



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE AQUICULTURA**

**CONTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DE MACHOS DE JUNDIÁ (*RHAMDIA QUELEN*)
EM FERTILIZAÇÕES COM *POOL* DE SÊMEN**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Aqüicultura do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em aqüicultura.

Orientador: Dr. Evoy Zaniboni Filho.
Co-orientadora: Dra. Adriana C. M. Dantas.

JOSIANE RIBOLLI

FLORIANÓPOLIS
2007

Ribolli, Josiane

Contribuição individual de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) em fertilizações com *pool* de sêmen – Florianópolis -2007.

f. 42; grafs., tabs.

Orientador: Dr. Evoy Zaniboni Filho

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias.

1. Microsatélites; 2. *pool* de sêmen; 3. paternidade; 3. diversidade genética.

Contribuição individual de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) em fertilizações com *pool* de sêmen.

Por

JOSIANE RIBOLLI

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de

MESTRE EM AQUICULTURA

e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura.

Prof. Cláudio Manoel Rodrigues de Melo, Dr.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Dr. Evoy Zaniboni Filho - *Orientador*

Dr. Cláudio Manuel Rodrigues de Melo

Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Dedico este trabalho à minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer aos meus pais e familiares, por ser hoje o que sou, pela confiança dedicada a mim, por tudo que conquistei, e que ainda terei de conquistar.

Ao meu Orientador Evoy Zaniboni Filho, pela orientação e confiança depositada em mim, para a realização deste trabalho.

Agradeço as minhas grandes amigas, Fanny e Crislei pela parceria e amizade e seus acolhimentos nos momentos mais difíceis.

Ao meu namorado Dennis, pelo amor, carinho, incentivo e parceria durante a realização do trabalho.

Agradeço meus amigos Luis Fernando, Fernanda (Potira), Iara, Ana, David, Marcos, Ronaldo, Neiva, Michele, Samira, Renato, Róger, Aparício, enfim, todas as pessoas que de alguma maneira me ajudaram, impulsionaram para realizar este trabalho.

A todos os funcionários, professores, alunos e técnicos do LAPAD.

Agradeço ao Prof. Cláudio Melo e a amiga Luciana Melo, pelo apoio e incentivo durante a execução do trabalho.

À pesquisadora Adriana Dantas, pela co-orientação exercida durante este período.

À Universidade Federal de Santa Catarina que me permitiu ingressar no Curso de Pós-graduação.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela Bolsa de estudos concedida para a execução desta dissertação.

Aos colegas e amigos do laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal, que abriram as portas e me ensinaram muito. Em especial gostaria de agradecer a Máguida, pela paciência e incentivo para não desistir.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	
RESUMO	
ABSTRACT	
INTRODUÇÃO GERAL	12
OBJETIVOS	17
OBJETIVOS GERAIS	17
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
CONTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DE MACHOS DE JUNDIÁ (<i>RHAMDIS QUELEN</i>) FERTILIZAÇÕES COM <i>POOL</i> DE SÊMEN	18
RESUMO	19
ABSTRACT.....	19
INTRODUÇÃO	20
MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
REPRODUÇÃO E LARVICULTURA.....	21
AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISE DOS MICROSSATÉLITES.....	22
RESULTADOS	23
DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO.....	34
ANEXOS.....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Cruzamentos direcionados dos ovócitos das fêmeas de <i>Rhamdia quelen</i> com gametas provenientes de um único macho (controle) e da mistura do sêmen de quatro machos (tratamento).....	21
Tabela II	Lócus e seqüência dos SSRs utilizados, temperatura de anelamento e número de alelos.....	23
Tabela III	Valores médios e desvio padrão ($p < 0,05$) da motilidade espermática, concentração espermática (células/ml), espermatócrito (%) e sobrevivência larval (%) para cada cruzamento.....	24
Tabela IV	Lócus SSR, número de alelos, número de indivíduos amostrados, tamanho da amplitude dos alelos, heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), conteúdo de informação polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão para cinco loci de microssatélites (PE) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (WH).....	26

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Média e desvio padrão ($p < 0,05$) da contribuição relativa de cada macho na formação da progênie, quando a fertilização dos ovócitos de cada fêmea (1, 2, 3) foi feita com o *pool* do sêmen de quatro machos distintos (*Pool* A: M1+M2+M3+M4, *Pool* B: M1+M2+M5+M6, *Pool* C: M3+M4+M5+M6)..... 25

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	- Porcentagem
°C	- Temperatura em graus-Celsius
µL	- Microlitro
µM	- Micromolar
AFLP	- Polimorfismo de Comprimentos de Fragmentos Amplificados
APS	- Persulfato de amônio
CPE	- Probabilidade de Exclusão Combinada
DNA	- Ácido desoxirribonucléico
dNTP	- Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	- Acido etilenodiaminotetracético
F	- Fêmea
g	- Gramas
h	- Hora
HCL	- Ácido Clorídrico
kg	- Kilograma
M	- Macho
mg	- Miligrama
MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
min	- Minutos
mL	- Mililitro
mM	- Milimolar
Ne	- Número efetivo
ng	- Nanograma
pb	- Pares de base
PCR	- Reação de Polimerase em Cadeia
PE	- Probabilidade de Exclusão da Paternidade
pH	- Potencial hidrogeniônico
PIC	- Conteúdo de Informação Polimórfica
RAPD	- Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso
RFLP	- Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição
RNAse	- Ribonuclease
seg	- Segundo
SSR	- Sequência Simples Repetida
Ta	- Temperatura de anelamento
TBE	- Tris-Borato-EDTA
TE	- Tampão de extração
U	- Unidade
λ	- Lambda

RESUMO

A estocagem de suplementação de peixes em ambientes naturais é uma das maneiras de mitigar ou compensar as alterações impostas pelo represamento dos rios às populações selvagens. Devido à falta de informações sobre a composição genética dos estoques repovoadores obtidos através de manejos reprodutivos com *pool* de sêmen, este trabalho teve como objetivo verificar a contribuição individual de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) em alevinos obtidos a partir de fertilizações utilizando *pool* de sêmen de machos distintos. Para a investigação da paternidade, foram utilizados os marcadores microssatélites Pcor1, Pcor2, Rh1, PC17 e PC97, que permitiram determinar 84% das progênies analisadas, com probabilidade de exclusão combinada de 0,9724. Todos os reprodutores utilizados apresentaram boa capacidade de fertilização quando empregados individualmente, porém, quando utilizados em tratamentos com *pool* as capacidades de fertilizações entre os machos variaram de 4 a 65%. Os resultados evidenciam que a utilização de *pool* de sêmen favorece gametas de alguns machos sobre outros, reduzindo desta forma a variabilidade genética da progênie. Devido à superioridade de fertilização que alguns machos de jundiá apresentaram neste trabalho, sugerimos que se evite a utilização de *pool* de sêmen durante a fertilização, principalmente em reproduções que visem repovoamento de ambientes naturais.

Palavras-chave: microssatélites; *pool* de sêmen; paternidade; diversidade genética.

ABSTRACT

Individual contributions in milt pool-fertilizations of jundiá (*Rhamdia quelen*).

Supplementary stocking of fish in natural environments is a way to mitigate or compensate the changes caused by river-damming to wild populations. Because little is known about the genetic composition of such supplementary stocks obtained by milt pool-fertilization, the aim of this study was to determine the individual contribution of male jundiá (*Rhamdia quelen*) to offsprings born from such reproductive management. For paternity investigation, the microsatellite markers Pcor1, Pcor2, Rh1, PC17 and PC97 were used, 84% of the progenies analyzed were determined with 0.9724 combined exclusion probability. Male broodstock had good fertilization capacity when used alone, but when used in milt pools the fertilization capacities varied from 4 to 65%. Results show that milt pools favor gametes of some males rather than others, thus reducing genetic variability of the progeny. Due to the higher fertilization capacity of some male jundiá found in this study, we do not recommend milt pool-fertilizations, especially for supplementary stocking in natural environments.

Keywords: microsatellites; milt pool; paternity; genetic diversity.

INTRODUÇÃO GERAL

As bacias hidrográficas da região neotropical possuem uma extensa biodiversidade de peixes de água doce com mais de duas mil espécies catalogadas, correspondendo a 21% das espécies mundiais (BUCKUP e MENEZES, 2003). Localizado na Bacia do Prata, o alto rio Uruguai possui 98 espécies de peixes descritas, destas, 14 apresentam importância na pesca ou potencial para a aquicultura (ZANIBONI FILHO et al., 2004) destacando o jundiá, *Rhamdia quelen* (Siluriformes:Heptapteridae).

A família Heptapteridae é formada por 22 gêneros e 204 espécies (FROESE e PAULY, 2007), sendo 11 pertencentes ao gênero *Rhamdia* (SILFVERGRIP, 1996), porém no Brasil somente seis espécies foram registradas: *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824), *R. foina* (MULLER & TROSCHER), *R. itacaiunas* (SILVERGRIP), *R. laukidi* Bleeker, *R. mulleri* (GÜNTHER), *R. poeyi* (EIGNMANN & EIGNMANN) e *R. jequetinhonha* (SILVERGRIP) (BOCKMANN e GUAZZELLI, 2003). O jundiá apresenta ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde a bacia do rio Orinoco até a bacia do rio Paraná (PERDICES et al., 2002). Zaniboni Filho e Schulz (2003) registraram a presença desta espécie em todo trecho da bacia do alto rio Uruguai, incluindo seus tributários. Esta espécie apresenta migração lateral e hábito alimentar omnívoro, com clara preferência por peixes, crustáceos, insetos, restos vegetais e detritos orgânicos (GUEDES, 1980; MEURER e ZANIBONI FILHO, 1997).

