



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ASPÉCTOS REPRODUTIVOS E MOLECULARES DE *Pimelodus maculatus* –
LACÈPÈDE 1803 (SILURIFORMES PIMELODIDAE)**

Aluno: Roosevelt Gonçalves Moreira

Orientadora: Dra. Sandra Morelli

Co-Orientadores: Dr. Luís Carlos Guilherme;
Dr. José Octávio Jacomini .

UBERLÂNDIA - MG
2007



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**ASPÉCTOS REPRODUTIVOS E MOLECULARES DE *Pimelodus maculatus* –
LACÈPÈDE 1803 (SILURIFORMES PIMELODIDAE)**

Aluno: Roosevelt Gonçalves Moreira

Orientadora: Dra. Sandra Morelli

Co-Orientador: Dr. Luís Carlos Guilherme;
Dr. José Octavio Jacomini.

**Dissertação apresentada à
Universidade Federal de
Uberlândia como parte dos
requisitos para obtenção do
Título de Mestre em Genética e
Bioquímica.**

**UBERLÂNDIA - MG
2007**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M838a Moreira, Roosevelt Gonçalves, 1960
2007 Aspéctos reprodutivos e moleculares de *Pimelodus maculatus* –
Lacépède 1803 (Siluriformes Pimelodidae) / Roosevelt Gonçalves
Moreira. - 2007.
47 f. : il.

Orientadora: Sandra Morelli.

Coorientador: Luís Carlos Guilherme.

Coorientador: José Octavio Jacomini.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.746>

Inclui bibliografia.

1. Bioquímica - Teses. 2. Peixes - Reprodução - Teses. 3.
Espermatozoides - Teses. 4. Hormônios - Teses. I. Morelli, Sandra. II.
Guilherme, Luís Carlos. III. Jacomini, José Octavio. IV. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. V. Título.

CDU: 577.1

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ASPÉCTOS REPRODUTIVOS E MOLECULARES DE *Pimelodus maculatus* –
LACÉPÈDE 1803 (SILURIFORMES PIMELODIDAE)**

ALUNO: ROOSEVELT GONÇALVES MOREIRA

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Sandra Morelli

Examinadores:

Dra. Ana Maria Bonetti
Dr. Paulo César Venere

Data da Defesa: 10/05/2007

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

Dra. Sandra Morelli

DEDICATÓRIA

Dedico à minha Mãe que sempre esteve ao meu lado me incentivando e torcendo pelo êxito deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Muitas foram as pessoas que me apoiaram nesta jornada, entre elas não posso esquecer os colegas de laboratório e em especial o Pé Trocado – (José Clidenor dos Santos), técnico de coleta, motorista, churrasqueiro e exemplo de simplicidade e companheirismo

À Alessandra, Ana Cristina, Ana Carolina, Sabrina, Karine, Carlos e Robson pelo providencial auxílio e pelo apoio incondicional.

Ao amigo e, extra oficialmente, co-orientador DR. Luiz Carlos Guilherme que por muitas vezes deixou seus afazeres pessoais e profissionais para ajudar-me nos experimentos.

Ao professor Dr. André que disponibilizou parte do seu tempo em meu auxílio.

Ao professor DR. José Octavio Jacomini, que me co-orientou em parte deste trabalho.... professor seus ensinamentos foram de suma importância para o desenvolvimento deste, a você o meu respeito e admiração.

Ao prof. DR. Juarez, coordenador do curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário do Triângulo – UNITRI e membro da diretoria do Laboratório de genética Biogenetics.... que disponibilizou o laboratório, equipamentos, técnicos e conhecimentos que muito contribuíram para a viabilização de parte dos experimentos aqui descritos.

Aos técnicos do setor de piscicultura do Parque do Sabiá.

