARBA, L.R. & WEITZMAN, S.H. Description of a new genus with six new species from southern Brazil, Uruguay and Argentina, with a discussion of a putative characid clade (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Comunicações do Museu de Ciências e Tecnologia PUCRS, Série Zoológica**, Porto Alegre, v. 16. N. 1, p 67-151 ,2003.

MATTOX, G. M. T & TOLEDO-PIZA, M. Phylogenetic study of the Characinae (Teleostei: Characiformes: Characidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.165, n.4, p.809-915, 2012.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA- MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura**. Brasília p.129, 2013.

MOREIRA, C. R. **Relações filogenéticas em Iguanodectinae (Characidae; Characiformes; Teleostei)**. 2007 [ Dissertação] Universidade de São Paulo, São Paulo, p.318, .

MOTA, T. F. M., PRIOLI, S. M. A.; PRIOLI, A. J. Estudos filogenéticos da ordem characiformes: tendências e carências. UEPG Ciências. **Biologia e saúde**, Ponta Grossa, v.20, n.1, p.21-36, 2015.

MOURAD, N.M.N. **Crescimento ponderal e morfométrico de Pacu *piaractus mesopotamicus*, tambaqui *Colossoma macropomus* e seus híbridos da primavera ao inverno**. 2012. p.74. Dissertação - Programa de Pós-graduação em zootecnia. Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2012.

NEI, M. **Analysis of gene diversity in subdivided populations**. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA, 1973.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics, Bethesda**, v.89, p.583-590, 1978.

NEI, M. Genetic distance between popilations. **American Naturalist**. v. 106., p.283-292, 1972.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. New York: John Wiley & Sons, 4° ed. 2006.

NUNES, E.S.S. et al. Enzimas digestivas exógenas na alimentação de juvenis de tambaqui. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v 41, n. 1 p 139-143, 2006.

OLIVEIRA, C. et al. **Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling**. *BMC Evolutionary Biology*, v.11, n.1, p.275, 2011.

OLIVEIRA, R. C. O panorama da aqüicultura no Brasil: a prática com foco na sustentabilidade. **Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, vol.2, nº1, p. 71-89, 2009.

OYAKAWA, O. T. **Relações filogenéticas das famílias Pyrrhulinidae, Lebiasinidae e Erythrinidae (Osteichthyes: Characiformes)**. [Tese] Universidade de São Paulo, p.200. São Paulo, 1998.

PEREIRA, T. N. A. **Filogenia das espécies de Deuterodon Eigenmann, 1907 (Characiformes: Characidae), um gênero de lambaris da Mata Atlântica**. [DISSERTAÇÃO] Universidade Estadual Paulista – UNESP Instituto de Biociências de Botucatu. p. 265. BOTUCATU, 2010.

PHINCHONGSAKULDIT, J.; CHAIPAKADEE, P.; COLLINS, J. F.; JAROENSUTASINEE, M.; BROOKFIELD, J. F. Y. Population genetics of cobia (*Rachycentron canadum*) in the Gulf of Thailand and Andaman Sea: fisheries management implications. **Aquaculture International**, v.21, p. 197-217, 2013.

PIRES, A. A. **A identificação molecular e caracterização de peixes do genero Zungaro (Siluriformes: Pimelodidae) de diferentes bacias hidrigráficas**. [Dissertação] Universidade Federal De São Carlos, p. 37, São Carlos, 2014.

REDDY, M.P.; SARLA, N.; SIDDIQ, E.A., Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. **Euphytica**, v.128, n.1, p. 9-17, 2002.

REIS, R. E.; KULLANDER; S. O.; FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA)**, EDIPUCRS, p.729. Porto Alegre, 2003.

RESENDE, E. K. **Avanços já alcançados pelo projeto Aquabrazil**. Corumbá, MS: Embrapa Pantanal, 2011. 3p. ADM – Artigo de Divulgação na Mídia, n.151. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM151> . Acesso em: 12 agosto. 2015.

RIBEIRO, R. P. A genética a Serviço da Produção de Peixes Nativos. IV Feira Internacional da Amazonia [ **Anais**]. Manaus 2011.

RODRIGUES, A. P. O. NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO DO TAMBQUI (*Colossoma macropomum*). **Bol. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 40, n.1, p. 135 – 145, 2014.

ROSA, R.S. & LIMA F.C.T. Peixes: Os peixes brasileiros ameaçados de extinção, p.65-81. In: A.B.M. Machado, C.S. Martins e G.M. Drummond (org.). **Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Incluindo as Espécies Quase Ameaçadas e Deficientes em Dados**. Fundação Biodiversitas. Belo Horizonte 2005. p160

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATS, T. **Molecular Cloning. A Laboratory Manual**. 2a ed., Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SERVIÇO BRASILEIRO DE APOIO A MICROEMPRESA – SEBRAE. **Como montar um negócio para criação de peixes**. Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/ideias/Como-montar-um-neg%C3%B3cio-para-cria%C3%A7%C3%A3o-de-peixes>. Acessado em 10 de outubro de 2015.