O aumento do cultivo do jundiá, principalmente no sul do Brasil, Uruguai e Argentina deve-se a diversos fatores, entre eles, sua facilidade de adaptação a diferentes ambientes e temperaturas (GOMES et al., 2000), ótimas características zootécnicas, facilidade no manejo e a boa aceitação de mercado (POUEY et al., 1999). Fatores estes que incentivaram pesquisas relacionadas à patologia (SHAMA 1997; BORGES et al. 2004; FERRARI-HOEINGHAUS et al., 2006), nutrição (COLDEBELLA e RADÜNZ NETO, 2002; LAZZARI et al., 2006), reprodução (BOMBARDELLI et al., 2006), larvicultura (MAFFEZZOLI e NUÑER 2006), fisiologia (MIRON et al., 2003; VIEIRA et al., 2006) e a produção (FRACALOSSO et al., 2004; SILVA et al., 2005).

O bom desempenho de organismos aquáticos no cultivo e na pesca depende da manutenção de boas condições ambientais, que podem ser comprometidas por modificações tanto de origem natural quanto antropogênica, promovendo acelerações nos processos de redução de populações e até mesmo extinção de espécies (Vrijenhoek, 1998; Agostinho et al., 2007). Dentre as maiores causas de redução da diversidade em águas interiores brasileiras estão a poluição e eutrofização dos rios, construções de barragens hidrelétricas e controle de cheias, pesca e introdução de espécies (AGOSTINHO et al., 2005).

O maior número de introduções de espécies no Brasil ocorreu na década de 70, época de grande aumento no número de reservatórios hidrelétricos e massivas estocagem de espécies não-nativas, justificadas como necessárias para mitigar ou compensar as alterações impostas à ictiofauna e à pesca pelo represamento (AGOSTINHO et al., 2007). A estocagem de suplementação é uma medida destinada a recompor estoques, devendo ser cumprida com objetivos claros e específicos, principalmente por ser a segunda causa de extinção de espécies devido ao comprometimento do *pool* gênico da população silvestre receptora (AGOSTINHO et al., 2007).

Allendorf e Ryman (1987) e Hindar et al. (1991) destacaram que a redução da variabilidade genética dos estoques fundadores em estações de piscicultura que realizam repovoamento de ambientes naturais resulta em efeitos genéticos deletérios no estoque selvagem. A redução da carga genética em reproduções artificiais se deve em grande parte ao manejo reprodutivo durante a fertilização e a utilização de estoques fundadores com baixos tamanhos efetivos. Segundo Allendorf e Phelps (1980), a redução da variabilidade genética gera mudanças estocásticas nas frequências alélicas causada pelos endocruzamentos, comprometendo desta maneira as próximas gerações.

O número mínimo de reprodutores recomendados para evitar a redução da variabilidade genética é de cinquenta casais de matrizes (50 machos e 50 fêmeas), acasalados separadamente, para que todos possam contribuir igualmente na formação da próxima geração (ALLENDORF e PHELPS, 1980; GHARRET e SHIRLEY, 1985; FALCONER, 1996). As principais causas de redução da variabilidade genética são atribuídas à escolha de um pequeno número efetivo de reprodutores (N_e), acasalamentos de indivíduos aparentados e proporção desigual de machos e fêmeas durante a reprodução são as principais causas de redução da variabilidade genética (SEKINO et al., 2002). Entretanto, o número de reprodutores mantidos em cativeiro é geralmente menor que o recomendado, devido principalmente às dificuldades de manutenção dos reprodutores, como os elevados custos para a implantação de instalações adequadas e fornecimento de alimentação de qualidade (CYRINO et al., 2004).

Muitas vezes, os reprodutores são utilizados conjuntamente ou repetidamente, devido ao método de fertilização externa que permite a manipulação dos gametas femininos e masculinos antes da ativação com água. Segundo Withler (1988), quando as espécies apresentam volume de sêmen abundante, vários machos são utilizados para a fertilização de ovócitos de uma ou mais fêmeas, com a finalidade de prevenir a perda de gametas femininos pela infertilidade do macho. Entretanto, as diferenças nas contribuições de gametas parentais em fertilizações com *pool* de sêmen, podem reduzir o tamanho efetivo do estoque reprodutor e aumentar a variação entre as famílias (ALLENDORF e RYMAN 1987).

Relatos de variações do potencial de machos em fertilizações com *pool* de sêmen foram verificados com uso de isoenzimas para teste de paternidade em salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) (GHARRET e SHIRLEY, 1985; WITHLER, 1988; WITHLER e BEACHAM, 1994) e em truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (GILE e FERGUSON, 1995). Os resultados desses trabalhos indicaram que o sêmen de alguns peixes apresentou boa capacidade de fertilização somente quando utilizados individualmente, com pequena parcela de contribuição para a formação da progênie quando empregados em cruzamentos com *pool* de sêmen.

Técnicas de biologia molecular têm sido ferramentas úteis para o estudo da variabilidade genética em populações naturais e cultivadas. Com o desenvolvimento da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*), tornaram-se possíveis estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos de qualquer organismo vivo. Ela baseia-se na síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, realizada através da enzima DNA polimerase, que permite a quantificação e análise da variabilidade genética dentro e entre populações de qualquer organismo. Com base nas diferenças e semelhanças de seqüência de bases de segmentos de DNA é

possível o estabelecimento de hipóteses sobre as relações de parentesco ou relações filogenéticas entre grupos ou populações.

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança Mendeliana, facilmente reconhecidas e cuja expressão não sofre influência ambiental (ROBINSON, 1998), podendo ser morfológicos, bioquímicos ou moleculares. Os primeiros marcadores foram as isoenzimas, seguidas pelo RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorfism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), microssatélites e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), que são mais utilizados atualmente.

As investigações sobre a estrutura genética de populações têm sido realizadas através de eletroforese de enzimas e em nível de DNA. O desenvolvimento de marcadores moleculares possibilitou a ampliação dos conhecimentos sobre populações de espécies nativas (GAIOTTO, 2001), sendo freqüentemente, utilizados como ferramenta para responder a diversas questões sobre genética de populações como análise de paternidade e fluxo gênico (WRIGHT e BENTZEN, 1994), além de possibilitar estratégias reprodutivas alternativas em manejos de melhoramento genético e manejo de populações cultivadas. Quando as características morfológicas são difíceis de controlar e as progênes são numerosas, os testes de paternidade se tornam justificáveis (OLIVEIRA, 1999) e recomendados quando o fenótipo do indivíduo não indica a sua procedência (BARON, 2000).

Testes de paternidade, estudos de estrutura populacional e análise de diversidade genética em peixes têm sido amplamente realizados por marcadores microssatélites, por apresentarem alto conteúdo informativo, serem multivariáveis e codominantes (INNOCENTIIS et al., 2005; BARROSO et al., 2005), superando muitas das dificuldades associadas a outros tipos de marcadores (GLOWATSKI et al., 1995). Os marcadores microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeat*) são seqüências de 1-6 pb de comprimento repetidas em *tandem*, encontradas em alta freqüência e com ampla distribuição nos genomas dos eucariotos (LITT e LUTY, 1989; WEBER e MAY, 1989). Podem ser utilizados via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), permitindo uma padronização dos protocolos entre os laboratórios (GLOWATZKI et al., 1995).

A análise de *loci* microssatélite é realizada utilizando-se iniciadores (*primers*) complementares (18 a 25 bases) às regiões repetitivas que os flanqueiam. Essas regiões podem ser altamente conservadas em grupos taxonômicos relacionados (PRIMMER et al., 1996), permitindo a utilização de *primers* desenvolvidos para uma determinada espécie em espécies relacionadas, porém com menor acurácia com aumento da distância evolutiva da espécie para a qual os *primers* foram desenvolvidos (MOORE et al., 1991). A possibilidade de sucesso da amplificação heteróloga de seqüências de DNA por PCR em espécies do mesmo gênero e até mesmo de gêneros diferentes tem tornado menos proibitivo o uso de marcadores microssatélite em espécies de peixes nativos.

Inicialmente a estrutura genética de peixes nativos foi estudada através de isoenzimas. Revaldaves et al. (1997) analisaram a variabilidade genética das subpopulações de curimba, *Prochilodus lineatus*, coletadas em três localidades da bacia do rio Paraná, através de isoenzimas. Os valores de distância e identidade genética sugerem que no trecho da planície de inundação, *P. lineatus* representa uma única unidade reprodutiva com alto fluxo gênico. PERES et al., 2002, também utilizado sistemas enzimáticos investigaram a variabilidade genética de *Hoplias malabaricus*

de duas localidades da planície de inundação no Rio Paraná, e encontraram diferenças significativas entre as duas localidades.

Wasko e Galetti Jr. (2002) utilizando marcadores RAPD, analisaram exemplares de *Brycon lundii* coletados de diferentes localidades do rio São Francisco e verificaram a existência de pelo menos das populações distintas, devido, provavelmente, a migrações diferenciadas. O marcador RAPD também foi uma ferramenta utilizada por Almeida et al. (2003) para averiguar a variabilidade genética de espécimes de *Pimelodus maculatus* de diferentes localidades nos rios Tietê e Paranapanema. Os autores constataram diferentes níveis de diversidade genética, com maior estruturação dos peixes do rio Paranapanema em relação ao rio Tietê, devido ao maior fluxo gênico deste em relação a aquele. A diferenciação genética encontrada nas localidades do rio Paranapanema deveria ser considerada em caso de repovoamento de peixes neste rio.

Wasko et al. (2004) investigaram a diferença genética de três estoques de peixes cultivados em relação a uma população nativa de *Brycon cephalus* do rio Amazonas, através do marcador RAPD. Os pesquisadores verificaram maior polimorfismo da população nativa (85,4%) em relação aos estoques cultivados (72,0%, 79,7% e 81,8%). Esses valores de diversidade genética devem ser levados em consideração, em caso de reproduções que visem a introdução de peixes no ambiente natural, para que não aconteça redução carga genética dos estoques selvagens.

Analisando espécimes de curimatá (*Prochilodus marginatus*) de diferentes localidades do rio São Francisco, Hatanaka e Galetti Jr. (2003) e Hatanaka et al. (2006) utilizaram marcadores RAPD e microssatélites, respectivamente, e verificaram simpatria entre os diferentes pontos. Segundo os autores, a formação de diferentes populações pode se devido a diferentes migrações reprodutivas nestas áreas.