Aos órgãos de fomento, CAPS, FAPEMIG e CNPq

À minha orientadora DRA. Sandra Morelli o meu muito obrigado

Aos meus técnicos de informática Felipe e Matheus Henrique.... meus filhos sem a ajuda de vocês certamente eu não teria digitado este trabalho.

E por último e de fundamental importância agradeço com carinho, amor e dedicação, a minha esposa Sueli das Graças Freitas Moreira pelo companheirismo, dedicação, incentivo, auxílio técnico... sem você este trabalho não seria concluído.

A todos vocês meu eterno reconhecimento

Roosevelt Gonçalves Moreira

SUMÁRIO

1	Apresentação.....	1
2	Capítulo 1 - Reprodução induzida e avaliação espermática do mandi-amarelo - <i>Pimelodus maculatus</i> – Pisces, Pimelodidae	3
2.2	- Resumo.....	3
2.3	Abstract	4
2.4	Introdução	5
2.5	Material e Métodos.....	8
2.5.1	Indução Hormonal	8
2.5.2	Avaliação da motilidade e do número de espermatozoides.....	11
2.6	Resultados e Discussão	13
2.6.1	Indução Hormonal	13
2.6.2	Avaliação da motilidade e do número de espermatozoides.....	15
2.7	Conclusões	20
3	Capítulo 2 - Comparações moleculares entres duas populações de <i>Pimelodus maculatus</i> (Siluriformes,Pimelodidae)	21
3.1	Resumo	21
3.2	Abstract	22
3.3	Introdução	23
3.4	Materiais e Métodos	25
3.5	Resultado e Discussão.....	28
3.6	Conclusão	31
4	Referências.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar adulto de <i>Pimelodus maculatus</i>	6
Figura 2: Tanques de confinamento de matrizes e reprodutores,	9
Figura 3: a) Extrusão dos Ovócitos b) Retirada dos Testículos de <i>Pimelodus maculatus</i>	11
Figura 4: Dimorfismo sexual.....	14
Figura 5: Relação entre peso da fêmea x peso ovócitos para <i>Pimelodus maculatus</i>	14
Figura 6: Relações métricas avaliadas.....	18
Figura 7: Previsão do número de espermatozoides	19
Figura 8 – Análise dos Clusters.....	29
Figura 9 – Análise do Gel de eletroforese	30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação do Sêmen pelo percentual de células vivas.....	7
Tabela 2 - Efeito do pH sobre o tempo de motilidade espermática.	16
Tabela 3 - Relações métricas analisadas em exemplares do Rio Araguari....	16
Tabela 4 - Correlação entre os parâmetros analisados (Motilidade em segundos, Comprimento do peixe em mm, Peso animal em gramas, Peso da gônada miligramas, Número de espermatozoides $\times 10^9/\text{mm}^3$	17
Tabela 5 - Programa utilizado para PCR em cágados	27
Tabela 6 - Matriz de distanciamento individual entre as espécimes dos rios Tijuco e Araguari	29

1 - APRESENTAÇÃO

Os peixes estão na base da evolução dos vertebrados, constituindo-se assim objeto de interesse para várias áreas do conhecimento como ecologia, etologia, farmacologia, bioquímica, evolução e genética.

Considerando sua estruturação esquelética, esses foram subdivididos em dois grandes grupos: os condricios, e os osteictios ou teleósteos. Estes apresentam a maior diversidade de espécies e também maior número de indivíduos por espécie. Adaptam-se às mais diversas condições, como lagos, zonas polares, fontes hidrotermais, charcos com elevada salinidade ou pobres em oxigênio.

A ictiofauna de água doce corresponde de 20% a 25% da biodiversidade de vertebrados e há evidências da ocorrência de mais de 5000 espécies somente na América do Sul, tendo em vista somente duas das muitas ordens: CHARACIFORMES e SILURIFORMES.

