



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA  
INSTITUTO SOCIO-ECONOMICO E AMBIENTAL DE PESQUISA E  
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO  
MESTRADO EM AQUICULTURA E RECURSOS AQUÁTICOS TROPICAIS**

**LEANDRO DE ARAÚJO FERREIRA**

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTEIS DE MATRIZES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), NO ESTADO DO PARÁ,  
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

**BELÉM**

**2017**

LEANDRO DE ARAÚJO FERREIRA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTEIS DE MATRIZES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, Cuvier1818), NO ESTADO DO PARÁ,  
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais, da Universidade Federal Rural da Amazônia, como requisito necessário à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy.

**BELÉM**

**2017**

---

Ferreira, Leandro de Araújo

Análise da variabilidade genética em planteis de matrizes de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), no estado do Pará, utilizando marcadores microssatélites / Leandro de Araújo Ferreira. – Belém, 2017.

51 f.

Dissertação (Mestrado em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais) – Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém, 2017.

Orientador: Dr. Igor Guerreiro Hamoy.

1. Aquicultura 2. Variabilidade genética – Planteis 3. Cultivo de peixes - *Colossoma macropomum* 4. Cultivo de peixes – Tambaqui - Amazônia I. Hamoy, Igor Guerreiro, (orient.) II. Título

LEANDRO DE ARAÚJO FERREIRA

**ANÁLISE DA VARIABILIDADE GENÉTICA EM PLANTEIS DE MATRIZES DE  
TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), NO ESTADO DO PARÁ,  
UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais: área de concentração Aquicultura, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Igor Guerreiro Hamoy

Aprovado em 06 de julho de 2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Dr. Igor Guerreiro Hamoy– Orientador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

---

Dr. Carlos Alberto Machado da Rocha– 1º Examinador  
INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO CIÊNCIA E TECNOLOGIA DO PARÁ–IFPA

---

Dr. Raimundo Aderson Lobão de Sousa– 2º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA – UFRA

---

Dr. Nuno Filipe Alves Correa de Melo – 3º Examinador  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA - UFRA

## DEDICATÓRIA

A minha mãe, Francisca de Araújo Ferreira *in  
memoriam*, por todo amor me concedido e  
exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a vida e essa oportunidade de aprimoramento profissional.

Ao professor Dr. Igor Guerreiro Hamoy pela orientação, dedicação, pelos ensinamentos científicos e apoio na elaboração deste trabalho.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Recursos Tropicais (PPG-AqRAT) da Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, pelos conhecimentos transmitidos durante o mestrado.

À Universidade Federal Rural da Amazônia – UFRA, Belém-PA, por todo apoio na parte de processamento do material coletado em laboratório.

Ao Laboratório de Genética Humana e Médica – LGHM, da Universidade Federal do Pará.

Aos produtores rurais que me concederam oportunidade de extrair o material coletado em diferentes municípios no estado do Pará: Peixe-Boi, Santarém, Ulianópolis e Breu Branco.

Aos meus irmãos Reginaldo dos Santos Ferreira e Raimundo de Araújo Ferreira, pela confiança depositada e apoio irrestrito.

Aos professores Dr. Carlos Alberto da Rocha, Dr. Raimundo Aderson Lobão de Souza e o Dr. Glauber David Almeida Palheta, membros da Banca Examinadora, pela disponibilidade e contribuições neste trabalho.

À Kirla Korina, pelo apoio e companheirismo, mesmo que distante geograficamente.

Aos alunos de doutorado Paola Fabiana Fazzi Gomes e mestrado Sávio Lucas de Matos Guerreiro, pela ajuda de campo e laboratório.

Aos colegas da turma de mestrado, com os quais convivi ao longo de dois anos e tive diversas experiências que colaboraram para o meu amadurecimento.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram com a minha dissertação e profissionalismo até o momento, **MUITO OBRIGADO.**

## RESUMO

O cultivo de peixes na região Norte do Brasil vem apresentado um desenvolvimento significativo. A espécie *Colossoma macropomum* é a espécie amazônica mais cultivada na região. O *C. macropomum* vem sendo objeto de estudo para programas de melhoramento genético no Brasil devido possuir um pacote tecnológico de reprodução fechado. Uma das principais preocupações em criações em cativeiro é a determinação da variabilidade genética dos planteis, a qual fornece a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais e antrópicas, principalmente, em sistemas de cultivo. A determinação da variabilidade genética é importante uma vez que pode mostrar a relação genética entre indivíduos, populações e até mesmo entre espécies diferentes. Logo, o trabalho tem como objetivo avaliar o nível de variabilidade de planteis de matrizes cultivadas de tambaqui em diferentes municípios do estado do Pará, utilizando marcadores moleculares do tipo microssatélites. No trabalho foram analisadas 110 matrizes de tambaqui *C. macropomum* provenientes de quatro pisciculturas, as quais estão localizadas nos seguintes municípios: Peixe-boi, Santarém, Breu Branco e Ulianópolis. Para genotipagem foi utilizado um painel multiplex de microssatélites tri e tetra nucleotídeos. Foram calculados índices de diversidade genética, como: heterozigosidade, número de alelos por *locus*, e riqueza alélica, além de diferenciação populacional, teste de atribuição de assinatura genética e  $F_{ST}$ . Os resultados mostraram que as matrizes de tambaqui dos quatro planteis analisados apresentam perda significativa de variabilidade genética em relação à população natural, além de, estruturam-se geneticamente em dois estoques distintos.

**Palavras-Chave:** Aquicultura, diversidade genética, cultivo, reprodutores, Amazônia.

## ABSTRACT

The cultivation of fish in the northern region of Brazil has presented a significant development. The species *Colossoma macropomum* is the more cultivated Amazonian species in the region. *C. macropomum* has been studied for breeding programs in Brazil because it has a closed breeding technology package. One of the major concerns in captive breeding is the genetic determination of the resources variability, qualification of a force that gives the ability to withstand environmental and anthropogenic pressures, especially in farming systems. The determination of genetic variability is important as it can show the genetic relationship between individuals, populations and even between different species. Therefore, the objective of this work is to evaluate the variability of broodstocks of cultivated matrices in different municipalities of Pará state, using molecular markers of microsatellite type. In the work, 110 matrices of *C. macropomum* tambaqui were born from four fish farms were analyzed, located in the following municipalities: Peixe-Boi, Santarém, Breu Branco and Ulianópolis. A multiplex panel of tri and tetra nucleotide microsatellites were used for genotyping. Indices of genetic diversity, heterozygosity, number of alleles per locus, and allelic richness, as well as the differentiation population and  $F_{ST}$  were calculated. The results showed the tambaqui matrices from the four analyzed broodstocks show a significant loss of genetic variability in relation to the natural population, besides being genetically structured in two different stocks.

**Key words:** Aquaculture, genetic diversity, cultivation, breeding, Amazon.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Exemplar de tambaqui ( <i>Colossoma macropomum</i> ).....	14
Figura 2 - Localização geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletadas de material biológico de reprodutores de tambaqui.....	20
Figura 3 - Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno Et al. (2005), o maior valor de $\Delta K$ corresponde ao K ótimo.....	33
Figura 4 - Barplot originado no programa Structure, mostrando a clusterização de duas populações de matrizes.....	33
Figura 5 – Box plot da heterozigosidade esperada (HE) entre os planteis investigados no presente trabalho e os dados da literatura que utilizaram os mesmos marcadores deste estudo, em populações naturais.....	35
Figura 6 – Box plot do número de alelos por locus ( $N_A$ ) entre os planteis investigados no presente trabalho e os dados da literatura que utilizaram os mesmos marcadores deste estudo, em populações naturais.....	37
Figura 7 – Box plot da riqueza alélica (AR) entre os planteis investigados no presente trabalho e os dados da literatura que utilizaram os mesmos marcadores deste estudo, em populações naturais.....	38

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Classificação dos microssatélites quanto ao número de nucleotídeos da sequência de repetição.....	16
Tabela 2 - Indicação do número de indivíduos coletados por município, e região de origem..	20
Tabela 3 - Paineis multiplex desenvolvidos por Hamoy <i>et al.</i> (2012): F; <i>primer forward</i> ; <i>primer revers</i> .....	21
Tabela 4 - Termociclagem utilizada na PCR. ....	22
Tabela 5 - Índices de diversidade genética da população de Santarém (n=30).....	25
Tabela 6 - Índices de diversidade genética da população de Peixe-boia (n=20).....	25
Tabela 7 - Índices de diversidade genética da população de Breu Branco (n=21).....	26
Tabela 8 - Índices de diversidade genética do plantel de Ulianópolis (n=39).....	26
Tabela 9 - Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 01, das populações do presente trabalho.....	27
Tabela 10 - Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 03, das populações do presente trabalho.....	27
Tabela 11- Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 04, das populações do presente trabalho.....	28
Tabela 12- Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 05, das populações do presente trabalho.....	28
Tabela 13 - Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 07, das populações do presente trabalho.....	29

Tabela 14 - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ08, das populações do presente trabalho.....	29
Tabela 15 - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ09, das populações do presente trabalho.....	30
Tabela 16 - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ10, das populações do presente trabalho.....	30
Tabela 17 - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ12, das populações do presente trabalho.....	31
Tabela 18 - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ13, das populações do presente trabalho.....	31
Tabela 19 - Resultados observados no programa Arlequin 3.5.1.3 para a medida de FST, segundo Wright (1978).....	32

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	13
<b>2.1 A espécie – <i>Colossoma macropomum</i></b> .....	13
<b>2.2 Biologia da espécie</b> .....	13
<b>2.3 Marcadores moleculares aplicados à piscicultura</b> .....	15
<b>2.4 Estudos genéticos com tambaqui – <i>Colossoma macropomum</i></b> .....	16
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	17
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	18
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	18
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	18
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
<b>4.1 Aspectos éticos</b> .....	19
<b>4.2 Área de estudo</b> .....	19
<b>4.3 Coleta das amostras</b> .....	20
<b>4.4 Extração e mensuração do dna genômico</b> .....	21
<b>4.5 Genotipagem</b> .....	21
<b>4.6 Análises estatísticas</b> .....	22
<b>5 RESULTADOS</b> .....	24
<b>5. 1 Diversidade genética</b> .....	24
<b>5. 2 Estrutura genética</b> .....	32
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	34
<b>6.1 Diversidade genética</b> .....	34
<b>6.2 Estrutura populacional</b> .....	30
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	41
<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	42

## 1 INTRODUÇÃO

O cultivo de peixes é considerado uma das atividades agropecuárias que mais cresce no Brasil. Sendo que, a criação de espécies nativas vem crescendo nos últimos anos. O tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) é a espécie nativa mais cultivada no Brasil, com uma produção de 135,86 mil toneladas em 2015 (IBGE, 2015). Além do mais, é a espécie mais criada no Norte do país – tem se expandido nas regiões Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (BRASIL, 2012).

O tambaqui é o segundo maior peixe de escamas da Amazônia, atingindo mais de 1 m de comprimento e 30 kg no ambiente nativo (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998). Grande parte do aumento da produção desta espécie é pela facilidade de adaptação a alimentação artificial, rusticidade e resistência aos sistemas de cultivos, boa conversão alimentar e ótimo ganho de peso, sendo sua carne muito apreciada e com alto valor nutritivo (GOMES et al. 2010; LOPERA-BARRERO et al. 2011). Esse compõe o grupo de peixes chamados de redondos, que juntamente com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) representam a base da produção de peixes nativos na piscicultura nacional, tanto como animais puros e especialmente na produção de híbridos entre tambaqui e pacu (tambacu) e tambaqui e pirapitinga (tambatinga) (BALDISSEROTTO; GOMES, 2010).

Por ser uma espécie reofílica e não se reproduzir espontaneamente em tanques, a utilização de hormônios para a sua reprodução é necessária (JACOMETO et al, 2010). Seu cultivo foi disseminado pelo Brasil, apesar de temperaturas abaixo de 20°C serem limitantes ao seu crescimento e bem-estar (ZANIBONI FILHO; MEURER, 1997). No estado do Pará a piscicultura ainda apresenta uma produção moderada em relação à sua privilegiada condição hídrica e climática, apesar disso é o estado da região Norte que apresenta o maior número de empreendimentos comerciais (BRASIL, 2013, LEE & SAPERDONTI, 2008).