Marcadores RAPD foram utilizados por Sanches e Galetti Jr. (2002) para estudar a estrutura populacional de *Brycon microlepis*, a fim de conservação. Leuzzi et al. (2004) pesquisaram a diferenciação genética de exemplares de *Astyanax altiparanae* de três localidades do Rio Paranapanema (baixo, médio e alto) através do Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso. Os autores verificaram que a população no mais baixo Paranapanema é geneticamente diferente dessas nas seções medianas e superiores. O marcador RAPD também foi utilizado como ferramenta para estudo da variabilidade genética de espécimes de *Astyanax scabripinnis* do rio Cambe (SOFIA et al., 2006) e de quatro espécies de peixes da bacia do alto rio Uruguai (RAMELLA et al., 2006).

Estudos visando a conservação genética e o manejo reprodutivo de algumas espécies de peixes nativos foram executados com êxito através de DNA mitocondrial: Martins et al. (2003) verificaram a variabilidade genética em populações de *Leporinus elongatus* da bacia do alto rio Paraná e Muriel-Cunha et al. (2005) solucionaram a filogenia de táxons de catfish.

Os marcadores microssatélites foram utilizados como ferramenta para o manejo de reprodutores de linguado, *Paralichthys olivaceus* (SEKINO et al., 2004). A diversidade genética de populações cultivadas e de sete populações selvagens de *Brycon opalinus* foi investigada através de microssatélites por Barroso et al. (2005). Os resultados deste trabalho sugerem que cada população é uma unidade diferente. As análises de diversidade genéticas são importantes tendo implicações para o manejo de pesca, piscicultura e conservação dos estoques.

De acordo com Sirol e Brito (2006) o repovoamento é uma das estratégias necessárias à realização dos objetivos estabelecidos no plano de manejo de reservatórios. No entanto, impactos causados pela degradação genética podem reduzir o contingente populacional de algumas espécies nativas e inviabilizar uma população com a possibilidade da produção de proles estéreis comprometendo o patrimônio genético (AGOSTINHO et al., 2007). Do exposto, fica evidente a necessidade critérios ecológicos envolvendo um grande número de fatores, entre eles o manejo reprodutivo, abordado neste trabalho através de fertilizações com *pool* de sêmen, visando contribuir com a conservação dos recursos pesqueiros.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Fornecer bases de manejo genético reprodutivo de peixes nativos do alto rio Uruguai, para auxiliar na elaboração de programas de repovoamento visando à conservação dos estoques pesqueiros e a variabilidade genética das espécies.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Verificar a taxa de fertilização e de sobrevivência de jundiá, *Rhamdia quelen* nos diferentes cruzamentos;
2. Determinar a proporção parental individual de machos na fertilização individual e na mistura de sêmen de diferentes parentais na progênie de jundiá, através do uso de marcadores microssatélites.

O artigo científico apresentado foi redigido de acordo com as normas da Revista *Journal of Fish Biology*, o qual será posteriormente submetido para publicação.

**CONTRIBUIÇÃO INDIVIDUAL DE MACHOS DE JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)
EM FERTILIZAÇÕES COM *POOL* DE SÊMEN
INDIVIDUAL CONTRIBUTIONS IN MILT *POOL*-FERTILIZATIONS
OF JUNDIÁ (*Rhamdia quelen*)**

Josiane Ribolli[†], Adriana Mesquita Dantas[‡], Evoy Zaniboni Filho*

*Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce (LAPAD), Departamento de Aqüicultura, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia SC 406, 3532, Florianópolis, Santa Catarina, CEP 88066-000, Brasil.

[‡]Pesquisadora Capes/Prodoc, Departamento de Fitotecnia, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rodovia Admar Gonzaga, 1346, Florianópolis, Santa Catarina, CEP 88034001, Brasil.

RESUMO

Devido à falta de informações sobre a composição genética dos estoques repovoadores obtidos através de manejos reprodutivos com *pool* de sêmen, este trabalho teve como objetivo verificar a contribuição individual de machos de jundiá (*Rhamdia quelen*) em alevinos obtidos a partir de fertilizações utilizando *pool* de sêmen de machos distintos. Para a investigação da paternidade, foram utilizados os marcadores microssatélites Pcor1, Pcor2, Rh1, PC17 e PC97, permitiram determinar 84% das progênies analisadas, com probabilidade de exclusão combinada de 0,9724. Todos os reprodutores utilizados apresentaram boa capacidade de fertilização quando empregados individualmente, porém, quando utilizados em tratamentos com *pool* as capacidades de fertilizações entre os machos variaram de 4 a 65%. Os resultados evidenciam que a utilização de *pool* de sêmen favorece gametas de alguns machos sobre outros, reduzindo desta forma a variabilidade genética da progênie. Devido à superioridade de fertilização que alguns machos de jundiá apresentaram neste trabalho, sugerimos que se evite a utilização de *pool* de sêmen durante a fertilização, principalmente em reproduções que visem repovoamento de ambientes naturais.

Palavras-chave: microssatélites; *pool* de sêmen; paternidade; diversidade genética.

ABSTRACT

Because little is known about the genetic composition of such supplementary stocks obtained by milt pool-fertilization, the aim of this study was to determine the individual contribution of male jundiá (*Rhamdia quelen*) to offsprings born from such reproductive management. For paternity investigation, the microsatellite markers Pcor1, Pcor2, Rh1, PC17 and PC97 were used, 84 % of the progenies analyzed were determined with 0.9724 combined exclusion probability. Male broodstock had good fertilization capacity when used alone, but when used in milt pools the fertilization capacities varied from 4 to 65 %. Results show that milt pools favor gametes of some males rather than others, thus reducing genetic variability of the progeny. Due to the higher fertilization capacity of some male jundiá found in this study, we do not recommend milt pool-fertilizations, especially for supplementary stocking in natural environments.

Key words: microsatellites; milt pool; paternity; genetic diversity.

INTRODUÇÃO

O Jundiá (*Rhamdia quelen*) é uma espécie que apresenta ampla distribuição geográfica ocorrendo desde a Argentina até o sul do México (Silfvergrip, 1996). O desempenho produtivo no cultivo e pesca de organismos aquáticos necessita da manutenção de boas condições ambientais para que a diversidade genética da população seja mantida, evitando processos de redução de populações e extinção de espécies, que são causadas principalmente pela poluição e eutrofização dos rios, construção de barragens hidrelétricas, pesca, e introdução de espécies tanto nativas quanto exóticas (Agostinho et al., 2005). O repovoamento dos estoques é uma estratégia muito utilizada visando à manutenção da biodiversidade das bacias (Sirol & Britto, 2006), porém, quando não são utilizadas técnicas de manejo de reprodução adequadas, essas medidas podem causar reduções na variabilidade genética nos estoques repovoadores, inferindo diretamente em efeitos genéticos deletérios no estoque selvagem receptor e conseqüentemente pode levar a extinção da espécie (Allendorf & Ryman, 1987; Hindar et al., 1991).

Devido a restrições de espaço e dificuldade de capturar reprodutores selvagens, um pequeno número de machos é muitas vezes mantido e utilizado repetidamente para a fertilização de um grande número de fêmeas, de forma que o sêmen de vários machos possa ser aplicado seqüencialmente ou misturado antes da adição de água (Withler, 1988). A competição dos espermatozoides quando o *pool* de sêmen é utilizado para a fertilização, resulta em diferentes contribuições de gametas parentais nos descendentes, diminuindo o tamanho efetivo do estoque reprodutor (Allendorf & Ryman, 1987; Campton & Utter, 1985). No entanto, alterações no tamanho efetivo do estoque fundador podem ser reduzidas com a maximização (Krueger et al., 1989) e utilização de iguais proporções de reprodutores (Allendorf & Phelps, 1980). Variações na capacidade de fertilização com *pool* de sêmen foram relatadas através da verificação de parentesco para salmão (*Oncorhynchus tshawytscha*) (Gharret & Shirley, 1985; Withler, 1988; Withler & Beacham, 1994) e em truta arco-iris (*Oncorhynchus mykiss*) (Gile & Ferguson, 1995). Os autores verificaram redução na capacidade de fertilização de alguns machos quando o sêmen foi utilizado na mistura com o sêmen de outros machos. Os efeitos da liberação de peixes sem os cuidados de manejo podem ser numerosos, como depleção da diversidade genética, contaminação por doenças e aumento da competição (Allendorf & Phelps, 1980).

O repovoamento de ambientes degradados é uma estratégia necessária à realização dos objetivos estabelecidos no plano de manejo de reservatórios, que devem seguir critérios ecológicos envolvendo o manejo reprodutivo (Sirol & Brito, 2006). Devido à utilização de *pool* de sêmen ser um procedimento rotineiramente realizado em pisciculturas, há necessidade de se investigar a proporção parental nos descendentes, e conseqüentemente a estrutura genética da população repovoadora.

Marcadores genéticos moleculares têm se tornado uma ferramenta de pesquisa muito importante na investigação de estratégias reprodutivas alternativas, implantação de programas de melhoramento genético, manejo reprodutivo e extinção de espécies de peixes (O'Reilly et al., 1998). A estrutura de populações cultivadas pode ser determinada com grande eficiência por marcadores microsatélites, devido ao alto poder informativo e co-dominância (Herbinger et al., 1995). Vários

estudos têm demonstrado a capacidade desses marcadores para determinar relações de parentesco em populações cultivadas e selvagens (Herbinger *et al.*, 1995; Hara & Sekino, 2003; Sekino, 2004; Castro *et al.*, 2004; Dong *et al.*, 2006; Jerry *et al.*, 2006). Com objetivo de fornecer bases de manejo genético reprodutivo visando à conservação dos estoques pesqueiros e a variabilidade genética das espécies, foi verificada a taxa de fertilização e de sobrevivência do jundiá em diferentes acasalamentos e determinada a proporção parental individual na fertilização utilizando *pool* de sêmen, através de marcadores microssatélites.