Com relação aos siluriformes, somente uma de suas famílias, a *Pimelodidae*, que corresponde aos bagres, compreende 2000 ou mais espécies, principalmente em águas tropicais, tanto doces como salgadas. Um dos componentes desta família que tem despertado o interesse de diversos pesquisadores é o mandi amarelo - *Pimelodus maculatus*, fato dado tanto pelas possibilidades comerciais como também pelas potencialidades de pesquisa básica e aplicada (piscicultura). É um animal reofílico que possui ampla distribuição em rios e reservatórios brasileiros.

A interferência antrópica sobre o ambiente natural dos peixes, muitas vezes é fator determinante na sobrevivência das espécies. Várias ações humanas como emissão de poluentes, devastação das matas ciliares, dragagem dos rios, introdução de espécies exóticas e a construção de barragens, podem ser citadas como exemplo que prejudicam sobremaneira o equilíbrio das espécies. Desta forma, a construção de barragens altera a dinâmica das populações e impede ou imprime mudanças no comportamento reprodutivo dos peixes, principalmente daqueles migradores ou reofílicos.

Numa tentativa de minimizar estes efeitos negativos tem-se adotado a construção de acessos adequados para a transposição das barragens pelos

animais, têm-se também incentivado o desenvolvimento de novas tecnologias que promovam a conservação e multiplicação de espécies nativas como a reprodução artificial através da indução hormonal ou hipofiseação.

Neste contexto, as pesquisas evoluem no sentido de propiciar maiores conhecimentos da biologia dos gametas e seu armazenamento, produção, estocagem, alimentação e manejo de alevinos, visando tanto o peixamento quanto a criação intensiva (piscicultura) de espécies que estejam ameaçadas pelas ações depredatórias do homem, quanto daquelas que despertem valor econômico.

Através das técnicas básicas de citogenética (coloração com giemsa, bandamento cromossômico, NOR e outros) já foi possível a caracterização cariotípica de muitas espécies de peixes neotropicais, mas se faz necessário a obtenção de informações mais minuciosas que possibilitem por exemplo o paralelismo inter ou intrapopulacional, que somente por intermédio das referidas técnicas não é possível, nestes casos utiliza-se tecnologias que permitam uma análise molecular, valendo-se assim dos marcadores genético-moleculares que são definidos como todo e qualquer fenótipo molecular descendente de um gene, recurso que pode também ser utilizado em relação a aspectos evolutivos e sua relação com a biogeografia.

Em geral os marcadores moleculares apresentam algumas vantagens sobre marcadores morfológicos, inclusive que são co-dominantes, contendo maior quantidade de informação gênica por loco e são obtidos através de duas principais metodologias: Hibridização e Amplificação de DNA.

Apesar de todos os estudos até então realizados estima-se que 30 a 40% da ictiofauna neotropical não tenha sido estudada, neste contexto o presente trabalho objetivou promover a indução hormonal, análise do sêmen considerando a motilidade espermática em diferentes valores de pH e efetuar estudos comparativos moleculares entre duas populações de mandi amarelo (*Pimelodus maculatus*).

2 - Capítulo 1 - Reprodução Induzida e Avaliação Espermática do Mandi-Amarelo - *Pimelodus maculatus* – Pisces, Pimelodidae

2.1 - Resumo

Muitas espécies de peixes neotropicais apresentam um comportamento de piracema, fato este que vem sendo profundamente afetado pela construção de barragens para produção de energia hidrelétrica. Tentando solucionar o problema, uma das opções é promover a reprodução artificial das referidas espécies. O sucesso da reprodução sexuada depende de muitos fatores, principalmente dos relacionados aos gametas e, no que se refere aos masculinos, destacam-se aspectos referentes ao sêmen, uma vez que dele depende a capacidade fecundante do espermatozoide. O presente trabalho teve por objetivo efetuar a indução hormonal do mandi-amarelo (*Pimelodus maculatus*), valendo-se de inoculações de extrato hipofisário e, também, verificar a influência de diferentes valores de pH sobre o tempo de motilidade do espermatozoide da espécie. Todos os animais apresentaram resposta positiva ao tratamento hormonal. A maturidade sexual permitiu a visualização de dimorfismo sexual. As variações de pH não interferiram significativamente na motilidade dos espermatozoides de *Pimelodus maculatus*.