O processo de domesticação de uma espécie leva à perda natural de variabilidade genética. Na piscicultura brasileira, além da perda natural devido a este processo, há também uma tendência dos plantéis serem formados em sua maioria por um pequeno número de reprodutores e com alto grau de parentesco (HASHIMOTO et al., 2012).

A determinação do grau de variabilidade nos estoques de reprodutores é de grande importância para iniciar um programa de melhoramento (LOPES et al., 2009), pois o potencial evolutivo e de melhoramento depende da variabilidade genética (MELO et al., 2006). Desse modo, a correta identificação de estoques pode servir como ferramenta para o estabelecimento de bases de seleção, em programas de melhoramento. Este aspecto pode ser

utilizado para aumentar a variabilidade genética e explorar positivamente os cruzamentos (MATHER, 2001, JACOMETO et al., 2010).

O conhecimento sobre os níveis de variabilidade genética em pisciculturas de tambaqui ainda é pouco pesquisado, utilizando marcadores moleculares confiáveis. E considerando a importância econômica dessa espécie para a região Norte, considera-se evidente a necessidade de estudos com plantéis de reprodutores de tambaqui como forma de avaliar seus níveis de variabilidade genética.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A espécie – *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818)**

Taxonomicamente, o tambaqui pertence à classe Actinopterygii, ordem Characiformes, família Characidae e subfamília Serrasalminae. Foi descrito por George Cuvier em 1818, e apresenta a seguinte classificação taxinômica:

**Reino:** Animal

**Filo:** Chordata

**Classe:** Actinopterygii

**Ordem:** Characiformes

**Família:** Characidae

**Subfamília:** Serrasalminae

**Gênero:** *Colossoma*

**Espécie:** *Colossoma macropomum*

### **2.2 Biologia da espécie**

O tambaqui tem ocorrência natural nas bacias do rio Amazonas e do Orinoco. No rio Amazonas é comumente encontrado na foz do rio Xingu, no estado do Pará até o médio rio Ucayali, no Peru (GOMES et al., 2010).

A espécie possui o corpo romboidal, com cor parda na metade superior e preta na metade inferior, escamas, nadadeira adiposa curta, dentes molariformes com margens afiadas para triturar (ROTTA, 2003), rastros branquiais longos e em grande número (NETO; PRADO, 2009), lábios grossos e boca prognata. O tambaqui pode atingir um metro de comprimento padrão e pesar trinta quilos, é o segundo maior peixe de escamas da América do Sul (SANTOS et al., 2006).

**Figura 1** – Exemplar adulto do tambaqui (*C.macropomum*).



**Fonte:** Embrapa Pesca e Aquicultura (<http://www.embrapa.br>).

Reprodutivamente o tambaqui possui fecundação externa e o período de desova é sincronizado com o período chuvoso. As fêmeas atingem a maturidade sexual com o comprimento médio de 60,59 cm (GOULDING; CARVALHO, 1982; VILLACORTA-CORREA; SAINT PAUL, 1999; VIEIRA et al, 1999). No geral, o seu habitat é caracterizado por águas ricas em nutrientes, como as várzeas amazônicas, com temperaturas médias entre 25 e 34 °C.

Na natureza, a desova ocorre no início da enchente, próximo às margens do rio e, eventualmente, na direção das florestas inundáveis do rio Amazonas e seus tributários (ARÁUJO-LIMA; GOULDING, 1997).

A alimentação natural da larva de tambaqui consiste de zooplâncton, particularmente cladóceros e copépodes, predando organismos maiores que 0,4 mm de largura, inicialmente, mas mudando rapidamente para invertebrados maiores, como quironomídeos, com um semana de vida ou, aproximadamente, 9 mm de comprimento (ARÁUJO-LIMA; GOULDING, 1997). Juvenis de tambaqui continuam a preda intensamente invertebrados, mas sua dieta passa a incorporar sementes pequenas, como de arroz silvestre e pequenas frutas. As sementes são mais abundantes na dieta durante a enchente, quando as plantas frutificam (GOMES, et al., 2010).

Os adultos têm uma dieta que consiste, principalmente, de sementes e frutas. Entre as principais sementes ingeridas estão a seringa barriguda (*Heveas pruceana*), o jauarí

(*Astrocaryum jauari*), e o capitari (*Tabebuia barbata*). Alimentam-se principalmente durante a enchente e a cheia, e migram no rio durante a vazante e a seca. Neste último período, existe uma escassez de frutas e plâncton no rio, e o tambaqui raramente se alimenta, ingerindo, ocasionalmente, folhas e animais (GOMES, et al., 2010).

### 2.3 Marcadores moleculares aplicados na piscicultura

Na piscicultura de acordo com Jackson et al. (2003a), um dos principais problemas encontrados é o reduzido número de programas de manejo implementados com o objetivo de selecionar geneticamente matrizes selvagens.

É consenso que apenas um pequeno número de espécies de peixes explorados pela piscicultura comercial são essencialmente selvagens (GJEDREM, 2000). E este fato pode levar a perda de variabilidade genética o que torna as populações cultivadas mais susceptíveis a doenças. O conhecimento das diferenças genéticas entre populações proporciona um manejo organizado que minimiza os efeitos do endocruzamento, podendo levar a maiores ganhos na piscicultura (JACKSON et al., 2003b).

Vários marcadores moleculares têm sido utilizados para estudar a variabilidade genética em populações cultivadas de peixes. Dentre esses, os microssatélites são os marcadores com maior precisão para responder questões como endogamia e perda da diversidade genética (NAVARRO et al., 2008).

Outra abordagem muito empregada com os microssatélites é a análise de parentesco, que revela informações relevantes para o manejo e conservação de espécies cultivadas (JONES et al., 2010).

Os marcadores microssatélites, também conhecidos como *short tandem repeats* (STR) ou *simple sequence repeats* (SSR), são marcadores nucleares altamente polimórficos, formados por séries de sequências curtas de DNA repetidas *in tandem* (em fila). Estas sequências curtas compõem o *locus* do microssatélite e podem ser constituídas de um até seis nucleotídeos, sendo nomeadas de acordo com o número de nucleotídeos que as compõem, como mono, di, tri, tetra, penta e hexanucleotídeos, respectivamente (KELKAR et al., 2010).



**Tabela 1** – Classificação dos microssatélites quanto ao número de nucleotídeos da sequência de repetição.

---

<b>TATGCCTATGCCTATGCCTATGCCTATGCC</b> -Hexanucleotídeo (TATGCC)5
<b>TATGCTATGCTATGCTATGCTATGCTATGC</b> - Pentanucleotídeo (TATGC)6
<b>TATGTATGTATGTATGTATGTATGTATGTATG</b> - Tetranucleotídeo (TATG)8
<b>TATTATTATTATTATTATTATTATTATTAT</b> - Trinucleotídeo (TAT)11
<b>TATATATATATATATATATATATATATATA</b> - Dinucleotídeo (TA)15

---

O processo de genotipagem de microssatélites dinucleotídeos apresenta frequentemente artefatos de PCR, chamados de *stutters*, que dificultam a diferenciação entre heterozigotos e homozigotos levando a genótipos errados, gerando dados não confiáveis sobre a real diversidade genética de uma espécie. De modo diferente, os marcadores microssatélites do tipo tri e tetranucleotídeos apresentam poucos *stutters*, tornando sua genotipagem mais confiável (TAYLOR et al., 1994; WALSH ET al., 1996; FISHBACK et al., 1999; CLARKE et al., 2001; OLSEN et al., 2002; VAN OOSTERHOUT ET al., 2004, LI et al., 2007; PENG et al., 2011).

## 2.4 Estudos genéticos com tambaqui

Em relação aos trabalhos genéticos envolvendo o tambaqui nativo da bacia amazônica, com exceção de Calcagnotto (1998), utilizando fragmentos do DNA mitocondrial (DNAMt), indicando haver baixa variabilidade genética, todos os outros estudos posteriores a este indicam grande diversidade genética (SANTOS, 2010; HAMOY, 2011; SANTOS et al., 2009; HAMOY et al., 2011, HAMOY E SANTOS, 2012; SANTANA et al., 2012; e ALDEA-GUEVARA et al., 2013; AGOSTINI et al., 2013, SANTOS, 2016; FAZZI-GOMES et al 2017).

Outros estudos genéticos também foram realizados com o tambaqui que apresenta um número diplóide de cromossomos  $2n = 54$  (OLIVEIRA et al., 1988; NIRCHIO et al., 2003). Estes analisaram os níveis de variabilidade genética presente em cinco estações de piscicultura de tambaqui, utilizando o marcador bioquímico transferrina. Os resultados demonstraram baixos níveis de variabilidade genética nos estoques cultivados (CALCAGNOTTO; TOLEDO-FILHO, 2010).

Também, foi analisada a diversidade genética em dois estoques de reprodutores de tambaqui utilizados na piscicultura do Estado de Rondônia, utilizando marcadores RAPD,

encontrando elevada variabilidade genética e uma baixa diferenciação genética entre os estoques (LOPES et al, 2009).

Hamoy et al. (2011) isolaram marcadores microssatélites do tipo tri e tetra nucleotídeos para o tambaqui, estes marcadores foram utilizados na elaboração de um sistema de genotipagem multiplex desenvolvido por Hamoy et al. (2012), que apresenta parâmetros genéticos forenses com elevada força estatística.

Esse sistema de genotipagem é pioneiro em espécies amazônicas e pode ser empregado de forma confiável para o diagnóstico dos níveis de diversidade genética em populações cultivadas de tambaqui, e permitir a realização de análise de parentesco entre matrizes produtoras de alevinos, evitando o cruzamento de peixes geneticamente relacionados, além de representar uma grande economia de material e de tempo.

## 5 JUSTIFICATIVA

O tambaqui é a espécie nativa mais cultivada no Brasil, seu cultivo é considerado uma fonte alternativa à exploração dos estoques selvagens (SANTOS et al., 2013). Devido à sua importância econômica regional e nacional, este foi incluído no programa brasileiro de melhoramento genético (LOPES et al., 2009).

Apesar do crescente avanço, a realidade da maioria dos centros de alevinagem da espécie é a ausência de registros de avaliação zootécnica dos plantéis comerciais e manejo genético. Como consequência não existe uma base de dados que permita identificar diferenças regionais de desempenho produtivo nos plantéis de tambaqui, e se há diferenças significativas de características zootécnicas relevantes para o setor produtivo (RESENDE, 2007). Outra questão observada nas estações de alevinagem é o baixo número de reprodutores utilizados no processo de produção (Santos et al., 2016), com grandes chances de acasalamento entre indivíduos consanguíneos.

Os efeitos da consanguinidade em peixes com domesticação recente, têm sido mundialmente investigados, demonstrando declínios de desempenho produtivo e perda de variabilidade genética, com acúmulos dos efeitos negativos a cada geração quanto maior o grau de parentesco genético, (TAVE et al., 1995; LUO et al., 2014, VARELA, 2015).

O conhecimento da variabilidade genética é a base para qualquer programa de melhoramento genético, e sua diminuição promove a perda do potencial da espécie a ser melhorada (MOREIRA et al., 2007). Além disso, o conhecimento dessa variabilidade permite,

juntamente com a determinação de diferenças genéticas entre populações, um manejo genético organizado, minimizando os efeitos do endocruzamento, levando a uma melhor produtividade (JACKSON et al., 2003). Devido a sua importância econômica para a região amazônica e em virtude dos problemas atuais relatados, é evidente a necessidade de estudos genéticos de plantéis reprodutores de tambaqui, como forma de avaliar os níveis de variabilidade genética, gerando informações para futuros programas de melhoramento genético nas pisciculturas de tambaqui do estado do Pará.

## **4 OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

O Objetivo geral deste estudo é avaliar o nível de variabilidade genética e estrutura populacional de reprodutores de tambaqui de quatro pisciculturas do estado do Pará (Amazônia Oriental), gerando informações fundamentais para implantação de programas de melhoramento genético no estado.