MATERIAIS E MÉTODOS

REPRODUÇÃO E LARVICULTURA

O trabalho foi realizado na Universidade Federal de Santa Catarina. A reprodução foi conduzida no Laboratório de Biologia e Cultivo de Peixes de Água Doce e a análise genética foi realizada no Laboratório de Fisiologia do Desenvolvimento e Genética Vegetal. Os reprodutores de *Rhamdia quelen* utilizados no experimento foram coletados de populações nativas do rio Uruguai, na divisa dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Os animais foram conduzidos ao laboratório, induzidos e extrusados segundo metodologia descrita por Woynarovich & Horváth (1980). Os gametas masculinos e femininos foram coletados em recipientes específicos e mantidos separadamente para a quantificação do volume de sêmen e do número de ovócitos, além de propiciar fertilizações direcionais. A fertilização a seco foi realizada através da mistura de 1,0 g de ovócitos de cada fêmea com 40 µL de sêmen de cada macho (controle) ou da mistura de 10 µL de sêmen oriundo de quatro machos distintos (tratamento), de acordo com o desenho experimental (Tabela I). Após a adição de 100 mL de água para a ativação dos espermatozóides e estimular a fertilização, os ovos foram lavados, hidratados e transferidos para incubadoras individuais para cada cruzamento.

Tabela I. Cruzamentos direcionados dos ovócitos das fêmeas de *Rhamdia quelen* com gametas provenientes de um único macho (controle) e da mistura do sêmen de quatro machos (tratamento).

	Controle						Tratamento		
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Pool A ¹	Pool B ²	Pool C ³
F1	X	X	X	X			X		
F2	X	X			X	X		X	
F3			X	X	X	X			X

¹Pool A (M1+M2+M3+M4), ²Pool B (M1+M2+M5+M6) e ³Pool C (M3+M4+M5+M6)

* todos os cruzamentos foram realizados em triplicata.

A concentração de células espermáticas de todos os machos foi mensurada através de capilares para microhematócrito submetidos à centrifugação em microcentrífuga por 5 minutos. O tempo de duração da motilidade do sêmen foi avaliado subjetivamente para expressar a porcentagem total de espermatozóides móveis, ativando o sêmen com água destilada e observando em microscópio em aumento de 400x. A motilidade progressiva foi avaliada utilizando uma escala relativa de 0 a 5 pontos, correspondentes a motilidade de 0 à 100% (Carolsfeld, 2003). As taxas de fertilização (n° ovos em estágio de fechamento do blastóporo $\times 100 / n^\circ$ ovos observados) foram mensuradas aproximadamente 15 horas após a fertilização dos ovócitos, e a verificação da sobrevivência total das larvas foi realizada aproximadamente 72 horas após a eclosão. Todos os parâmetros de avaliação de sêmen foram realizados com três repetições.

Os resultados de motilidade e concentração espermática, espermátocrito, taxa de fertilização e sobrevivência larval foram submetidos à análise de variância. Quando houve diferença significativa entre os tratamentos, suas médias foram comparadas pelo teste de Tukey, com nível de significância de 5%.

AMOSTRAGEM, EXTRAÇÃO DO DNA E ANÁLISES DOS MICROSSATÉLITES

Amostras da nadadeira caudal dos reprodutores bem como, larvas com aproximadamente 5,0 g, amostradas aleatoriamente, foram identificadas, armazenadas em etanol 70% e mantidas em freezer -20°C para análise de DNA. O DNA foi extraído da nadadeira caudal dos reprodutores e do tecido muscular das larvas, maceradas na presença de nitrogênio líquido (Monesi *et al.*, 1998). Após a extração com fenol/clorofórmio, o DNA foi precipitado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE (0,1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,01 mM EDTA) contendo RNase ($20 \mu\text{g mL}^{-1}$). Alíquotas de DNA foram quantificadas por comparação DNA padrão do fago λ conhecidos (20, 50, 100 ng/ μL) em gel agarose 1%.

Inicialmente 21 iniciadores SSRs foram testados, e cinco *loci* microssatélites foram selecionados: *Pcor 1* (AY737063) e *Pcor 2* (AY737064) (Revaldaves *et al.*, 2005); *PC 17* (AY833371) e *PC 97* (AY833377) (Moeser & Bermingham, 2005); *RH 1* (Alves *et al.*, 2006) (Tabela II).

As amplificações foram feitas em um volume final de 14 μL contendo 10 ng de DNA, 0,3 μM de cada iniciador, 1,5 mM MgCl_2 , 0,25 U Taq-polimerase. Para os SSRs PC 17 e PC 97, utilizou-se 1,4 mM MgCl_2 . As amplificações de microssatélites foram executadas em Termociclador PT-100 Thermal Controller, com desnaturação inicial de 3 min a 95 °C, 30 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min na temperatura de anelamento (Tabela II) e 1 min a 72 °C, com extensão final por 10 min a 72 °C. Os produtos amplificados foram revelados em gel desnaturante de poliacrilamida 4% (10 mL de bis-acrilamida 40%, 42,0 g de uréia em 10 mL de TBE 5X), 200 μL de APS 10% e 84 μL de TEMED/50 mL de solução de gel. Para revelação, o gel foi fixado em álcool etílico 10%, ácido acético 1% e corado com nitrato de prata 0,2% (Creste *et al.*, 2001).

Tabela II. Loci e seqüências dos SSRs utilizados, temperatura de anelamento e número de acesso em GenBank.

SSR	Seqüência de primers (5'-3')	Repetição	Ta (°C)	Número de acesso (GenBank)
<i>Pcor 1</i>	F: AAACCCGAGGATAACCAAGTC R: CAGCGTGCTACTAACACAAAC	(TC) ₉ GC(TC) ₉	50	AY737063
<i>Pcor 2</i>	F: GATATGCAAATAAGAAGGTC R: TCTTCTGGCTTTTCCTCCTCT	(AG) ₁₉	51	AY737064
<i>RH 1</i>	F: TTACTIONGGGATACGATGC R: TTGTCAGAGTGCCAAAGG	-	56	*
<i>PC 17</i>	F: CACGACGTTGTAAACGAC GCCTGCCAGGTAAATCTGAA R: AGGTATGCGGAACACTGACC	(CA) ₂₁	53	AY833371
<i>PC 97</i>	F: CACGACGTTGTAAACGACG TTGGTTTGAGGTCGGTTTG R: GAACAGTGAGAGCGGAGAC	(CA) ₁₄	54	AY833377

Ta = temperatura de anelamento. F= *primer Forward*. R= *primer Reverse*.

* SSR não publicado no GenBank.

Obtido o genótipo de todos os parentais e progênies, foi utilizado o programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.*, 1998) para determinar as freqüências alélicas das populações, que foram usadas como base para determinar a paternidade das progênies. Os parâmetros de simulação envolveram 10.000 repetições, com proporção de 100% dos candidatos a pais amostrados e erro de genotipagem de 1%. Os níveis de confiança adotados foram 95% restrito e 80% relaxado. A probabilidade de exclusão foi estimada a partir do genótipo conhecido da progênie, da mãe e dos candidatos a pai.

RESULTADOS

A concentração espermática dos machos variou de 1,72 a 4,76 x 10¹⁰ espermatozóides por mL⁻¹, com maior concentração espermática do macho M3 em relação aos machos M1, M4, M5 e M6 (p<0,05). As taxas de espermatócrito variaram de 4,4 a 24,6%, com valores superiores observados para os machos M3, M4 e M6 (24,6, 23,5, 23,9% respectivamente). Foi observada correlação linear positiva entre espermatócrito e concentração espermática (r=0,47), e entre espermatócrito e paternidade no cruzamento *pool C* (r=0,44). A motilidade espermática variou de 38,5 a 97,8 segundos (M1 e M5, respectivamente), e as taxas de fertilização dos cruzamentos controle foram acima de 77%, enquanto que nos tratamentos com *pool* de sêmen esse valor foi superior a 83%. Não houve diferença na taxa de fertilização dos tratamentos com *pool* de sêmen, bem como também nos cruzamentos com a fêmea F1 (p>0,05), já nos cruzamentos M1F2 e M5F2 as taxas de fertilização (95,4 e 98,5% respectivamente) foram superiores ao M6F2 (77,1%). Nos cruzamentos controle com a

fêmea F3, a taxa de fertilização do M4F3 foi superior ao M6F3, porém entre os demais cruzamentos não houve diferenças (Tabela III).

Tabela III. Valores médios e desvio padrão ($P < 0,05$) da concentração espermática, espermatócrito, motilidade espermática, taxa de fertilização e de sobrevivência larval para cada cruzamento.