Palavras-chave: Piracema, fertilização, motilidade, reprodução.

2.2 Abstract

Many species of Neotropical fish present behavior of “piracema”, fact this that comes being deeply affected for the construction of dams for hydroelectric plants. Trying to solve the problem, one of the options is to promote the reproduction artificial of the related species. The success of the sex reproduction depends on many factors, mainly the related ones to sperm cell and, as for the male, is distinguished referring aspects to the semen, a time that of it depends the fertilizing capacity on the spermatozoon. In this context the present work objectified to effect the hormonal induction of the mandi-yellow (*Pimelodus maculatus*) using itself the inoculations of pituitary extract and also to verify the influence of different values of pH on the time of motility of the spermatozoon of the related species. All the animals had positive reply to the hormonal treatment. The sex maturity allowed the visualization of sex dimorphism. The variations of pH had not significantly intervened with the motility of the spermatozoa of *Pimelodus maculatus*.

Keywords: Piracema, fertilizing, motility, reproduction.

2.3 Introdução

A ictiofauna de água doce corresponde de 20% a 25% da biodiversidade de vertebrados e há evidências da ocorrência de mais de 5000 espécies somente na América do Sul, considerando somente duas das muitas ordens: CHARACIFORMES e SILURIFORMES (SANTOS; FERREIRA, 1999).

Muitas espécies apresentam comportamento reofílico (piracema), aquele em que os animais nadam em direção às nascentes no período de reprodução. Esse comportamento tem sido comprometido em virtude da construção de usinas hidrelétricas que alteram os cursos hídricos e são desprovidas de acessos adequados à migração dos animais, dificultando sua reprodução (GODOY, 1998).

Instituições públicas e privadas incrementam o peixamento, sem um controle adequado da origem dos exemplares utilizados nessas solturas, em várias bacias. Dessa forma, a escassez de informações sobre as consequências ecológicas destas ações ou do material biológico empregado, conduz a erros, resultando em diminuição da variabilidade genética das populações (TOLEDO FILHO et al, 1992).

Uma segunda opção, e mais coerente sob o ponto de vista ecológico, consiste na reprodução artificial de espécies nativas, utilizando-se de técnicas de indução hormonal, as quais vêm sendo desenvolvidas desde a década de 1930, todas com objetivo de produzir abundantes quantidades de ovos, larvas e alevinos (FURTADO, 1995).

Os hormônios utilizados nestes processos podem ser hormônio folículo estimulante – FSH, hormônio luteinizante – LH, hormônio liberador – LRH entre outros. Os locais de indução destes também variam e essa é feita, preferencialmente na cavidade abdominal, abaixo da nadadeira peitoral ou anterior ao orifício genital (FURTADO, 1995).

O avanço nas tecnologias de reprodução proporcionou um aumento na exploração de inúmeras espécies exóticas como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e a carpa (*Cyprinus carpio*), e também de espécies nativas Characiformes como o curimba (*Prochilodus lineatus*) e piauí (*Leporinus friderici*) (LUDWIG et al, 2005).

Com relação aos Siluriformes, somente uma de suas várias famílias a Pimelodidae, que corresponde aos bagres, compreende 2400 ou mais espécies, tanto em águas doces como salgadas (NELSON, 1994). Um dos componentes desta família que tem despertado o interesse de diversos pesquisadores é o mandi amarelo – *Pimelodus maculatus* (Figura 1), não apenas pelas possibilidades comerciais como, também, pela potencialidade de pesquisa básica e aplicada (piscicultura).