SLATKIN, M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science**, v. 236, p. 787-792, 1987.

SUGANUMA, C. H. A Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microssatélites. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura, Jaboticabal, 2008.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.06**. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TORO, M. A.; FERNÁNDEZ, J.; CABALLERO, A. Molecular characterization of breeds and it's use in conservation. **Livestock Science**, v. 120, p. 174-195, 2009.

VAZZOLER, E. A; MENZES, N.A. Síntese de conhecimento sobre capotamento reprodutivo dos characiformes da America do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v.52, n. 4, p. 627-640. Rio de Janeiro, 1992.

WASKO, A.P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.et al. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **J. Appl. Ichthyol.**,v.20, p.48-52,

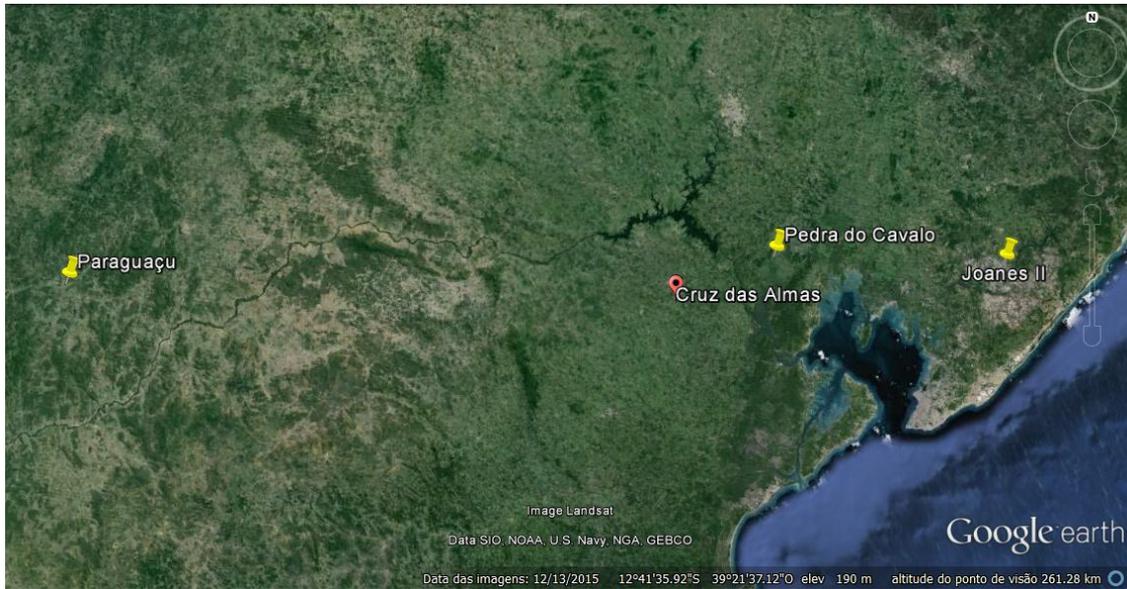
2004.

WRIGHT, S. **Evolution and the genetics of populations**. Volume 4  
Variability Within and Among Natural Populations, p. 580, Chicago: University of  
Chicago, 1978.

YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. **POPGENE version 1.32**: Microsoft  
Window-based freeware for population genetics analysis. Edmonton: University of  
Alberta, 1999.