Fêmea	Macho	Concentração células/ml	Espermatócrito %	Motilidade s	Fertilização %	Sobrevivência %
1	1	1,89±0,31x10 ^{10b}	7,5 (± 0,57) ^c	38,5±8,3 ^{bc}	93,4 (± 4,8) ^a	22,4 (± 13,1) ^b
	2	3,10±0,89x10 ^{10ab}	7 (± 0,01) ^c	40,3±2,1 ^c	89,8 (±4,2) ^{abc}	62,5 (± 20,6) ^{ab}
	3	4,76±0,85x10 ^{10a}	24,6 (± 0,48) ^a	62,8±8,8 ^{ab}	89,9 (± 6,6) ^{abc}	26,1 (± 11,3) ^b
	4	2,53±0,71x10 ^{10b}	23,5 (± 0,58) ^b	63,5±7,3 ^{ab}	86,1 (± 7,3) ^{abc}	22,9 (± 3,9) ^b
	Pool A	-	-	-	83,4 (± 8,5) ^{abc}	38,1(± 19,1) ^b
	Média				88,5	34,4
2	1	1,89±0,31x10 ^{10b}	7,5 (± 0,57) ^c	38,5±8,3 ^{bc}	95,4 (± 1,7) ^{ab}	54,7(± 34,7) ^{ab}
	2	3,10±0,89x10 ^{10ab}	7 (± 0,01) ^c	40,3±2,1 ^c	91,7 (± 2,5) ^{abc}	68,43(± 4,8) ^{ab}
	5	2,78±0,36x10 ^{10b}	4,4 (± 0,48) ^d	97,8±8,1 ^a	98,5 (± 1) ^a	89,81(± 10,8) ^a
	6	1,72±0,06x10 ^{10b}	23,9 (± 0,48) ^{ab}	74,5±5,2 ^{bc}	77,1 (± 2,7) ^c	81,5(± 25) ^a
	Pool B	-	-	-	98,0 (± 0,4) ^a	99,5(± 0,2) ^a
	Média				92,1	78,8
3	3	4,76±0,85x10 ^{10a}	24,6 (± 0,48) ^a	62,8±8,8 ^{ab}	93,6 (±2,3) ^{ab}	98,0 (± 0,6) ^a
	4	2,53±0,71x10 ^{10b}	23,5 (± 0,58) ^b	63,5±7,3 ^{ab}	98,2 (± 1,0) ^a	86,7 (± 21,7) ^a
	5	2,78±0,36x10 ^{10b}	4,4 (± 0,48) ^d	97,8±8,1 ^a	91,7 (± 1,7) ^{abc}	76,2 (± 5,8) ^a
	6	1,72±0,06x10 ^{10b}	23,9 (± 0,48) ^{ab}	74,5±5,2 ^{bc}	81,2 (± 6,4) ^{bc}	66,2 (± 12,3) ^{ab}
	Pool C	-	-	-	91,7 (± 1,8) ^{abc}	61,4 (± 4) ^{ab}
	Média				91,3	77,7

^{abc} Na mesma coluna, médias seguidas por diferentes letras são significativamente diferentes ($p < 0,05$).

A sobrevivência das larvas após 20 dias da eclosão foi de 22 a 99% entre os diferentes cruzamentos. Nos tratamentos com *pool* de sêmen, a progênie do tratamento com *pool* B apresentou taxa de sobrevivência superior à progênie do *pool* A ($p < 0,05$). A sobrevivência larval não apresentou diferença entre os machos, no entanto, nos cruzamentos F1M1, F1M3 e F1M4 a sobrevivência foi significativamente inferior aos cruzamentos F2M5, F2M6, F3M3, F3M4 e F3M5 ($p < 0,05$). Machos de *R. quelen* apresentaram diferentes números de descendentes quando o sêmen foi misturado com o de outros machos antes de ser aplicado nos ovócitos. As taxas de espermatócrito não refletiram a capacidade de fertilização dos machos nos cruzamentos controle. O macho M1 apresentou baixa taxa de espermatócrito (7,5%) e alta taxa de fertilização no cruzamento F1M1 (93,4%) ($p < 0,05$), no entanto o macho M6 proporcionou altos valores de espermatócrito (23,9%) e reduzida taxa de fertilização no cruzamento F2M6 (77,1%) ($p < 0,05$) (Tabela III).

O sucesso reprodutivo dos machos nos cruzamentos com *pool* de sêmen foi independente das fêmeas que participaram da fertilização ou da interação com outros machos, diferindo significativamente entre os tratamentos. A paternidade resultante de *pool* de sêmen não refletiu necessariamente a capacidade de fertilização de cada macho, quando comparados com as taxas de fertilização dos cruzamentos controle, podendo ser observadas variações na capacidade de fertilização dos machos que participaram dos tratamentos com *pool* de sêmen (Figura 1).

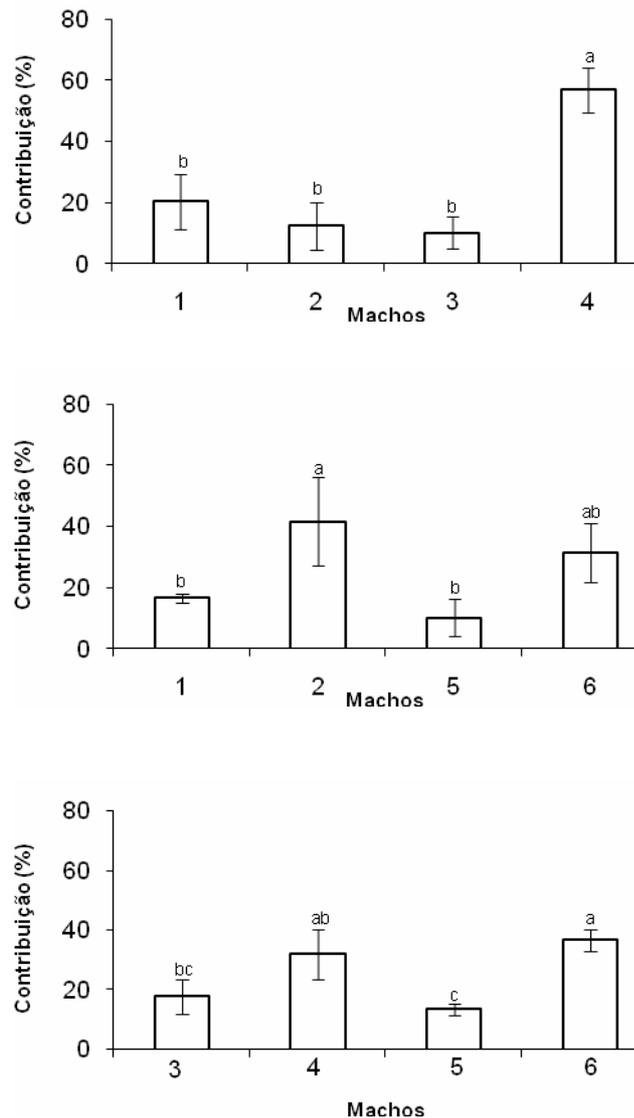


Figura 1. Média e desvio padrão da contribuição relativa de cada macho na formação da progênie quando a fertilização dos ovócitos de cada fêmea (1, 2, 3) foi feita com o *pool* do sêmen de quatro machos distintos (*Pool* A: M1+M2+M3+M4; *Pool* B: M1+M2+M5+M6; *Pool* C: M3+M4+M5+M6).

No tratamento *pool* A, o macho M4 apresentou superioridade de fertilização em relação aos outros machos, com 63% da progênie ($p < 0,05$). Os machos M1, M2, M3 contribuíram com 20,4, 12,5, 10,2% respectivamente, no entanto, os cruzamentos controle não apresentaram diferença

significativa na taxa de fertilização e na sobrevivência entre os machos que fertilizaram ovócitos da fêmea F1.

No *pool* B o macho M2 apresentou maior capacidade de fertilização (41,7%) em relação aos machos M1 e M5 (16,6 e 10,3% respectivamente), porém as taxas de fertilização nos cruzamentos controle M1F2 e M5F2 foram superiores ao cruzamento M2F2. A superioridade de fertilização do M2 (41,7%) em relação aos outros machos M1 (16,6%) e M5 (10,3%) não foi observada no cruzamento controle M2F2 em comparação aos outros cruzamentos oriundos da mesma fêmea (M1F2 e M5F2) ($p>0,05$). O número de descendentes do M6 (36,7%) no *pool* C foi significativamente superior aos machos a progênie produzida pelos machos M3 (17,8) e M5 (13,5%). O M5 teve uma menor contribuição que o macho M6 no tratamento *pool* C, no entanto, os cruzamentos controle M5F3 e M6F3 não apresentam diferença significativa na taxa de fertilização nem na sobrevivência larval ($p>0,05$). Os machos M4 e M6 apresentaram maior contribuição na fertilização dos cruzamentos com *pool* de sêmen. O M2 teve maior capacidade de fertilização somente no *pool* B, e os machos M1, M3 e M5 comportaram-se de forma semelhante nos dois cruzamentos que contribuíram, com baixas parcelas de contribuição na progênie (Figura 1).

A análise de paternidade permitiu a obtenção de resultados seguros em 201 progênies (84%) das 239 analisadas. A totalidade da paternidade não pode ser verificada devido a erros de genotipagem e resultados de difícil interpretação. O resumo estatístico dos microssatélites usados na simulação pode ser visto na tabela III. A probabilidade de exclusão por locus variou de 0,129 a 0,474, quando a informação da mãe era conhecida (Excl). O número de alelos de cada loci variou entre cinco para *PC17* e oito para *Pcor 2* e *RH1* (média de número de alelos/locus=6,6). A probabilidade de exclusão combinada (PEC) foi de 0,9724, e a média da heterozigosidade observada e do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram 0,770 e 0,706, respectivamente (Tabela IV).

Tabela IV. Locus SSR, Número de alelos, número de indivíduos amostrados (N), tamanho da amplitude dos alelos (pb), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), probabilidade de exclusão para cinco loci de microssatélites (PE) e equilíbrio de Hardy-Weinberg (WH).

SSR	N alelos	N	Amplitude dos alelos (pb)	H_o	H_e	PIC	PE	HW
<i>Pcor 1</i>	6	229	82-102	0,878	0,823	0,797	0,466	***
<i>Pcor 2</i>	8	219	180-280	0,941	0,826	0,800	0,474	***
<i>RH 1</i>	8	219	220-290	0,872	0,816	0,791	0,464	***
<i>PC 17</i>	5	227	240-262	0,714	0,734	0,686	0,300	**
<i>PC 97</i>	6	216	250-290	0,449	0,475	0,457	0,129	*

DISCUSSÃO

Testes de paternidade dependem do nível de informação que os microssatélites utilizados provêm, determinados pelo Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), Heterozigosidade (Het), Probabilidade de Exclusão (PE) e Probabilidade de Exclusão Combinada (CPE). Estes valores são dependentes do número de alelos e da distribuição de frequência destes na população. A utilização de cinco *loci* microssatélites foi capaz de determinar 84% da paternidade, porém, com menor probabilidade de exclusão combinada (0,9724) quando comparado com o valor ótimo para exclusão de paternidade desejável (0,9999). O conhecimento do genótipo da mãe no presente trabalho permitiu obter uma correta exclusão dos supostos pais, facilitando a identificação do parental verdadeiro e a redução de erros de genotipagem.