### **4.2 Objetivos específicos**

- ✓ Avaliar o nível de variabilidade genética dos reprodutores de tambaqui de pisciculturas localizadas nos municípios de: Santarém, Peixe-boi, Breu Branco e Ulianópolis.
  
- ✓ Verificar a estruturação genética dos planteis reprodutores de tambaqui entre as pisciculturas localizadas nos municípios de: Santarém, Peixe-boi, Breu Branco e Ulianópolis.

## **5 MATERIAL E MÉTODOS**

### **5.1 Aspectos éticos**

Para a realização deste estudo o projeto foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais- CEUA, da Universidade Federal Rural da Amazônia- UFRA, com parecer favorável para a sua execução, número de protocolo 031/2013 (CEUA) – 23084.008077/2013-73.

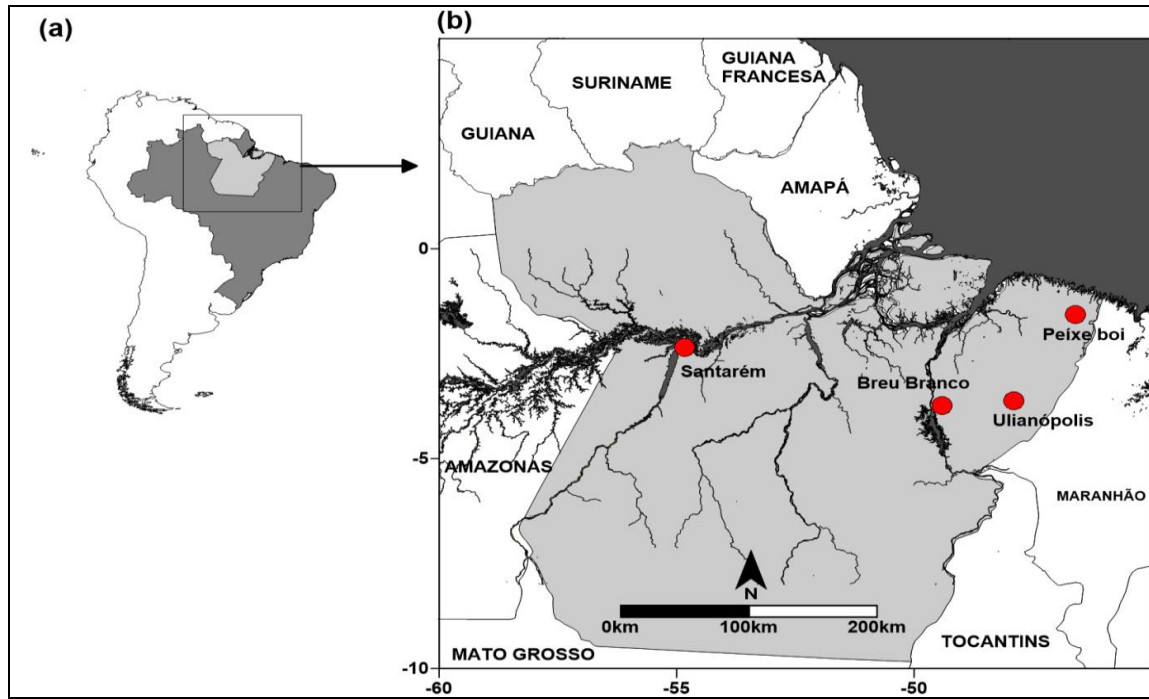
### **5.2 Área de estudo**

O Estado do Pará é uma das 27 unidades federativas do Brasil, sendo a segunda maior em extensão territorial com 1.248.042,515 km<sup>2</sup>. Situa-se no centro da região Norte (01°27'21''S 48°30'16''W) e apresenta 144 municípios, tendo como limites a República do Suriname e o Amapá ao Norte, o Oceano Atlântico a Nordeste, o Maranhão a Leste, o Tocantins a Sudeste, o Mato Grosso ao Sul, o Amazonas a Oeste e Roraima e a República Cooperativa da Guiana a Noroeste (PARÁ, 2010).

O Estado do Pará está dividido em seis mesorregiões: Metropolitana, Nordeste, Marajó, Sudeste, Sudoeste e Baixo Amazonas. Apresenta uma população estimada em 8.073.924 habitantes e possui a agropecuária, os extrativismos mineral e vegetal, a indústria e o turismo como a base da economia. Dentre suas características naturais, merece destaque a extensa rede hidrográfica, constituída por cursos d'água das bacias Amazônica, Araguaia-Tocantins e Atlântico Nordeste Ocidental, além de 562 km de litoral, que propiciam a prática de diversas modalidades de pesca e de aquicultura ( BRABO, 2014).

As coletas foram realizadas em quatro estações de pisciculturas de diferentes municípios do Estado do Pará, sendo eles: Santarém (Baixo amazonas), Peixe-Boi (Nordeste paraense), Breu-Branco (Sudeste paraense) e Ulianópolis (Sudeste paraense) (Tabela 2).

**Figura 2** – Localização geográfica dos municípios onde foram realizadas as coletadas de material biológico de reprodutores de tambaqui. a) Continente sul-americano, Brasil e o estado do Pará; b) O estado do Pará e os municípios de coleta de material.



### 5.3 Coleta das amostras

Foram coletadas amostras, da nadadeira caudal, de 110 reprodutores de tambaqui (tabela 2), preservadas em etanol 95% e posteriormente armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

**Tabela 2.** Indicação do número de indivíduos coletados por município, e região de origem.

Município – Abreviatura	Mesorregião Aquícola	Número de estações Aquícolas	Número de amostras
Santarém – SA	Baixo Amazonas	1	30
Peixe boi – PB	Nordeste paraense	1	20
Breu Branco – BB	Sudeste paraense	1	21
Ulianópolis – Ul	Sudeste paraense	1	39
Total		4	110

## 5.4 Extração e mensuração do DNA genômico

A extração do DNA foi realizada com o kit “*Genomic DNA Isolation Kit*”, da Norgen Biotek Corporation.

A concentração do DNA das amostras foi calculada pelo índice de absorvância (A) das bases a 260 nm em espectrofotômetro NanoDrop™ ND-1000 (Thermo Scientific). Após quantificação estas foram padronizadas para uma concentração de 5 ng/μl.

## 5.5 Genotipagem

As amostras foram genotipadas utilizando o sistema de genotipagem multiplex com 10 marcadores microssatélites desenvolvido por Hamoy e Santos (2012) (tabela 3).

**Tabela 3** –Painel multiplex desenvolvido por Hamoy *et al.* (2012): F; *primer forward* ;*primer reverse*.

	<b>Locus (GenBank)</b>	<b>Primer (5'→3')</b>	<b>Fluorocromo</b>	<b>mix de primers<sup>#</sup></b>
I	Cmacrμ01 (HM579948)	F: *CAGTTCACCCACTCAGCCTT R: AAAACCTGTAGAAGAGCACATGAA	6-FAM	0,2
	Cmacrμ03 (HM579950)	F: *GCATCAAATAGGCACGAGTTCT R: GCTCTCAGCAACACATTACTGG		1,0
	Cmacrμ04 (HM579951)	F: *CCTTTCTATGTTCTCATCCCAA R: GCTTTGTGCGAAGGTTTCA		1,0
	Cmacrμ05 (HM579952)	F: *TCTCTACAGGCCGAACCAAT R: CGCGTCGTTCTTCTCAAAT	HEX	0,2
	Cmacrμ07 (HM579954)	F: *TGCTCACACAGAGAGAAGTGAAG R: GAGTACGGAGGCTGATGAAGAG		0,2
	Cmacrμ08 (HM579955)	F: *ATGTATTGGTGATAGTGATGGGTG R: CGGGTAACACACACAAACCTT		1,25
	Cmacrμ09 (HM579956)	F: *CTGGGATAGGCTCCAGCA R: TGGCACTCCAGCAAACCTG	NED	0,5
	Cmacrμ10 (HM579957)	F: *TAGTTAATCGGTCCAGGTGAGG R: GTTGGCTACTTGGTTATAGAAAATGTT		1,25
	Cmacrμ12 (HM579959)	F: *CTGTGCGTGTGACGTTAATATGT R: TTCTCTGCTCTCCTGACTGCTAC	PET	0,3
	Cmacrμ13 (HM579960)	F: *TTTTAGGCCAGTGATTGTAGTC R: CTGCTGCTTACTATGGGTGAAAG		0,25

Fonte: HAMOY & SANTOS (2012).

As PCRs foram realizadas no termociclador Applied Biosystems Simple Amp™, com a seguinte ciclagem (Tabela 4).

**Tabela 4** - Termociclagem utilizada na PCR.

Nº de Ciclos	Temperatura (°C)	Tempo (Minutos)
1	95°C	15 min
30	94° C	1 min
30	60° C	1/2 min
30	72° C	1 min
1	72° C	30 min
1	4° C	∞

Os produtos das PCRs foram misturados a 8.5 µL de formamida Hi-Di deionizada (Applied Biosystems) e a 0,5 µL de Gene Scan 500 LIZ (Applied Biosystems) e separados no sequenciador automático de capilar Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer. As análises foram realizadas no programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

## 5.6 Análises estatísticas

As frequências alélicas de cada marcador nas diferentes matrizes foram calculadas com o programa Fstat 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). A heterozigosidade observada ( $H_O$ ) e esperada ( $H_E$ ) e seus possíveis desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Posteriormente, foi empregada a correção de Bonferroni (RICE, 1998) nos p-valores encontrados (p-valor Ajustado < 0,005).

Os valores de  $H_E$ , foram testados pelo teste não paramétrico de Wilcoxon no programa BioStat 5.0 (AYRES et al. 2007) para verificar se há diferenças significativas entre os valores encontrado neste estudo e os valores descritos por Fazzi-Gomes (2017), para os mesmos marcadores, em populações naturais, caracterizando assim a redução ou não, de variabilidade genética.

O número de alelos por locus ( $N_a$ ), a frequência alélica e a riqueza alélica ( $A_R$ ) foram estimados utilizando o programa Fstat versão 2.9.3.2 (GOUDET, 2002). Também foram

realizados os gráficos Boxplots com os resultados do trabalho utilizando o programa Past 2.16 (HAMMER *et al.* 2001).

A diferenciação genética interpopulacional foi verificada com o  $F_{ST}$  (distância genética adequada ao modelo mutacional IAM) (WEIR; COCKERHAM, 1984) executado no programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). A magnitude da diferenciação entre as populações foi determinada segundo a definição de Wright (1978), caracterizando como pequena valores de 0 a 0,05, moderada valores de 0,05 a 0,15, grande valores de 0,15 a 0,25 e extensa para valores acima de 0,25.

Foi utilizado o programa Structure 2.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000) que utiliza análise bayesiana para inferir o número de populações geneticamente homogêneas (K) com maior probabilidade (média de Lnprob) de ocorrer no banco de dados analisado. Essa análise atribui genótipos individuais para um determinado número de agrupamentos levando a um equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação em função das frequências alélicas dentro de cada agrupamento. O número real de K (com maior probabilidade de explicar o banco de dados) é obtido após execução da Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC) com múltiplas simulações entre os clusters atribuídos pelo programa e a variação de K inserida.

Nesta análise utilizou-se  $10^6$  simulações, com variação de K de 1 a 4 para averiguação de qual K tem maior probabilidade de explicar o banco de dados analisado, com 100 replicações para cada K utilizado. O período de aquecimento da cadeia (burn-in), foi de 20.000 simulações. No programa Structure Harvester 0.6.93 (EARL & VON HOLD, 2011) foi determinado a média dos valores da verossimilhança de cada K para todas as corridas utilizando a estatística  $\Delta K$  desenvolvida por Evanno *et al.* (2005) a qual fornece uma estimativa do número de subpopulações existentes.



## 6 RESULTADOS

### 6.1 Diversidade genética

As tabelas de 5 a 8 apresentam estimativas de variabilidade genética que são a heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), o número de alelos por locus ( $N_A$ ), a riqueza alélica ( $A_R$ ) nos diferentes planteis analisados.