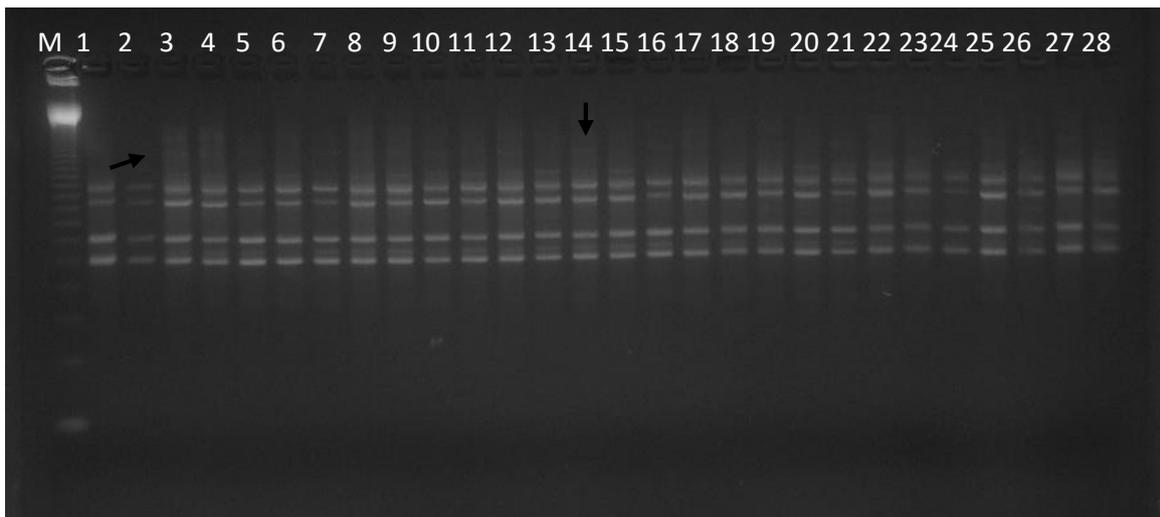
## 9. ANEXOS

Anexo 1: Mapa de localização das estações contempladas com este estudo.



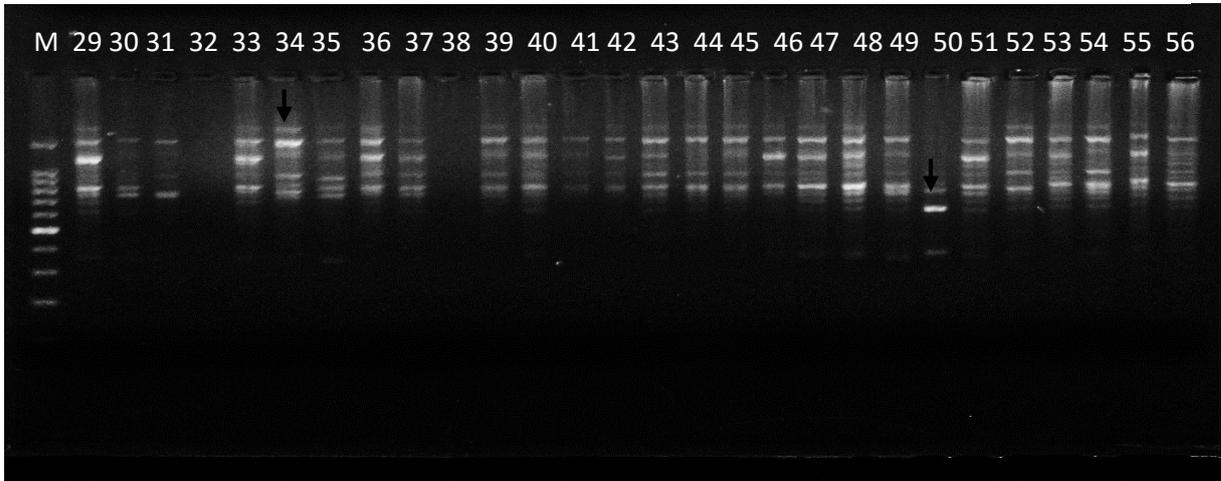
Fonte: Google Earth

Anexo 2: Padrão de bandas ISSR do iniciador 14 (GGAT)4, com a população da piscicultura Pedra do Cavalo. As setas indicam bandas particulares a cada genótipo.



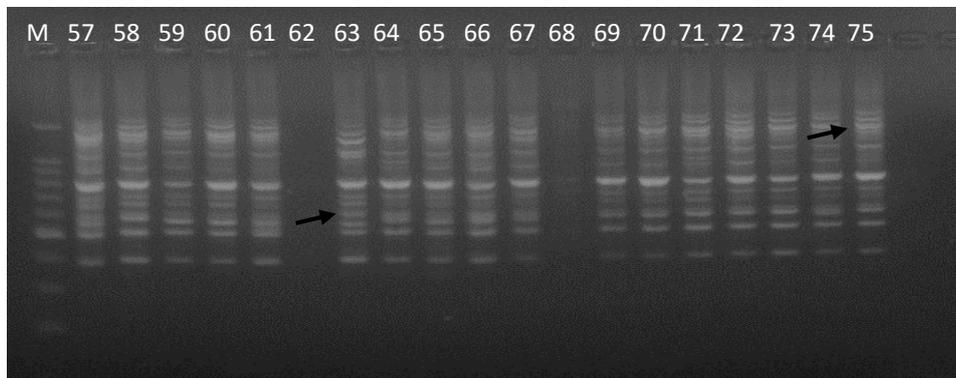
Fonte: acervo da autora

Anexo 3: Padrão de bandas ISSR do iniciador 5 (CT)8RA, com a população da piscicultura JoanesII/Camacari.



Fonte: acervo da autora.

Anexo 4. Padrão de bandas ISSR do iniciador 15 (AAGC)4, com a população da piscicultura Paraguaçu/Boa Vista do Tupim



Fonte: acervo da autora.