Historicamente, devido às dificuldades para isolar um grande número de marcadores microssatélites, muitos trabalhos têm utilizado quatro ou cinco *loci* microssatélites desenvolvidos para espécies de interesse (Jerry *et al.*, 2006). Os mesmos autores utilizaram sete microssatélites para assistir a paternidade de progênies obtidas de 13 famílias com genealogia conhecida, os quais resolveram 96% da paternidade, com CPE de 0,999. Estudos de parentesco utilizando cinco microssatélites foram realizados por alguns autores: Sugaya *et al.* (2002) verificaram paternidade de progênies obtidas de sete fêmeas de camarão tigre, *Penaeus japonicus*. Perez-Enriquez *et al.* (1999) determinaram mais de 73% da paternidade de progênies obtidas de cruzamentos com mais de 7800 possibilidades de casais de dourada do Japão, *Pagrus major*. Dong *et al.* (2006) identificaram 90,7% da progênie proveniente de uma população de camarão chinês *Fenneropenaeus chinensis*, obtida de 30 cruzamentos fatoriais, com CPE de 0,9991. Segundo esses autores, o uso de poucos microssatélites, porém representativos, podem ser uma alternativa prática em programas de aqüicultura.

Em estações de piscicultura, a adição simultânea do sêmen proveniente de vários machos para fertilizar ovócitos de uma ou mais fêmeas é uma prática freqüente. Este estudo revelou que quando o sêmen de quatro machos de *R. quelen* é misturado antes da inseminação dos ovócitos, a fertilização individual de cada macho não é proporcional ao volume de sêmen que compõem a mistura. Todos os reprodutores utilizados apresentaram boa capacidade de fertilização quando empregados individualmente nos cruzamentos controle, porém, quando utilizados em tratamentos com *pool* de sêmen proporcionaram grandes variações de fertilização, podendo ser observadas diferenças na participação entre 4 a 65%, quando o valor esperado era de 25% de paternidade para cada macho. Resultados similares aos encontrados neste trabalho foram relatados por Witlher (1988) para reprodutores de salmão *Oncorhynchus tshawytscha*, submetidos a *pool* de sêmen de três machos, onde a contribuição de cada macho variou de 1,4 a 75,6%.

Os reprodutores de *R. quelen* apresentaram elevadas taxas de fertilização quando utilizados em cruzamentos controlados, porém, alguns machos foram responsáveis apenas por uma pequena parcela de descendentes nos cruzamentos com *pool* de sêmen, evidenciando dominância de alguns machos. Campton & Utter (1985) observaram competição dos espermatozóides, quando o sêmen de vários machos de salmão do atlântico (*Salmo salar*) foi misturado para fertilizar um *pool* de ovócitos,

promovendo redução do número efetivo de reprodutores em relação ao esperado. A variabilidade existente entre o potencial dos machos não é simplesmente resultado de diferenças individuais, mas a capacidade de fertilização individual varia durante todo período reprodutivo (Withler, 1988). Desta forma, alguns machos podem produzir sêmen capaz de fertilizar os ovócitos quando utilizados individualmente em cruzamentos controlados, mas não apresentam expressiva contribuição quando aplicados em mistura de sêmen.

Manejes reprodutivos de indução à reprodução com fertilização artificial tendem a diminuir as diferenças existentes entre os reprodutores selecionados, equalizando a capacidade de fertilização entre eles. A indução hormonal de matrinxã, *Brycon amazonicus* promoveu uma diluição do sêmen, com aumento do volume do líquido seminal (Pardo-Carrasco *et al.*, 2006). Apesar da indução hormonal utilizada no presente trabalho, foram observadas diferenças na capacidade de fertilização dos machos utilizados na mistura de sêmen. A sobrevivência entre os cruzamentos controlados e de *pool* de sêmen de jundiá foram semelhantes dentro de cada tratamento, não sendo verificada mortalidade devido à qualidade dos gametas de um macho específico, com variações de sobrevivência larval entre as fêmeas.

Neste trabalho o macho M2 contribuiu de forma distinta nos dois tratamentos em que participou, enquanto no *pool* A teve 12,5% de contribuição e apresentou 31,9% no *pool* B. Resultados semelhantes foram evidenciados por Withler (1988), que não observou variação no potencial de fertilização de machos de *Oncorhynchus mykiss* em fertilizações com *pool* de sêmen. Segundo a autora, a variação na capacidade de fertilização observada em algumas espécies, pode ocorrer devido à interação entre os gametas masculinos ou às diferentes fêmeas envolvidas na fertilização. O tempo de motilidade espermática de exemplares de *R. quelen* utilizados por Billard *et al.* (1995) variou entre 38 e 97 segundos, mostrando valores muito variáveis entre os machos e entre sucessivas amostras obtidas de um mesmo macho, demonstrando dificuldade para a obtenção de dados representativos. O tempo de motilidade espermática do jundiá no presente trabalho não apresentou correlação com a taxa de fertilização nos cruzamentos controle e de *pool* de sêmen, sugerindo que o tempo de motilidade não seja um bom indicador da capacidade de fertilização dos machos. A falta de correlação entre motilidade espermática e sucesso de fertilização também foi relatada para machos de bacalhau, *Gadus morhua* (Rakitin, 1999).

A elevada concentração espermática dos machos M4 e M6 refletiu a boa contribuição na fertilização com *pool* de sêmen em que participaram, apesar disso, o macho M3 que também teve alta concentração espermática foi responsável por uma baixa taxa de fertilização nos dois tratamentos com *pool* de sêmen que participou. De acordo com Pardo-Carrasco *et al.* (2006) um dos efeitos da indução hormonal de machos de *B. amazonicus* é o aumento na secreção do líquido seminal, ocasionando um aumento no volume do sêmen, porém, sem indução da espermatogênese. Desta forma, apesar do maior volume de sêmen produzido, a concentração espermática e o espermátócito ficam reduzidos. O uso de espermátócito tem sido recomendado para determinar a densidade espermática, por ser um método prático e rápido, porém, segundo Withler (1988) e Gharrett & Shirley (1985) as variações de potencial de fertilização entre os machos não podem ser descritas por valores

de espermátocrito, devido às variações entre o tamanho das células espermáticas dos diferentes reprodutores.

No presente trabalho foi observada semelhança no espermátocrito para os machos M3 e M6 (24,6 e 23,9 respectivamente) e diferentes taxas de fertilização nos tratamentos com *pool* de sêmen (10,2 e 36%). Segundo Gile & Ferguson (1995), as relações entre concentração espermática e potencial masculino são obscuras, porém importantes, pois quando a concentração das células espermáticas de machos de truta arco-íris foi equalizada, a diferença entre a capacidade de fertilização dos machos foi significativamente reduzida. Semelhante ao observado para *R. quelen*, Rakintin (1999) e Aas *et al.* (1991) verificaram uma correlação linear positiva entre o espermátocrito e a concentração espermática para machos de bacalhau e salmão do atlântico, respectivamente.

Neste trabalho foi observada correlação positiva entre porcentagem de espermátocrito e paternidade no tratamento com *pool* C ($r=0,44$), entretanto, os outros cruzamentos não apresentaram essa correlação. Estes resultados refletem a complexidade da mistura de sêmen para a fertilização, pois, os parâmetros que avaliam a qualidade sêmen não refletem à capacidade de fertilização dos machos. Contudo, interações entre gametas, tanto femininos quanto masculinos podem ser mais importantes durante a fertilização do que parâmetros de qualidade espermática.

Em cruzamentos com *pool* de sêmen, assume-se que todos os participantes deixem descendentes na mesma proporção que contribuíram para a formação da mistura. Porém, este trabalho revelou que a contribuição de cada macho é desigual, resultando desta forma na redução do tamanho efetivo do estoque fundador, que de acordo com Falconer (1996), depende do número total de indivíduos que contribuem com genes para a próxima geração. De acordo com Hill (1979) a participação desigual dos reprodutores para a formação da geração seguinte pode ser motivada por diferenças no potencial de fertilização entre os indivíduos ou ainda, devido a metodologia de fertilização utilizada, que pode favorecer o sucesso de alguns gametas sobre os outros.

Devido a dificuldades de captura e manutenção dos reprodutores, algumas pisciculturas necessitam realizar fertilizações com *pool* de sêmen. Nesses casos, Gharrett & Shirley (1985) propõem que o *pool* seja realizado com sobreposição de pares de machos, fertilizando os ovócitos imediatamente após a mistura do sêmen, entretanto, Withler & Beacham (1994) afirmam que misturas de sêmen realizadas uma hora antes da aplicação nos ovócitos reduzem diferenças entre a capacidade de fertilização dos machos participantes do *pool*. A criopreservação de gametas masculinos pode ser uma maneira de maximizar o número efetivo de reprodutores em estações de piscicultura, permitindo direcionar esforços para a captura e manutenção principalmente de fêmeas.

CONCLUSÃO

Verificaram-se diferenças entre a capacidade de fertilização dos machos de *R. quelen* em cruzamentos com *pool* de sêmen demonstrando que o método de reprodução é, provavelmente, a maior causa de variação entre o potencial dos machos, quando comparados com cruzamentos de casais únicos.