O plantel de Santarém (Tabela 5) apresentou uma variação de 0,625 ( $C_{\mu 01}$ ) a 0,875 ( $C_{\mu 12}$ ) quando relaciona à variável heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), quando se trata de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) observamos uma variação de 0,533 ( $C_{\mu 08}$ ) a 0,900 ( $C_{\mu 04}$ ). O número de alelos por locus ( $N_A$ ) variou de 5 ( $C_{\mu 01}$ ) a 12 ( $C_{\mu 07}$  e  $C_{\mu 12}$ ). As estimativas da riqueza alélica ( $A_R$ ) variam de 4,569 ( $C_{\mu 01}$ ) a 11,167 ( $C_{\mu 12}$ ).

As análises correspondentes ao plantel de Peixe-boi (Tabela 6) foram observadas uma variação de 0,452 ( $C_{\mu 01}$ ) a 0,802 ( $C_{\mu 07}$ ) quando relaciona à variável heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), no entanto, quando se trata de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) observamos uma variação de 0,300 ( $C_{\mu 12}$ ) a 0,800 ( $C_{\mu 04}$ ). O número de alelos por locus ( $N_A$ ) variou de 3 ( $C_{\mu 03}$ ) a 9 ( $C_{\mu 07}$ ). As estimativas da riqueza alélica ( $A_R$ ) variam de 4,559 ( $C_{\mu 01}$ ) a 10,522 ( $C_{\mu 12}$ ).

O plantel de Breu Branco (Tabela 7) apresentou uma variação de 0,371 ( $C_{\mu 01}$ ) a 0,752 ( $C_{\mu 10}$ ) quando relaciona à variável heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), quando se trata de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) observamos uma variação de 0,380 ( $C_{\mu 01}$ ) a 0,904 ( $C_{\mu 03}$  e no  $C_{\mu 09}$ ). O número de alelos por locus ( $N_A$ ) variou de 2 ( $C_{\mu 01}$ ) a 9 ( $C_{\mu 07}$ ). As estimativas da riqueza alélica ( $A_R$ ) variam de 2 ( $C_{\mu 01}$ ) a 8,714 ( $C_{\mu 07}$ ).

E o plantel de Ulianópolis (Tabela 8) apresentou uma variação de 0,463 ( $C_{\mu 01}$ ) a 0,744 ( $C_{\mu 05}$ ) quando relaciona à variável heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), quando se trata de heterozigosidade observada ( $H_O$ ) observamos uma variação de 0,410 ( $C_{\mu 13}$ ) a 0,794 ( $C_{\mu 04}$ ). O número de alelos por locus ( $N_A$ ) variou de 5 ( $C_{\mu 01}$ ) a 19 ( $C_{\mu 07}$ ). As estimativas da riqueza alélica ( $A_R$ ) variam de 2,513 ( $C_{\mu 13}$ ) a 6,629 ( $C_{\mu 07}$ ).

**Tabela 5-** Índices de diversidade genética do plantel de Santarém(n=30).

<b>Loci</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Na</b>	<b>Ar</b>
Cmacrμ01	0,566	0,625	5	4,569
Cmacrμ03	0,700	0,697	6	6,189
Cmacrμ04	0,900	0,850	10	7,944
Cmacrμ05	0,666	0,803	7	6,357
Cmacrμ07	0,833	0,846	12	10,929
Cmacrμ08	0,533*	0,786*	9	6,876
Cmacrμ09	0,800	0,754	9	6,693
Cmacrμ10	0,833	0,762	7	5,988
Cmacrμ12	0,600*	0,875*	12	11,167
Cmacrμ13	0,766	0,723	7	7,658
<b>Média</b>	<b>0,720</b>	<b>0,772</b>	<b>8,4</b>	<b>7,437</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,700</b>	<b>0,786</b>	<b>9,000</b>	<b>6,693</b>

\* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

H<sub>O</sub>= Heterozigosidade observada, H<sub>E</sub>= Heterozigosidade esperada, N<sub>A</sub>= Número de alelos por locus e A<sub>R</sub>= Riqueza alélica.

**Tabela 6-** Índices de diversidade genética do plantel de Peixe-boi(n=20).

<b>Loci</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Na</b>	<b>Ar</b>
Cmacrμ01	0,400	0,452	4	4,559
Cmacrμ03	0,550	0,626	3	5,663
Cmacrμ04	0,800	0,796	6	8,933
Cmacrμ05	0,650	0,653	4	6,849
Cmacrμ07	0,750	0,802	9	10,279
Cmacrμ08	0,750	0,688	5	7,657
Cmacrμ09	0,650	0,573	4	7,849
Cmacrμ10	0,750	0,719	5	6,297
Cmacrμ12	0,300*	0,765*	7	10,522
Cmacrμ13	0,700	0,658	6	6,63
<b>Média</b>	<b>0,630</b>	<b>0,673</b>	<b>5,3</b>	<b>7,524</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,650</b>	<b>0,653</b>	<b>4,000</b>	<b>7,657</b>

\* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

H<sub>O</sub>= Heterozigosidade observada, H<sub>E</sub>= Heterozigosidade esperada, N<sub>A</sub>= Número de alelos por locus e A<sub>R</sub>= Riqueza alélica.

**Tabela 7** - Índices de diversidade genética do plantel de Breu Branco (n=21).

<b>Loci</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Na</b>	<b>Ar</b>
Cmacrμ01	0,380	0,371	2	2
Cmacrμ03	0,904	0,715	6	5,952
Cmacrμ04	0,619	0,591	5	4,951
Cmacrμ05	0,857	0,609	4	3,952
Cmacrμ07	0,904	0,699	9	8,714
Cmacrμ08	0,666*	0,470*	3	2,952
Cmacrμ09	0,904	0,659	7	6,855
Cmacrμ10	0,761	0,752	4	4
Cmacrμ12	0,476*	0,684*	5	4,951
Cmacrμ13	0,571	0,47	5	4,905
<b>Média</b>	<b>0,704</b>	<b>0,602</b>	<b>5</b>	<b>4,923</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,857</b>	<b>0,609</b>	<b>4,500</b>	<b>4,951</b>

\* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

H<sub>O</sub>= Heterozigidade observada, H<sub>E</sub>= Heterozigidade esperada, N<sub>A</sub>= Número de alelos por locus e A<sub>R</sub>= Riqueza alélica.

**Tabela 8** - Índices de diversidade genética do plantel de Ulianópolis (n=39).

<b>Loci</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>	<b>Na</b>	<b>Ar</b>
Cmacrμ01	0,589	0,463	5	2,999
Cmacrμ03	0,512	0,485	10	5,255
Cmacrμ04	0,794	0,703	10	4,766
Cmacrμ05	0,589	0,744	8	4
Cmacrμ07	0,615	0,731	19	6,629
Cmacrμ08	0,487*	0,644*	10	3,947
Cmacrμ09	0,717	0,664	11	5,226
Cmacrμ10	0,512	0,469	8	3,924
Cmacrμ12	0,461*	0,729*	14	6,533
Cmacrμ13	0,410	0,518	11	2,513
<b>Média</b>	<b>0,569</b>	<b>0,615</b>	<b>10,6</b>	<b>4,579</b>
<b>Mediana</b>	<b>0,589</b>	<b>0,664</b>	<b>10,000</b>	<b>4,766</b>

\* Marcador fora do equilíbrio de Hardy- Weinberg, após correção de Bonferroni (p-valor ajustado < 0,005).

H<sub>O</sub>= Heterozigidade observada, H<sub>E</sub>= Heterozigidade esperada, N<sub>A</sub>= Número de alelos por locus e A<sub>R</sub>= Riqueza alélica.

A  $H_E$  obtidos para as populações deste estudo, quando comparada com os resultados de Fazzi-Gomes (2017), no geral apresentaram significativas diferenças ( $P$ -valor  $< 0,05$ ), com exceção do plantel de matrizes de Santarém.

A distribuição das frequências alélicas dos 10 marcadores microssatélites utilizados na genotipagem estão representados nas tabelas abaixo, com os seus respectivos alelos nos quais foram realizadas as coletas das matrizes. Possuindo alelos específicos para os planteis de matrizes de Peixe-Boi, Santarém, Breu Branco e Ulianópolis.

**Tabela 9** - Distribuição das frequências alélicas do marcador  $Cmacr\mu 01$ , dos planteis do presente trabalho.

<b><math>Cmacr\mu 01</math></b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
123	0,150	0,217	-	0,179
129	0,025	0,183	0,238	-
135	0,725	0,550	0,762	0,705
138	0,100	0,017	-	0,116
141	-	0,033	-	-

**Tabela 10** - Distribuição das frequências alélicas do marcador  $Cmacr\mu 03$ , dos planteis do presente trabalho.

<b><math>Cmacr\mu 03</math></b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
258	-	0,017	-	-
270	0,475	0,183	-	0,077
274	0,400	0,500	0,476	0,705
276	-	-	0,120	0,026
278	-	0,083	0,071	0,077
282	-	0,117	0,214	0,013
286	-	0,100	-	-
294	0,125	-	0,095	0,102
382	-	-	0,024	-

**Tabela 11** - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ04, dos planteis do presente trabalho.

<b>Cmacrμ04</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
314	0,100	0,133	0,024	0,026
318	0,050	0,200	0,095	0,128
322	0,200	0,100	0,048	0,167
326	0,275	0,250	0,238	0,462
330	0,300	0,167	0,595	0,217
334	0,075	0,050	-	-
338	-	0,017	-	-
342	-	0,017	-	-
348	-	0,017	-	-
350	-	0,050	-	-

**Tabela 12** -Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ05, dos planteis do presente trabalho.

<b>Cmacrμ05</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
107	-	0,033	-	-
111	0,025	0,067	-	0,205
115	0,325	0,333	0,095	0,333
119	-	0,200	-	-
123	0,175	0,167	0,500	0,282
127	0,475	0,150	0,381	0,180
131	-	0,050	-	-
157	-	-	0,024	-

**Tabela 13** - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ07, dos planteis do presente trabalho.

<b>Cmacrμ07</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
216	-	0,017	-	-
220	-	0,017	-	-
224	0,025	-	-	-
228	-	0,017	-	-
232	0,050	0,283	0,190	0,022
234	0,075	0,017	0,024	-
236	0,100	0,100	0,500	0,374
238	-	0,050	0,024	-
240	-	0,067	0,024	-
244	0,100	0,133	0,024	-
246	0,025	-	-	-
248	0,075	0,217	-	0,060
250	-	0,017	-	0,156
252	-	-	0,024	0,333
256	0,150	0,065	0,024	-
258	0,400	-	-	-
260	-	-	0,166	0,055
264	-	-	-	0,013
352	-	-	-	0,013

**Tabela 14** - Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ08, dos planteis do presente trabalho.

<b>Cmacrμ08</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
330	0,025	-	-	-
340	-	0,017	-	-
344	-	0,017	-	-
348	0,050	0,350	0,023	0,051
352	0,350	0,117	0,667	0,436
356	0,150	0,250	0,000	0,398
360	0,425	0,150	0,310	0,115
364	-	0,067	-	-
368	-	0,015	-	-
372	-	0,017	-	-

**Tabela 15** - Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 09, dos planteis do presente trabalho.

<b>C<math>\mu</math>09</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
82	-	0,017	-	-
96	-	-	0,024	-
100	-	0,017	-	-
104	-	0,033	0,024	-
108	0,625	0,400	0,452	0,474
112	0,175	0,267	0,048	0,013
116	0,100	0,133	0,024	0,051
120	-	0,067	-	0,115
124	-	-	0,048	0,026
128	0,100	0,050	0,380	0,321
961	-	0,016	-	-

**Tabela 16** - Distribuição das frequências alélicas do marcador C $\mu$ 10, dos planteis do presente trabalho.

<b>C<math>\mu</math>10</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
225	0,450	0,350	0,381	0,705
229	-	0,050	-	-
233	0,200	0,083	0,190	0,051
237	0,200	0,217	0,119	0,065
241	0,125	0,267	0,310	0,179
252	-	-	-	-
331	-	0,017	-	-
341	0,025	0,016	-	-

**Tabela 17-** Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ12, dos planteis do presente trabalho.

<b>Cmacrμ12</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
129	0,150	-	-	0,038
132	-	0,167	-	0,026
135	0,050	0,033	0,405	0,179
136	-	0,017	-	-
138	0,150	0,200	0,380	-
141	-	0,200	-	-
144	0,050	0,083	-	0,077
147	-	0,050	-	0,038
148	-	0,017	-	-
150	0,025	0,100	0,048	0,192
153	0,150	0,100	0,143	0,450
156	0,425	-	0,024	-
381	-	0,016	-	-
472	-	0,017	-	-

**Tabela 18-** Distribuição das frequências alélicas do marcador Cmacrμ13, dos planteis do presente trabalho.

<b>Cmacrμ 13</b>	<b>Peixe-Boi</b>	<b>Santarém</b>	<b>Breu Branco</b>	<b>Ulianópolis</b>
<b>Alelos</b>	<b>(n= 20)</b>	<b>(n= 30)</b>	<b>(n= 21)</b>	<b>(n= 39)</b>
173	0,025	-	-	-
193	0,350	0,483	0,714	0,513
197	0,475	0,133	0,143	0,474
201	-	0,050	-	-
205	0,050	0,134	0,024	-
209	-	0,083	0,095	0,013
211	0,075	-	-	-
213	-	-	0,024	-
217	-	0,100	-	-
221	0,025	-	-	-
225	-	0,017	-	-







## 6.2 Estrutura genética

Os dados significativos, das comparações por  $F_{ST}$ , entre os quatro planteis, mostram moderada diferenciação entre STM e PB (0,074), STM e BB (0,106), PB e BB (0,118), PB e U (0,099), BB e U (0,106). Além do que, extensa diferenciação entre STM e U (0,918).