Devido à superioridade de fertilização que alguns machos de jundiá apresentaram neste trabalho, deve-se evitar a utilização de *pool* de sêmen durante a fertilização, principalmente em reproduções que visem repovoamento de ambientes naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ARTIGO

- Aas, G. H.; Refstie, T. & Gjerde, B. (1991). Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture* **95**, 125-132. doi:10.1016/0044-8486(91)90079-M
- Agostinho, A., Thomaz, S. & Gomes, L. C. (2005). Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conservation Biology* **19** (3), 646–652. doi:10.1111/j.1523-1739.2005.00701.x
- Allendorf, F. W. & Phelps, S. R. (1980). Loss of Genetic Variation in a Hatchery Stock of Cutthroat Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* **109**, 537-543.
- Allendorf, F. W. & Ryman, N. (1987). Genetic management of hatchery stocks. In: *Population genetics and fishery management*. (Ryman N., Utter, F. eds.), pp.141-159. Washington Sea Grant Publications, University of Washington Press, Seattle.
- Alves, A. L. *et al.* (2006). Isolamento e caracterização de marcadores microssatélites no jundiá, *Rhamdia quelen* (Siluriformes: Heptapteridae) XI Brazilian Symposium on Fish Cytogenetics and Genetics. I InternationCongress of Fish Genetics. *Anais...* São Carlos, São Paulo.
- Billard, R. *et al.* (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture* **129**, 1- 4. doi:10.1016/0044-8486(95)90068-3
- Campton, D. E. & Utter, F.M. (1985) Natural hybridization between steelhead trout (*Salmo gairdneri*) and coastal cutthroat trout (*Salmo clarki clarki*) in two Puget Sound streams. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* **42** (1), 110–119.
- Carolsfeld, H. P. *et al.* (2003). Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* **63** (2), 472–489. Dói:10.1046/j.1095-8649.2003.00170.x
- Castro, J., *et al.* (2004). Potential sources of error in parentage assessment of turbot (*Scophthalmus maximus*) using microsatellite loci. *Aquaculture* **242**, 119-135. doi:10.1016/j.aquaculture.2004.09.010
- Creste, S.; Tulmann Neto, A. & Figueira, A. (2001). Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrilamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter* **19** (4), 299-306.
- Dong, S. *et al.* (2006). Parentage determination of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **258**, 283-288. doi:10.1016/j.aquaculture.2006.04.044
- Falconer, D.S. & Mackay, T. F. C. (1996) Introduction to quantitative genetic. 4. ed. London, Longman. 464 p.
- Gharrett, A.J. & S.M. Shirley. (1985). A genetic examination of spawning methodology in a salmon hatchery. *Aquaculture* **47**, 245–256. doi:10.1016/0044-8486(85)90071-7
- Gile, S. & Ferguson, M. M. (1995). Factors affecting male potency in pooled gamete crosses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Biology of Fishes* **42**, 267-275. doi:10.1007/BF00004920
- Hara, M. & Sekino, M. (2003). Efficient detection of parentage in a cultured Japanese *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. *Aquaculture* **217**, 107-114. doi:10.1016/S0044-8486(02)00069-8
- Herbinger, C. *et al.* (1995). DNA fingerprint based analysis of paternal and maternal effects on offspring growth and survival in communally reared rainbow trout. *Aquaculture* **137**, 245-256. doi:10.1016/0044-8486(95)01109-9

- Hill, W.G. (1979). A note on effective population size with overlapping generations. *Genetics* **92**, 317-322.
- Hindar, K., Ryman, N. & Utter, F. (1991). Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **48**, 945–957.
- Jerry, D. D. *et al.* (2006). Development of a microsatellite DNA parentage marker suite for black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Aquaculture* **255**, 542-547. doi:10.1016/j.aquaculture.2005.11.026
- Krueger, C. C. *et al.* (1989). Genetic differentiation among lake trout strains stocked into Lake Ontario. *Transactions of the American Fisheries Society*. **118**, 317–330.
- Marshall T.C. *et al.* (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* **7**, 639–655. doi:10.1046/j.1365-294x.1998.00374.x
- Moeser, A. A & Bermingham, E. (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). *Molecular Ecology Notes* **5** (2), 363–365. doi:10.1111/j.1471-8286.2005.00928.x
- Monesi, N. *et al.* (1998). The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma* **10**, 559-569.
- O'Reilly, P.T., Herbinger, C. & Wright, J.M. (1998). Analysis of parentage determination in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellites. *Animal Genetics* **29** (5), 363-370.
- Pardo-Carrasco, S. *et al.* (2006). Evaluation of milt quality of the yamú *Brycon amazonicus* under hormonal induction. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* **19** (2), 134-139.
- Perez-Enriquez R.; Takagi M. & Taniguchi N. (1999). Genetic variability and pedigree tracing of a hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* **173** (1), 413-423, 1999. doi:10.1016/S0044-8486(98)00469-4
- Rakitin, A. (1999). *Body size and reproductive success in Atlantic cod, Gadus morhua L.* Faculty of Graduate Studies of the University of Guelph. 151 p. Thesis.
- Revaldaves, E. *et al.* (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* **5** (3), 463–465. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00883.x
- Sekino, M. *et al.* (2004). Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* **233**, 163-172. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.11.008
- Silfvergrip, A.M.C. (1996). *A systematic revision of the neotropical catfish genus Rhamdia (Teleostei, Pimelodidae)*. Stockholm: Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History.
- Sirol, R. N. & Britto, S. G. (2006). Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. (Nogueira, M.G., Henry, R. & Jorcin, A., eds.), pp. 275-284. São Carlos: RiMA.
- Sugaya, T. *et al.* (2002). Inheritance mode of microsatellite DNA markers and their use for kinship estimation in kuruma prawn *Penaeus japonicus*. *Fisheries Science* **68** (2), 299-305. doi:10.1046/j.1444-2906.2002.00425.x
- Withler, R. E. & Beacham, T. D. (1994). Genetic consequences of the simultaneous or sequential addition of semen from multiple males during hatchery spawning of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Aquaculture* **126** (1-2), 11-23. doi:101016/0044-8486(94)90244-5

Witlher, R.E. (1988). Genetic consequences of fertilizing Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs with pooled milt. *Aquaculture* **68**, 15-25. doi:10.1016/0044-8486(88)90287-6

Woynarovich, E. & Horváth, L. (1980). The artificial propagation of warm-water finfishes - a manual for extension. *FAO Fisheries Technical Paper*, 201.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DA DISSERTAÇÃO

- AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: Eduem, 2007. 501 p.:il.
- AGOSTINHO, A.; THOMAZ, S., GOMES, L. C. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. **Conservation Biology**, Boston, v.19, n. 3, p. 646–652, 2005.
- ALLENDORF, F. W., RYMAN, N. Genetic management of hatchery stocks. In: **Population genetics and fishery management**. RYMAN N., UTTER, F. (eds.), p.141-159. Washington Sea Grant Publications, University of Washington Press, Seattle, 1987.
- ALLENDORF, F.W., PHELPS, S. R. Loss of Genetic Variation in a Hatchery Stock of Cutthroat Trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, Bethesda, 109, p. 537-543, 1980.
- ALMEIDA , F. S.; SODRÉ, L. M. K. S. CONTEL, E. P. B. C. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.
- BARON, E. E. **Investigação de paternidade e seus efeitos no melhoramento de bovinos da raça gir leiteiro**. Piracicaba: Escola Superior de Agricultura “Luis de Queiroz”, Universidade de São Paulo, 2000. 63p. Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo, 2000.
- BARROSO, R. M. et al. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiaie) using microsatellites. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, n. 1/4, p. 51-65, 2005.
- BOCKMANN F. A, G. M GUAZZELLI. Heptapteridae (Heptapterids). In: **Checklist of the freshwater fishes of South and Central America**. REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. (eds.), p. 406–431. Edipucrs, Porto Alegre, Brazil, 2003.
- BOMBARDELLI, A. R. et al. Dose inseminante para fertilização artificial de ovócitos de jundiá cinza, *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimardm, 1824). **Brazilian Journal of Animal Science**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1251-1257, 2006.
- BORGES, A. et al. Hematologic and serum biochemical values for jundiá (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiology and Bio-chemistry**, Amsterdam, v. 30, n. 1, 2004.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A. Eds. **Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil**. 2ª ed. 2003. Museu Nacional, Rio de Janeiro. [http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/\(02/2005\)](http://www.mnrj.ufrj.br/catalogo/(02/2005)).
- COLDEBELLA, I. J.; RADÜNZ NETO, J. Farelo de soja na alimentação de alevinos de jundiá *Rhamdia quelen*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n.3, p. 499-503, 2002.
- CYRINO, J. E. P. et al. (eds). **Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. 533p.: il.
- FALCONER, D. S., MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetic**. 4. ed. London, Longman, 1996. 464 p.

- FERRARI-HOEINGHAUS, A. P. et al. Host – parasite relationships of monogeneans in gills of *Astyanax altiparanae* and *Rhamdia quelen* of the São Francisco Verdadeiro River, Brazil. **Parasite**, Issy Les Moulineaux, v. 13, p. 315-320, 2006.
- FRACALOSSO, D. M. et al. Criação do jundiá, *Rhamdia quelen* e dourado, *Salminus brasiliensis* em viveiros de terra na região Sul do Brasil. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 26, n. 3, p. 345-352, 2004.
- FROESE, R.; D. PAULY (eds.). *FishBase*. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org (01/2007).
- GAIOTTO F. A.; BRONDANI R. P. V.; GRATTAPAGLIA D. Microsatellite markers for Heart of Palm—*Euterpe edulis* and *E. oleracea* Mart. (Arecaceae). **Molecular Ecology Notes**, Oxford: Inglaterra, v.1/2, p. 86-88, 2001.
- GHARRETT, A.J.; S.M. SHIRLEY. A genetic examination of spawning methodology in a salmon hatchery. **Aquaculture**, Amsterdam, v.47, p. 245–256, 1985.
- GILE, S.; FERGUNSON, M. M. Factors affecting male potency in pooled gamete crosses of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Environmental Biology of Fishes**, Dordrecht, v. 42, p. 267-275, 1995.
- GLOWATZKI-MULLIS, M-L.; GAILLARD, C.; WIGGER, G. Microsatellite-based parentage control in cattle. **Animal Genetic**, v. 26, p.7-12, 1995.
- GOMES, L.C. et al. Biologia do jundiá, *Rhamdia quelen* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, p. 179-185, 2000.
- GUEDES, D.S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia* spp.) na região central do Rio Grande do Sul (Pices, Pimelodidae)**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1980. 100p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, 1980.
- HATANAKA, T. et al. Population Substructuring in a Migratory Freshwater Fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, Roma, v.126, n. 1-2, 2006.
- HATANAKA, T.; GALETTI JR., P. M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.
- HINDAR, K.; RYMAN, N.; UTTER, F. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Ottawa, v.48, p. 945–957, 1991.
- INNOCENTIIS S. et al. Geographical origin of individual breeders from gilthead sea bream (*Sparus auratus*) hatchery broodstocks inferred by microsatellite profiles. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 247, p. 227-232, 2005.
- LAZZARI, R. et al. Diferentes fontes protéicas para a alimentação do jundiá (*Rhamdia quelen*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 36, n. 1, p. 240-246, 2006.