**Tabela 19** - Resultados observados no programa Arlequin 3.5.1.3 para a medida de  $F_{ST}$ , segundo Wright (1978) .

Populações	STM (30)	PB (20)	BB (21)	U (39)
STM				
PB	0,074			
BB	0,106	0,118		
U	0,918	0,099	0,106	

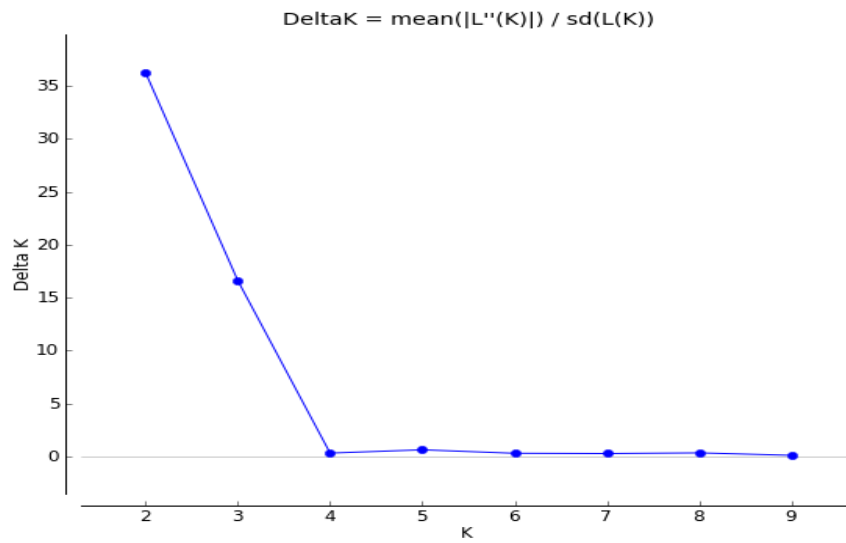
PB, Peixe Boi; STM, Santarém; BB, Breu Branco; U, Ulianópolis. Os valores não mostraram diferenças significativas com p-valor < 0.05.

	Pequena diferenciação genética
	Moderada diferenciação genética
	Grande diferenciação genética
	Extensa diferenciação genética

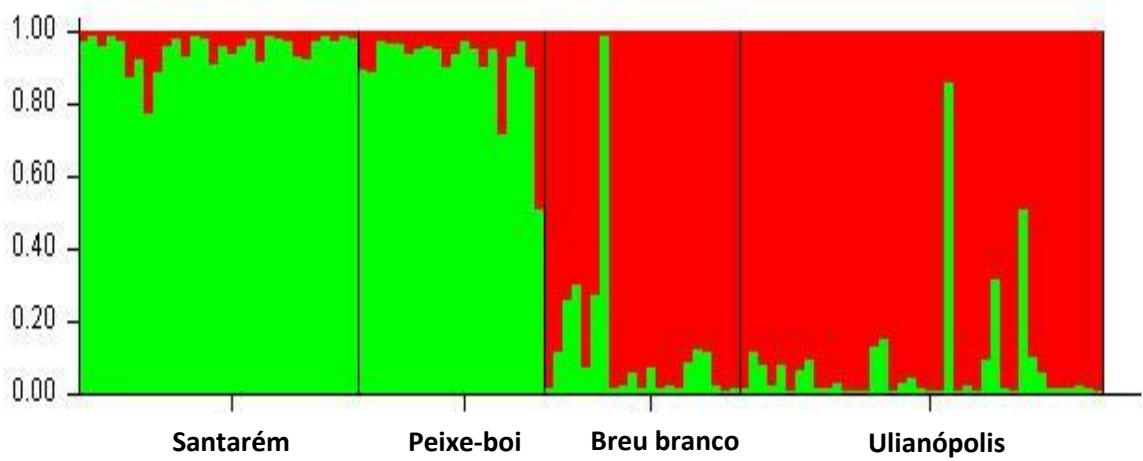
Os resultados do programa Structure com base na estatística de Evanno et al. (2005) mostra um  $\Delta K$  ótimo = 2 (Figura 3). Formando, assim, duas grandes populações, uma representada pelas populações homogêneas de Santarém e Peixe-boi (em verde) e a outra população homogênea de Breu Branco e Ulianópolis (em vermelho).

O distanciamento genético entre os planteis, nos mostra uma baixa distância genética entre Santarém e peixe-boi, assim como, baixa distância genética entre Breu Branco e Ulianópolis. Consequentemente, alta distância genética entre os planteis representados em verde (Santarém e Peixe-boi) e os representados em vermelho (Breu Branco e Ulianópolis). (Figura 4)

**Figura 3**– Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno Et al. (2005), o maior valor de  $\Delta K$  corresponde ao K ótimo.



**Figura 4** – Barplot originado no programa Structure, mostrando a clusterização de duas populações de matrizes.



## 7 DISCUSSÃO

### 7.1 Diversidade genética

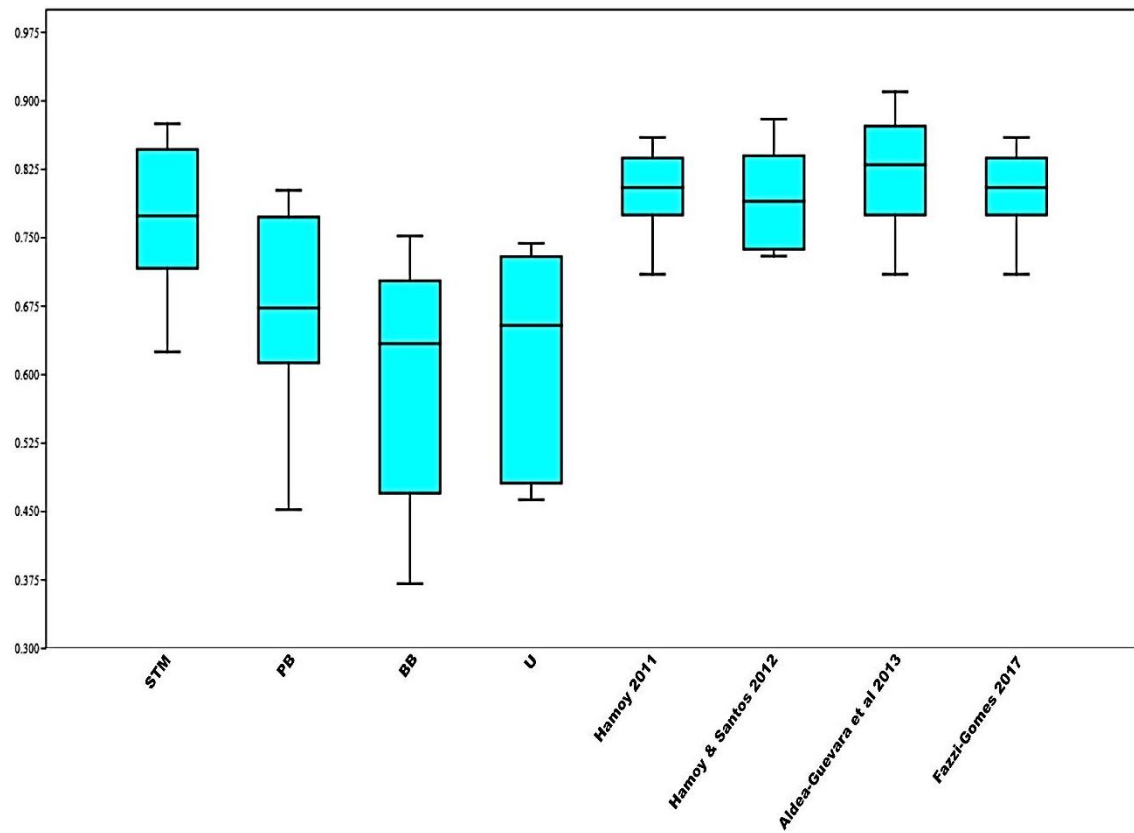
Perdas consideráveis de variabilidade genética foram detectadas, por microssatélites, nos planteis de reprodutores de Ulianópolis ( $H_E$  mediana= 0,664), Peixe-Boi ( $H_E$  mediana = 0,653) e Breu Branco ( $H_E$  mediana = 0,609) quando comparados á populações selvagens de tabaqui descritas por Hamoy et al. (2011), Hamoy & Santos (2012), Aldea-Guevara et al.(2013) e Fazzi-Gomes et al. (2017), que utilizaram o mesmo painel de marcadores moleculares deste estudo (Figura 5). Já o estoque de Santarém ( $H_E$  mediana = 0,786) apresentou menor perda de variabilidade genética.

A variabilidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos dentro de uma população, e entender a distribuição da variação genética dentro e entre populações é necessário para a conservação de espécies (COSTA, 2008). Além de ser crucial para uma população conseguir manter a capacidade natural de responder às mudanças climáticas e a todos os tipos de estresses bióticos e abióticos (MACHADO, 2008).

A redução da variabilidade genética é esperada, em razão da seleção não intencional dos reprodutores de *C. macropomum* e do tamanho pequeno da população, quando não há um manejo genético adequado do plantel de reprodutores. Os níveis de variabilidade genética de uma população natural ou mesmo de um plantel de reprodutores pode ser medido não somente pela heterozigosidade observada ( $H_E$ ), mas também pela sua diversidade alélica (MOREIRA et. al, 2007).

Para uma espécie muito explorada como o tabaqui, a investigação e descoberta do nível de diversidade genética de planteis cultivados são fundamentais, visto que poucos estudos com marcadores confiáveis vêm sendo desenvolvidos (GOMES, 2015).

**Figura 5** – Box plot da heterozigosidade esperada ( $H_E$ ) entre os planteis investigados no presente trabalho e os dados da literatura que utilizaram os mesmos marcadores deste estudo, em populações naturais.



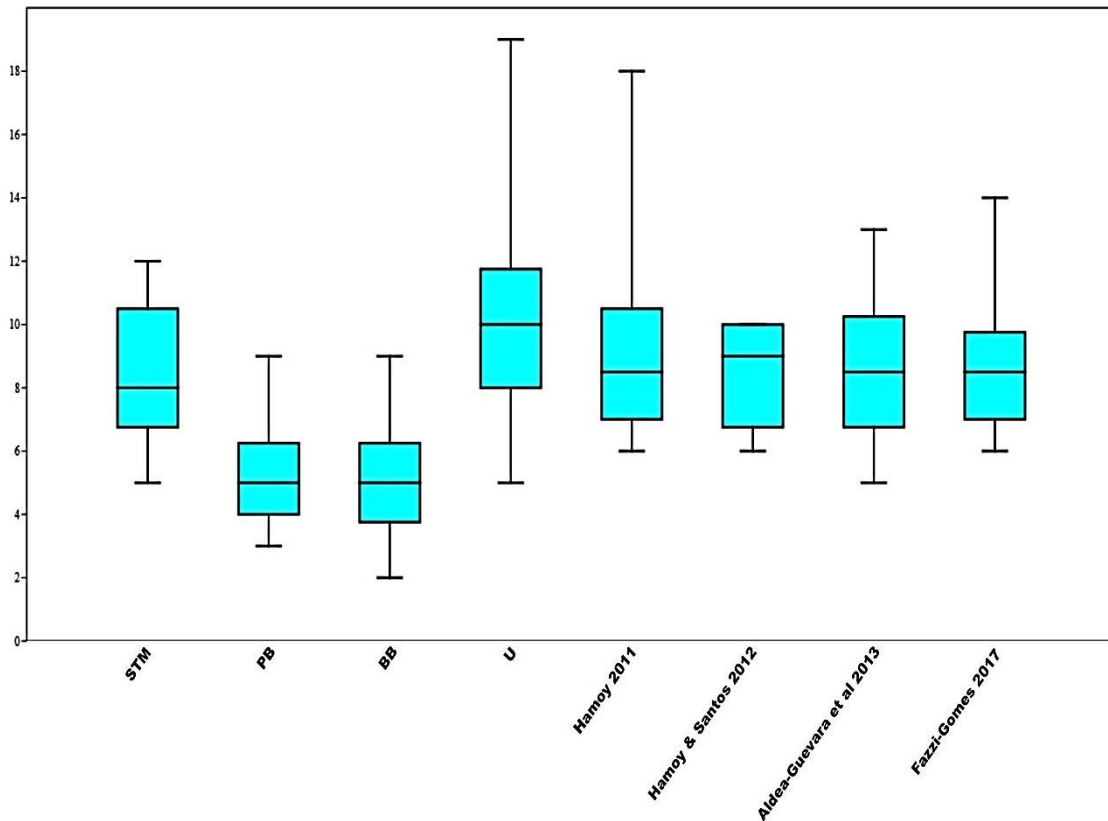
Essa redução de heterozigosidade, significativa nos municípios do Peixe-boi, Breu Branco e Ulianópolis, já era esperada por se tratar de populações mantidas em cativeiro, que estão realizando acasalamento entre parentais, poucos reprodutores ou mesmo de um único casal para a obtenção dos alevinos (SOUSA, et al., 2006; POVH et al., 2008; LOPERA BARRERO et al., 2010). O conjunto dessas ações resulta na redução da heterozigosidade permitindo que alelos deletérios recessivos entrem em homozigose (SOUZA, 2007). A consequência dessa baixa na variabilidade ao longo do tempo pode ser refletida na diminuição da resistência a doenças (TANIGUCHI, 2003) e da capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais (POVH et al., 2008), promovendo com o passar das gerações um afinamento genético (POVH et al., 2006).

O plantel de Santarém não apresentou redução significativa na variabilidade genética, fato que pode ser justificado pela facilidade da renovação de matrizes, pois esta piscicultura se localiza dentro da área de distribuição natural do tambaqui, o que não ocorre com as demais pisciculturas investigadas que estão mais distantes geograficamente do ambiente natural dessa espécie, dificultando a introdução de novas matrizes.

Aguiar et al. (2013) ao analisarem sequências de DNA mitocondrial, na região do Baixo Amazonas, de populações selvagens de tambaqui, com populações cultivadas e plantel de reprodutores, também observaram níveis similares de variabilidade. E propuseram que este fato, pode estar relacionado com a facilidade de renovação de seus plantéis reprodutores. Uma vez que está localizada às margens do rio Amazonas, onde a renovação de seu estoque reprodutor a partir do selvagem é uma operação mais simples.

O  $N_A$  para os planteis investigados neste trabalho foram, Santarém ( $N_A$  mediana = 9,000), Peixe Boi ( $N_A$  mediana = 4), Breu Branco ( $N_A$  mediana = 4,5) e Ulianópolis ( $N_A$  mediana = 10). Estes apresentaram tendência decrescente comparada com dados de populações selvagens, de Hamoy (2011) ( $N_A$  mediana= 9,6), Hamoy & Santos (2012) ( $N_A$  mediana = 8,6), Aldea-Guevara et al.(2013)( $N_A$  mediana = 8,58) e Fazzi-Gomes et al. (2017) ( $N_A$  mediana = 8.7) com exceção dos planteis de Santarém e Ulianópolis (Figura 6).

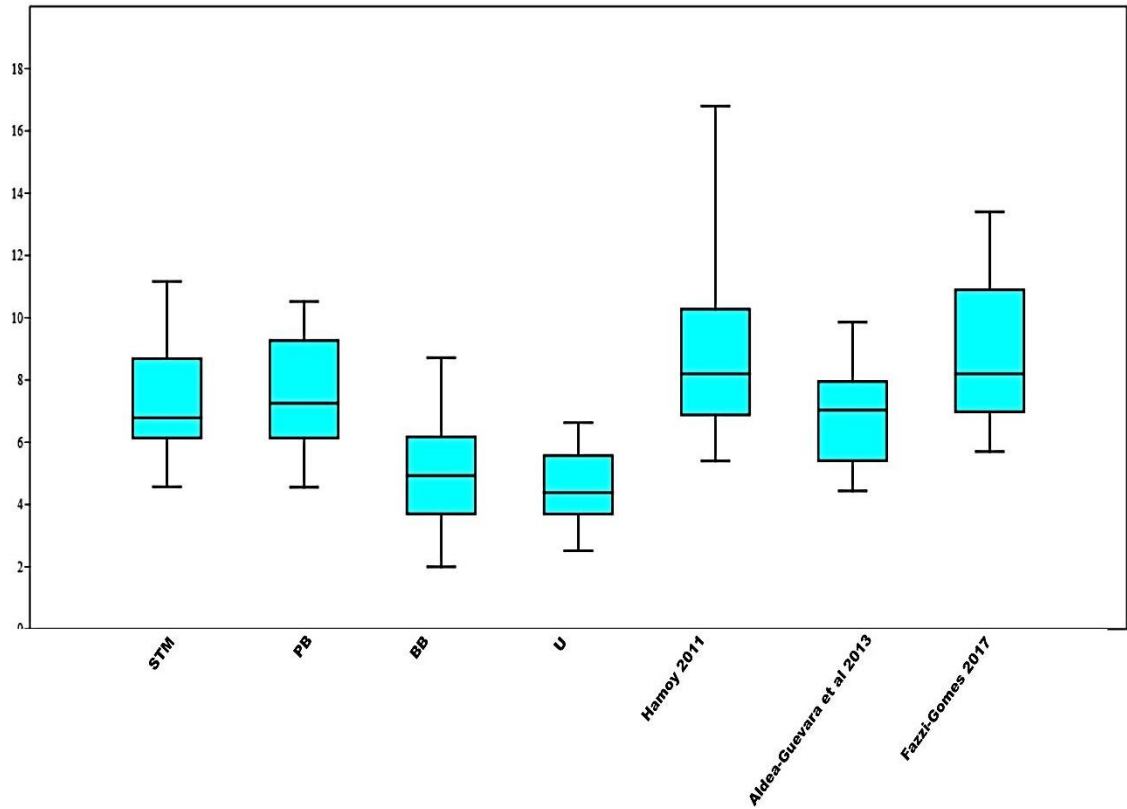
**Figura 6** – Box plot do **número de alelos por locus** ( $N_A$ ) entre os planteis investigados no presente trabalho e os dados da literatura que utilizaram os mesmos marcadores deste estudo, em populações naturais.



Essa baixa no número de alelos reforça as evidências de diminuição de variabilidade genética dos planteis em estudo. De acordo com Carvalho, Silva & Medeiros (2009) dentro de uma mesma espécie onde alelos (por exemplo, "A" ou "B") são perdidos juntamente com diferentes características, caracteriza-se o fenômeno da erosão genética. No caso dos planteis deste estudo este fato causa preocupação, uma vez que estas características que estão sendo perdidas não são conhecidas, e poderiam ser de interesse zootécnico e econômico para a atividade.

A redução de variabilidade é claramente refletida nos valores de  $A_R$ , índice não enviesado pelo tamanho amostral (Spencer et al., 2000), onde temos valores de  $A_R$  medianos de 6,9 na piscicultura de Santarém, 7,6 na piscicultura de Peixe-Boi, 4,9 na piscicultura de Breu-Branco e 4,3 na piscicultura de Ulianópolis, esses quando comparados com os valores de populações selvagens relatados nos estudos de Hamoy et al. (2011) ( $A_R = 9$ ), Aldea-Guevara et al. (2013) ( $A_R = 6,5$ ) e Fazzi-Gomes et al. (2017) ( $A_R = 8,2$ ), evidenciam a perda de variabilidade genética dos planteis analisados neste estudo (Figura 7).

**Figura 7** – Box plot da **riqueza alélica** ( $A_R$ ) entre os planteis investigados no presente trabalho e os dados da literatura que utilizaram os mesmos marcadores deste estudo, em populações naturais.



O plantel de Santarém mesmo que nos índices anteriores, tenha conseguido manter valores médios próximos das populações selvagens, esta clara a perda de variabilidade que acomete também este plantel. A riqueza alélica não sofre influências de diferentes tamanhos amostrais, e é mais sensível aos efeitos de um evento de *boottleneck* se comparada com a heterozigosidade propriamente dita (SPENCER et al., 2000; PETIT et al., 1988). Para estes autores a riqueza alélica é um bom indicador das mudanças demográficas sofridas por uma população.

Esta tendência de baixa na variabilidade genética em planteis cultivados de *C. macropomum*, também foi registrada por Gomes et al. (2012), Santos et al. (2012), Cunha (2010), Castro (2008) e Calcagnotto & Toledo-Filho (2000), utilizando outros marcadores moleculares.

Santos et al. (2016) também relatam diminuição na variabilidade genética em reprodutores de tabaqui de diferentes regiões do Brasil, com valores de  $A_R$  variando de 3,2 a 4,1. A provável causa apontada por esses autores seria o processo de deriva genética, ocasionado pelo pequeno número efetivo de reprodutores observados nas pisciculturas de tabaqui, para diminuir os custos de produção. Além da deriva genética, o pequeno número de reprodutores favorece a endogamia (BIJLSMA AND LOESCHCKE, 2011).

Outro fator importante que pode ter influenciado é o efeito fundador, se o plantel for formado com poucos indivíduos ou os indivíduos selecionados não representarem geneticamente as populações originais, pode haver perda de variabilidade genética, que vai ocasionar a presença de baixas frequências ou ausência de determinados alelos (JACOMETO, et al., 2010).

Porém, não podemos afirmar que sejam esses os fatores determinantes, visto que não há registro sobre a formação desses estoques nas propriedades, nem tão pouco sobre seu relacionamento genético.



## 7.2 Estrutura populacional

O conhecimento e o entendimento do padrão de distribuição de genótipos dentro de uma população são essenciais para a conservação de recursos naturais e é de grande interesse para espécies que são cultivadas em cativeiro, tal fator é responsável pela manutenção da variabilidade genética. A manutenção da variabilidade genética é uma premissa importante para que haja a conservação de estoques das espécies domesticadas que são constantemente submetidas a condições atípicas provocadas pelo manejo dos locais de cultivo (HILSDORF et al., 2006; MELO et al., 2012).

A seleção genética tem o objetivo de melhorar e/ou fixar características de importância, econômica através do aumento na frequência de alelos favoráveis em uma determinada população. O melhoramento genético surge a partir da escolha correta dos indivíduos que participarão do processo de constituição da próxima geração, ou seja, da escolha dos reprodutores (BLANK & TAKAKO, 2015).

Os resultados de  $F_{ST}$  obtidos no presente estudo, mostram que existe uma moderada diferenciação entre os planteis de matrizes de Peixe-boi e Santarém, Peixe-boi e Breu Branco e Peixe-boi e Ulianópolis. Além de uma extensa diferenciação genética entre Santarém e Ulianópolis. Contudo, nestes resultados podemos observar explicitamente a formação de duas populações diferentes: uma formada entre Santarém e Peixe-boi e outra formada entre Breu Branco e Ulianópolis. Logo, com uma pequena aproximação genética de um plantel para outro.