- LEUZZI, M. S. P. et al. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 27, n. 3, p. 355-362, 2004.
- LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 397-401, 1989.
- MAFFEZZOLLI, G.; NUÑER, A. P. O. Crescimento de alevinos de jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Pimelodidae), em diferentes concentrações de oxigênio dissolvido. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 41-45, 2006.
- MARTINS, C. et al. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2003.
- MEURER, S.; ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá, *Rhamdia quelen* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. In: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 12, 1997, São Paulo. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Ictiologia, 1997.
- MIRON, D.S. et al. Efficacy of different salt (NaCl) concentrations in the treatment of *Ichthyophthirius multifiliis*-infected silver catfish, *Rhamdia quelen*, fingerlings. **Journal of Applied Aquaculture**, Binghamton, v.14, p.155-161, 2003.
- MOORE, S. S. et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, San Diego, v.10, n. 3, p. 654-660, 1991.
- MURIEL-CUNHA, J. et al. Phreatobius cisternarum: using mtDNA to resolve the phylogenetic placement of a morphologically aberrant, incertae sedis catfish taxon (Ostariophysi: Siluriformes). In: 51o. Congresso Brasileiro de Genética, 2005, Águas de Lindóia. **Anais....** do 51º Congresso Brasileiro de Genética, 2005.
- OLIVEIRA, A. I. G. **Introdução ao melhoramento animal I**. Lavras: Universidade Federal de Lavras, 1995, 107p.
- PERDICES, A. et al. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 25, p. 172-189, 2002.
- PERES, M. D. et al. Genetic variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erytrinae) in fluvial and lacustrine environments in the Upper Paraná river floodplain (Paraná State, Brazil). **Biochemical genetics**, New York, v. 40, p.209-223, 2002.
- POUEY, J. L. O. et. al. Principais componentes corporais do jundiá *Rhamdia* sp. cultivado na densidade de um peixe/m² e dividido em quatro faixas de peso. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, **Anais...** 134 p., 1999.
- PRIMMER, C. R.; MØLLER, A. P.; ELLEGREN, H. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 5, n. 3, p. 365-378, 1996.

- RAMELLA M. S. et al. Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 589-598, 2006.
- REVALDAVES E., RENESTO E E MACHADO MFPS. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Upper Paraná River. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, p.381-388, 1997.
- ROBINSON, L. P. Aloenzimas na genética de populações de planas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. p. 329-380.
- SANCHES, A.; GALETTI JR., P. M. Análise de RAPD em *Brycon microlepis* (Characidae): um estudo populacional e suas implicações na conservação da espécie. In: 48º Congresso Nacional de Genética, 2002, Águas de Lindóia. 48º Congresso Nacional de Genética – **Anais...**, 2002.
- SEKINO, M. et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, p. 163-172, 2004.
- SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.233, p. 163–172, 2004.
- SHAMA, S. **Identificação de bactérias patogênicas em cultivo semi-intensivo de Jundiá (*Rhamdia quelen*), Pisces, Pimelodidae**. Santa Maria – RS, 1997. 57p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, 1997.
- SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm: Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996. 156p. (PhD Thesis) - Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, 1996.
- SILVA, L. V. F. ; GOLOMBIESKI, J. I. ; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of silver catfish, *Rhamdia quelen*, (Heptapteridae) larvae at different calcium and magnesium concentrations. **Neotropical Ichthyology**, São Paulo, v. 3, n. 2, p. 299-304, 2005.
- SIROL, R.N.; BRITTO, S.G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M. G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Eds). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos: RiMA, p.275-284, 2006.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 10, p.407-417, 2001.
- SOFIA, S. H. et al. Population structure analysis of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 553, n. 1, p. 245-254, 2006.

- VIEIRA, V. L. P. et al. Alterações metabólicas e hematológicas em jundiá (*Rhamdia quelen*) alimentados contendo aflatoxinas. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 49-55, 2006.
- VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, London, v. 53(A), p. 394-412, 1998.
- WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**, The Hague, v. 474, p.131-137, 2002.
- WEBER, R. D.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 44, p. 388-396, 1989.
- WITHLER, R.; BEACHAM, T. D. Genetic consequences of the simultaneous or sequential addition of semen from multiple males during hatchery spawning of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Aquaculture**, Amsterdam, v. 126, n. 1-2, p. 11-23, 1994.
- WITLHER, R.E. Genetic consequences of fertilizing Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs with pooled milt. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 68, p. 15-25, 1988.
- WRIGHT, J.M., BENTZEN, P. Microsatellites genetic markers for the future. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 43, p. 384–388, 1994.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Maryland, v. 16, p. 97-159, 1931.
- ZANIBONI FILHO et al. **Catálogo ilustrado de peixes do alto rio Uruguai**. Florianópolis: Ed. da UFSC: Tractebel Energia, 2004. 128 p.: il.
- ZANIBONI FILHO, E.; SCHULZ, U. H. Migratory fishes of the Uruguay River, pp. 157-194. In: **Migratory fishes of South America: Biology, fisheries and conservation status**. CAROLSFELD, B. et al. (eds) The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Ottawa, Canada, 2003.

ANEXOS

	Machos						Fêmeas		
	M1	M2	M3	M4	M5	M6	F1	F2	F3
Peso (g)	570	795	800	705	850	510	467	463	344
Volume de sêmen (mL)	6,8	11,8	11	30	16	5,5	-	-	-
Peso de ovócitos (g)	-	-	-	-	-	-	41,4	16,1	39,4

Anexo 1. Peso dos reprodutores de *Rhamdia quelen* e quantidade de gametas produzidos.



Anexo 2. Exemplar adulto de *Rhamdia quelen*.



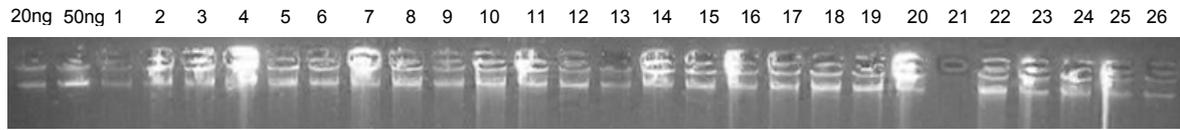
Anexo 3. Coleta de gametas masculinos de *R. quelen*.



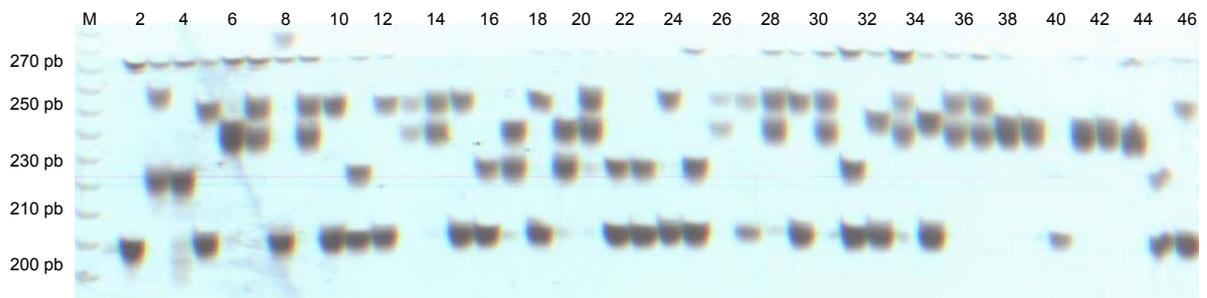
Anexo 4. Coleta de gametas femininos de *R. quelen*.



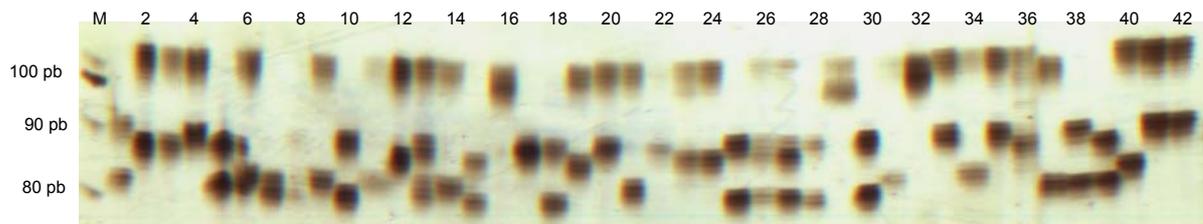
Anexo 5. Recipientes utilizados para incubação dos ovos e criação das larvas dos tratamentos e controle.



Anexo 6. Quantificação do DNA genômico realizado por comparação com quantidades conhecidas do DNA do fago λ (20 e 50 ng), de 26 indivíduos de *Rhamdia quelen* em gel de agarose 1%.



Anexo 7. Produtos da amplificação do loci microssatélite *RH 1* em 46 progênies de *Rhamdia quelen*. M - marcador λ 10 pb. Gel de acrilamida 2% corado com nitrato de prata.



Anexo 8. Produtos da amplificação do loci microssatélite *Pcor 1* em 42 progênies de *Rhamdia quelen*. M- marcador λ 10 pb. Gel de acrilamida 2% corado com nitrato de prata.