A leitura desses dados fica mais evidente ao utilizar a estatística bayesiana, mais especificamente a análise do  $K$  verdadeiro no programa Structure, no qual por meio do  $\Delta K$ , foi observado que  $K = 2$  era mais representativo para as duas populações com a formação de dois clusters sendo um composto pelas matrizes de Peixe-Boi e Santarém e outra pelas matrizes de Breu Branco e Ulianópolis.

Esse resultado em planteis de reprodutores difere dos encontrado por Fazzi-GOMES (2017) em populações naturais de tambaqui, onde em sua área extensa área amostrada, as populações foram pamíticas. Por outro lado, a estruturação genética encontrada neste estudo corrobora os achados de Santos et al. (2016), que analisaram populações cultivadas de tambaqui e encontraram elevada estruturação genética, refletindo o processo de domesticação que essa espécie vem sofrendo.

A moderada diferenciação genética associada à redução de variabilidade genética encontrada na maioria dos planteis de tambaqui no estado do Pará, são importantes

informações para futuros programas de manejo genético, melhoramento genético e também de conservação da diversidade genética dessa espécie.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ✓ As matrizes de tabaqui *C. macropomum* de Peixe-boi, Breu Branco e Ulianópolis apresentam significativa redução da variabilidade em relação às populações selvagens de tabaqui.
- ✓ O plantel de matrizes de Santarém, não apresentou redução significativa de variabilidade genética, em relação às populações selvagens de tabaqui *C. macropomum*.
- ✓ Os planteis de matrizes de tabaqui estão divididos em dois estoques que são: Santarém e Peixe-boi; e Breu Branco e Ulianópolis.
- ✓ Neste estudo obteve-se uma caracterização fidedigna da diversidade genética e estrutura genética dos planteis de matrizes de tabaqui nas pisciculturas estudadas, gerando subsídios para um programa de manejo e melhoramento genético com os planteis de tabaqui analisados, a fim de aumentar a produtividade e a qualidade dos tabaquis nas pisciculturas no estado do Pará.
- ✓ Recomenda-se aumentar o fluxo gênico, com a obtenção de mais indivíduos selvagens para compor o plantel reprodutor das estações de pisciculturas em estudo.
- ✓ É evidente a necessidade de mais estudos para caracterização populacional e monitoramento dos níveis de variabilidade genética de outros planteis de tabaqui no estado do Pará.

## 9 REFERÊNCIAS

- Aguiar J., Schneider H., Gomes F., Gomes F., Carneiro J., Santos S., Rodrigues L.R. & Sampaio I. (2013) Genetic variation in native and farmed populations of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciência* v. 85, 2013.p.1439–47.
- ALDEA-GUEVARA, M.; HARGROVE, J.; AUSTIN, J.D. Diversity and geneflow in a migratory frugivorous fish: implications for Amazonian habitat connectivity. *Conserv Genet.* 2013. 14:935–942.
- AGOSTINI, C.; ALBALADEJO, R. G.; APARICIO, A.; ARTHOFER, W. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database. *Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. Mol Ecol Resour.*v. 13, n.5, 2013. p. 966-8.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. *Sofruitfulfish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's Tambaqui*. New York: Columbia University, 1997. 157 p.
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; GOULDING, M. Os frutos do tambaqui. *Ecologia, conservação e cultivo na Amazônia*. Sociedade Civil Mamirauá – MCT – CNPq, 1998. 186p.
- ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOMES, L. de C. *Tambaqui (Colossoma macropomum)*. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. de C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: UFSM, 2005. p.67-104.
- AYRES, M.; AYRES JUNIOR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. 2007. *Biostat 5.0. Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas*. Belém: MCT; IDSM; CNPQ. 364p.
- BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. DE C. *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. 2ª ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.
- BIJLSMA, R.; & LOESCHCHE, V. *Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. Evolutionary applications*, 2011.
- BLANCK, D. V. & TAKAKO, A. K. Estado atual do melhoramento genético de peixes no Brasil. In: Tavares-Dias, M. & Mariano, W.S. (Org.). *Aquicultura no Brasil: novas perspectivas*. São Carlos, Ed. Pedro & João, 2015.
- BRABO, M. F. *Piscicultura no Estado do Pará: situação atual e perspectivas*. *Rev. Actapesca* 2(1): i-vii, 2014.
- BRASIL. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011*. Ministério da pesca e aquicultura. Disponível em <<http://www.mpa.gov.br>> Acesso em 20 maio 2015.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura*. Brasília: DF, 2014. 56 p.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Boletim estatístico da pesca e aquicultura*. Brasília: MPA, 2012. 128p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Censo Aquícola Nacional: Ano 2008*. Brasília, DF, 2013. 336 pp.

CALCAGNOTTO, D. & TOLEDO-FILHO, S.A. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossomacropomum*). *Genetics and Molecular Biology* 23 (1): 127-130. 2000.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S. A.; DE SALLE, R. Relationships among Characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 36, p. 135-153. 2005. Central Amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, n.4, p. 637-652. 1999.

CARVALHO, J.M.F.C.; SILVA, M.M.A.; MEDEIROS, M.J.L. Perda e Conservação dos Recursos Genéticos Vegetais. Embrapa Algodão. Documentos, 221. ISSN 0103-0205. 19p. 2009.

CASTRO, L. A. F. Comparação da Variação Genética da região D-Loop Mitocondrial em populações naturais e artificiais (estoques de pisciculturas) de Tambaqui. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Pará. p. 44. 2008.

CHAGAS, E. C.  $\beta$ -glucano e nucleotídeos para tambaquis (*Colossomacropomum*) vacinados e desafiados com *Aeromonashydrophila*: desempenho produtivo e respostas fisiopatológicas. 2010. 154p. Tese (Doutorado em Aquicultura) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, 2010.

CIOFI C, TZIKA AC, NATALI C, WATTS PC, SULANDARI S, ZEIN MSA, MILINKOVITCH MC. Development of a multiplex PCR assay for fine-scale population genetic analysis of the Komodo monitor *Varanus komodoensis* based on 18 polymorphic microsatellite loci *Molecular Ecology Resources* 11: 550-556. 2011.

CLARKE LA; REBELO CS; GONÇALVES J; BOAVIDA MG; JORDAN P. PCR amplification introduces errors in mononucleotide and dinucleotide repeat sequences. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 54: 351-353. 2001. *Colossomacropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista*.

COSTA, F. R. da. Estudo das relações genômicas em espécies de Caricaceae com base em marcadores citomoleculares. Tese de doutorado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro - UENF. Campos dos Goytacazes/RJ. 2008.

CUNHA, M. F. G. 2010. Identificação genética de tambaqui, *Colossoma macropomum* (CURVIER, 1818), e dos híbridos tambacu e tambatinga através de marcadores moleculares nucleares e mitocôndrias. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Biologia Ambiental. Universidade Federal de Pará, p.90.

DAIRIKI, J. K.; SILVA, T. B. A. Revisão de literatura: Exigências nutricionais do tambaqui – Compilações de trabalhos, formulação de ração adequada e desafios futuros. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2011. Documentos; 91, p. 44.

DELGHANDI M, MORTENSEN A, WESTGAARD JI. Simultaneous analysis of six microsatellite markers in Atlantic cod (*Gadus morhua*): a novel multiplex assay system for use in selective breeding studies. *Mar Biotechnol* 5: 141-148. 2003.

EARL, D. A. & VON HOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4(2): 359–361. 2011.

EXCOFFIER, L. & LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. 2010. v.10, p. 564-567.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, . Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8): 2611–2620. 2005.

FAZZI-GOMES, P.; GUERREIRO, S.; PALHEITA, G. D. A.; MELO, N. F. A. C. de; SANTOS, S.; and HAMOY, I. G. High genetic diversity and connectivity in *Colossoma macropomum* in the Amazon basin revealed by microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*, Sociedade Brasileira de Genética. Printed in Brazil. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4685>. 2017.

FERNANDES, T. R. C.; DORIA, C. R. C.; MENEZES, J. T. B. Características de carcaça e parâmetros de desempenho do tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier, 1818) em diferentes tempos de cultivo e alimentado com rações comerciais. *Boletim do Instituto de Pesca*, n. 36. São Paulo. 2010. p. 45 – 52.

FISHBACK AG; DANZMANN RG; SAKAMOTO T; FERGUSON MM. Optimization of semi-automated microsatellite multiplex polymerase chain reaction systems for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* 172: 247-254. 1999.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. R.; BRISCOE, D. A. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press. Cambridge, England. 617p. 2002.

GJEDREM, T. Genetic improvement of cold-water fish species. *Aquac Res* 31:25-33. 2000.

GOMES, L. C.; SIMÕES, L. N.; ARAUJO-LIMA, C. A. R. M. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: *Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil*. Bernardo Baldisseroto e Levy de Carvalho Gomes (Org.). 2 ed. Editora UFSM. 2010. 608p.

GOMES, F.; SCHNEIDER, H.; BARROS, C.; SAMPAIO, D.; HASHIMOTO, D.; PORTO-FORESTI, F.; SAMPAIO, I. Innovative molecular approach to the identification of *Colossoma macropomum* and its hybrids. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.84, p. 517-525. 2012.

GOMES, P. F. F. Análise da variabilidade genética das pisciculturas de tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818) do estado do Pará, utilizando marcadores microsatélites. *Dissertação (Aquicultura e Recursos Aquáticos Tropicais - UFRA)*, Belém. 2015.

GOUDET, J. FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (version 2.9.3.2) Available at <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. 2002.

GOULDING, M., CARVALHO, M.L. Live history and management of the tambaqui, *Colossomacropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1, 107-133. 1982.

GUICHOUX E, LAGACHE L, WAGNER S, CHAUMEIL P, LE'GER P, LEPAIS O, LEPOITTEVIN C, MALAUSA T, REVARDEL E, SALIN F, *et al.* Current trends in microsatellite genotyping. *Mol Ecol Resour* 11: 591-611. doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03014.x. 2011.

HAMOY, I. G.; CIDADE, F.W.; BARBOSA, M. S.; GONÇALVES, E. C.; SANTOS, S. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes). *Conservation Genet Resour*, v. 3, p. 33–36. 2011.

HAMOY, I. G. Desenvolvimento de um painel multiplex de microssatélites para o tambaqui (*Colossoma macropomum*, characiforme: serrasalminae): Ferramenta eficiente para aplicação em manejo e conservação. Tese de Doutorado, apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. Universidade Federal do Pará. Belém. 136p. 2011.

HAMOY IG, SANTOS EJM & SANTOS SEB. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. *Genetics and Molecular Research* 7 (1): 29-32. 2008.

HAMOY, I.G. & SANTOS, S. Desenvolvimento de um painel multiplex de microssatélites para o tambaqui (*colossomamacropomum*, characiforme: serrasalminae): ferramenta eficiente para aplicação em manejo e conservação. 113 f. Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém. 2011.

HAMOY, I.G. & SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossomamacropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. *Genetics and Molecular Research* 11 (1): 141-146, 2012.

HASHIMOTO, D.T.; ALVES, A.L.; VARELA, E. S.; MORO, G.V.; & IWASHITA, M.K.P. Cartilha de Genética na Piscicultura : Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. Brasília, DF : Embrapa, 2012a.

HASHIMOTO, D.T.; ALVES, A.L.; VARELA, E. S.; MORO, G.V.; & IWASHITA, M.K.P. Cartilha de Genética na Piscicultura : Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. Brasília, DF : Embrapa, 2012b.

HILSDORF, A. W. S.; MARQUES, D. K. S.; RESENDE, E. K. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Embrapa Pantanal Documentos. p. 82 -43. 2006.

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) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. 159 p. 2013.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. Produção da Pecuária Municipal – IBGE, Rio de Janeiro-Brasil. v. 43. p.1-49, 2015.

JACKSON T.R.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; REITH M.E. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220: 245-259. 2003a.

JACKSON T.R.; MARTIN-ROBICHAUD, D.J.; REITH M.E. Application of DNA markers to the management of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) broodstock. *Aquaculture* 220: 245-259. 2003b.

JACOMETO, C.B; LOPERA-BARRERO, N.M; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P; GOMES, P.C; POVH, J.A.; JUNIOR, D.P.S; LAURO VARGAS, L.; RESENDE, E.K de; & RIBEIRO, R.P. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.45, n.5, 2010. p.481-487.

JOHNSON NA, REXROAD CE, HALLERMAN EM, VALLEJO RL, PALTI Y. Development and evaluation of a new microsatellite multiplex system for parental allocation and management of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) broodstocks. *Aquaculture* 266: 53-62. 2007.

JONES, A.G.; SMALL, C.M.; PACZOLT, K.A.; RATTERMAN, N.L. A practical guide to methods of parentage analysis. *Molecular Ecology Resources*, 2010. p. 10: 6-30.

KALINOWSKI, S.T.; WAGNER, A.P.; & TAPER, M.L. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579, 2006.

KELKAR YD, STRUBCZEWSKI N, HILE SE *et al.* What is a microsatellite: a computational and experimental definition based upon repeat mutational behavior at A/T and GT/AC repeats. *Genome Biology and Evolution* 2: 620-635. 2010.

KUBITZA, F. Tambaqui, alimentando com eficiência para reduzir custos. *Panorama da Aquicultura, Tocantins*, n. 129, v. 22, p. 1-7, jan./fev. 2012.

KULMAR, R.; SINGH, P.J.; NAGPURE, N.S.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S.K. & LAKRA WS. A non-invasive technique for rapid extraction of DNA from fish Scales. *Indian J Exp Biol.* 45: 992-997, 2007.

LEE, J. & SARPEDONTI, V. *Diagnóstico, tendência, potencial e políticas públicas para o desenvolvimento da aquicultura*. Universidade Federal do Pará/ Núcleo de Altos Estudos Amazônicos, Belém, PA, 2008. 112 pp.

LI Y, WONGPRASERT K, SHEKHAR M, RYAN J, DIERENS L, MEADOWS J, PRESTON N, COMAN G, LYONS RE. Development of two microsatellite multiplex systems for black tiger shrimp *Penaeus monodon* and its application in genetic diversity study for two populations. *Aquaculture* 266: 279-288. 2007.

LIU Z.J.& CORDES J.F. DNA marker Technologies and their applications in aquaculture genetics, *Aquaculture* 238: 1-37. 2004.

LOPERA-BARRETO M.N., RIBEIRO R.P., POVH J.A., MENDES L.D.V. & POVEDA-PARRA A.R. Produção de organismos aquáticos: Uma visão geral do Brasil e no Mundo. Editora Agro livros, Guaíba, RS, 2011.320p.

LOPES, T.S.; STREIT JUNIOR, D.P.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A.;LOPERA BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J.R. Diversidade genética de estoques de reprodutoresde *Colossomamacropomum*. ArquivoBrasileiro de MedicinaVeterinária e Zootecnia, v.61, 2009. p.728-735.

LUO, K.; KONG, J.; LUAN, S.; et al. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeuschinensis*. *Aquaculture*, v. 420-421, p. 32–37, 2014. Elsevier B.V.

MACHADO-ALLISON. Estudios sobre lasubfamiliaSerrasalminae (Teleostei, Characidae). Parte I. Estudio comparado de los juveniles de lascachamas. 1982.

MATHER, P.B. Overview of fish genetics research at Queensland University of Technology. In: GUPTA, M.V.; ACOSTA, B.O. (Ed.). Fish genetics research in member countries and institutions of the International Network on Genetics in Aquaculture. Penang: The World Fish Center, 2001. p.133-139.

MCDONALD, G. J.; DANZMANN, R. G.; FERGUSON, M. M. Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, v. 233, n. 1-4, p. 65–78, 2004.

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

MELO, L. A. S.; IZIEL A. C. U.; RODRIGUES F.M. Piscicultura: Alternativa Sustentável para o agronegócio da Amazônia. Embrapa Amazônia Ocidental. 2012.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V. da; SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. Pesquisa Agropecuária Brasileira, v.42, p.521-526.2007.

NAVARRO, A.; BADILLA, R.; ZAMORANO. M.J.; PASAMONTES, V.; HILDEBRANDT, S.; SÁNCHEZ, J.J.; AFONSO, J.M. Development of two new microsatellite multiplex PCRs for three sparid species: Gilthead seabream (*Sparus auratus* L.), red porgy (*Pagrus pagrus* L.) and redbanded seabream (*P. auriga*, Valenciennes, 1843) and their application to paternity studies. *Aquaculture* 285: 30-37. 2008.

NETO, J. P. B.; PRADO, J. F. Nutrição e alimentação de peixes. Cartilha do produtor. p. 1-8, dez. 2009. Disponível em: <[www.bigsal.com.br/cartilha-de-peixes-print.php](http://www.bigsal.com.br/cartilha-de-peixes-print.php)>. Acesso: 10 nov. 2015.



NIRCHIO, M.; FENOCCHIO, A. S.; SWARÇA, A. C.; PÉREZ, J. E.; GRANADO, A.; ESTRADA, A.; RON, A.;  
E. Cytogenetic characterization of hybrid offspring between *Colossomacropomum* (Cuvier, 1818) and *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1817) from Caicaradel Orinoco, Venezuela. *Caryologia* 56 (4): 405-411, 2003.

OLAFSSON, K.; HJORLEIFSDOTTIR, S.; PAMPOULIE, C.; HREGGVIDSSON, G.O.; GUDJONSSON, S. Novel set of multiplex assays (SalPrint15) for efficient analysis of 15 microsatellite loci of contemporary samples of the Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology Resources* doi: 10.1111/j.1755-0998.2009.02781. 2010.

OLIVEIRA, C. ALMEIDA-TOLEDO L. F.; FORESTI, F.; BRITSKI H. A. TOLEDO-FILHO S. A. Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes. *Rev Bras Genet* 11: 577-624, 1998.

OLSEN JB, LEWIS CJ, KRETSCHMER EJ, WILSON SL & SEEB JE. Characterization of 14 tetranucleotide microsatellite loci derived from Pacific herring. *Molecular Ecology Notes* 2: 101-103. 2002.

ORTÍ, G.; SIVASUNDAR, A.; DIETZ, K.; JÉGU, M. Phylogeny of the Serrasalminae (Characiformes) based on mitochondrial DNA sequences. *Genetics and Molecular Biology*, v.31. 2008. p. 343-351.

PARÁ – Governo do Estado do Pará. O Estado do Pará [online]. Disponível em: <[www.pa.gov.br](http://www.pa.gov.br)> [Acessado em: 20/05/2015].

PENG Q; WANG G; TAN S; WANG T; LI L; & ZOU F. Isolation and characterization of thirteen polymorphic tetranucleotide microsatellite markers in the Tokay gecko (*Gekko Gecko*) *Conservation Genet Resour* (2011) 3: 617-619. 2011.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, A. O. Identifying Populations for Conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, Gainesville, v.12, n.4, 1998. p. 844-855.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; MANGOLIN, C. A.; GASPARINO, E.; BARRERO, N.M.L; GOMES, P.C.; STREIT JR, D.P.; VARGAS, L. Importância do monitoramento genético pela utilização de marcadores moleculares na piscicultura. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 45, 2006. p.101-106.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; SIROL, R. N.; STREIT JÚNIOR, D. P.; LOPERA BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; GOMES, P. C.; LOPES, T.S. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 43, 2008. p.201-206.

QUEIROZ, C. A; SOUSA, N. R.; SILVA, G.F.; INOUE, L. A. K. A. Impacts of stocking on the genetic diversity of *Colossomacropomum* in central Amazon, Brazil. *Genetics and molecular research*, 2015.

RENSHAW, M.A.; SAILLANT, E.; COLEEN BRADFIELD, S.; GOLD, J.R. Microsatellite multiplex panels for genetic studies of three species of marine fishes: red drum

(*Sciaenopsocellatus*), red snapper (*Lutjanus campechanus*), and cobia (*Rachycentron canadum*) *Aquaculture* 253: 731-735. 2006.

RESENDE, E. K. DE. *Melhoramento Animal No Brasil: Uma Visão Crítica Espécies Aquáticas*. SBMA, 2007.

RICE, W. R. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225, 1998.

ROTTA, M. A. *Aspectos Gerais da Fisiologia e Estrutura do Sistema Digestivo dos Peixes Relacionados à Piscicultura*. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 48 p. – (Documentos / Embrapa Pantanal ISSN 1517-1973).

SAMBROOK, J. & RUSSEL, D.W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2001.

SANTANA, G. X.; SANTOS, C. H. A.; SOUSA, C. F. S.; NASCIMENTO, P. R. M.; PAULA-SILVA, M. N.; SOUSA, A. C. B.; CAMPOS, T. A.; ALMEIDA-VAL, V. M. F. Isolation of novel microsatellite markers for tambaqui (*Colossoma macropomum*, Cuvier 1818), an important freshwater fish of the Amazon. *Conservation Genet Resour.*, v. 4, 2012. p. 197–200

SANTOS, G. M.; EFREM, J. G. F.; JANSEN, A. S. *Peixes comerciais de Manaus. Characiformes*. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, 2006 v. 4, p. 31.

SANTOS, C. H. A.; SANTANA, G. X.; SA LEITÃO, C. S.; PAULA-SILVA, M. N.; and ALEIDA-VAL, V. M. F. Loss of genetic diversity in farmed populations of *Colossoma macropomum* estimated by microsatellites. *Stichting International Foundation for Animal Genetics*. 2016. p. 373–376.

SANTOS, M. C. F. *Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (Colossoma macropomum) através de marcadores moleculares: uma contribuição para conservação da espécie*. Tese de Doutorado. Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas. 175p. 2010.

SANTOS, M. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Permanent Genetic Resources Note* v. 9, 2009. p. 874-876.

SILVA, A. M. C. B. *Perfil da Piscicultura na Região Sudeste do Estado do Pará*, 45 f, Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia, 2010.

SOUSA, A.; CARVALHO, D. C.; DE MELO, D. C.; SEERIG, A. S.; DE OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, E. A.; CREPALD, V.; FARIA, P. M. C.; A. Utilização de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.100-104. Disponível em [www.cbpa.org.br](http://www.cbpa.org.br). 2006.

- SOUZA, M. E. Caracterização genética de reprodutores de tilápia: estratégias para manutenção da variabilidade. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife/PE. 55p. 2007.
- SPENCER, C. C.; NEIGEL, J. E.; LEBERG, P. L. Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 9, 2000. p. 1517-1528.
- SRIPHAIROJ, K.; KAMONRAT, W.; NA-NAKORN, U. Genetic aspectin broodstock management of the critically endangered Mekong giantcatfish, *Pangasianodon gigas* in Thailand. *Aquaculture*, v. 264, n. 1-4, p. 36–46, 2007.
- TANIGUCHI, N. 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v.13, p.175-185.
- TAVE, D. Inbreeding and brood stock management. *Fisheires Technical Paper*. No. 392, rome FAO, 1999. 122p.
- TAVE, D.; UNLIMITED, U.; BAY, C. Selective breeding programmes for medium-sized fish farms. FAO, 1995.
- TAYLOR GR, NOBLE JS, MUELLER RF. Automated analysis of multiplex microsatellites *J Med Genet* 31:937-943. 1994.
- VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M & SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535-538, 2004.
- VAN OOSTERHOUT, C; HUTCHINSON, WF; WILLS, DPM; & P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4: 535-538. 2004.
- VARELA, E. S.; ALVES, A. L.; BARROSO, A. S.; TARDIVO, T. F. Parentesco genético em reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) baseado em marcadores de DNA: perspectivas de manejo genético na ausência de pedigree. Palmas : Embrapa Pesca e Aquicultura, 2015.
- VILACORTA-CORRÊA, M.A.; SAINT - PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central amazon, Brazil. *Revista Brasileira de Biologia*, v. 59, n.4, 1999. p. 637-652.
- WALSH SP, FILDES NJ AND REYNOLDS R. Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Research* 24 (14): 2807-2812. 1996.
- WANG, J. Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. *Journal of Evolutionary Biology*, v. 27, p. n/a–n/a, 2014.
- WEIR, B. S; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. 1984. v. 38, p. 1358-1370.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and genetics of populations. In: The Theory of Gene Frequencies. London: University of Chicago Press 511 pp.