Os machos atingem maturidade sexual com o comprimento variando de 12,5cm a 18cm e as fêmeas com 12cm a 19cm. Possui ampla distribuição em rios e reservatórios brasileiros, onde recebe diversos nomes regionais tais como: mandijuba, bagre – pintado, mandiú, manditinga, mandi-amarelo, entre outros (CEMIG & CETEC, 2000).

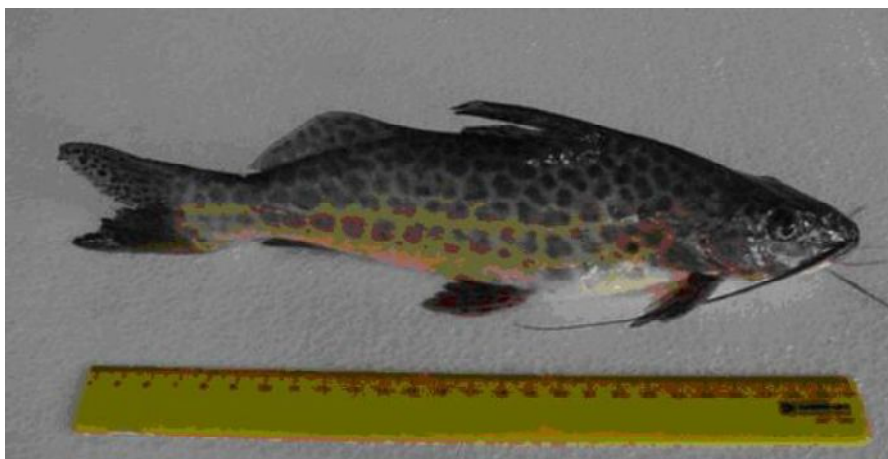


Figura 1: Exemplar adulto de *Pimelodus maculatus*.

Já foram desenvolvidos diversos trabalhos com reprodução artificial em peixes Siluriformes, dos quais se destacam a reprodução do surubim – *Pseudoplatystoma coruscans* (BRITO; BAZZOLI, 2003), reprodução e desova de mandis, *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (BAZZOLI et al, 1997), larvicultura de mandi-amarelo – *Pimelodus maculatus* (LUZ; ZANIBONI FILHO, 2002).

O sucesso da reprodução artificial depende de vários fatores relacionados ao sêmen como seus aspectos físicos e químicos, o volume que

varia de acordo com a espécie e, entre indivíduos da mesma espécie, a idade, a alimentação e o stress. (MIES FILHO, 1975)

Outro aspecto importante da análise do sêmen é a motilidade espermática, da qual depende da capacidade fecundante dos espermatozoides e este pode ser classificado em diferentes graus (Tabela 1) observando-se o percentual de células vivas (MIES FILHO, 1975).

Tabela 1: Classificação do Sêmen pelo percentual de células vivas segundo Mies- Filho, 1975

Grau	Percentual de Células Vivas
5	100 a 80
4	80 a 60
3	60 a 40
2	40 a 20
1	20 a 10

Nos teleósteos, o pH do líquido seminal exerce influência significativa na despolarização da membrana dos espermatozoides, iniciando a motilidade, sendo que alterações deste parâmetro afetam a maturação das células espermáticas (MANSOUR et al, 2005).

2.4 Material e Métodos

2.4.1 Indução Hormonal

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Reprodução da Estação de Piscicultura do Parque Ecológico do Sabiá (Uberlândia - MG - Bairro Tibery).

Para a indução hormonal, foram utilizados dois plantéis de matrizes e reprodutores, contendo cada um, 70 animais. O primeiro plantel foi capturado no ano de 2004, no Rio Grande (20°02'05" Sul e 48°13'08" Oeste), município de Conceição das Alagoas – MG e mantido em viveiros de alvenaria da hidrelétrica de Volta Grande no município de Conceição das Alagoas-MG e, posteriormente, transferidos para o setor de piscicultura do Parque do Sabiá.

O segundo plantel, composto também por 70 animais, foi capturado no ano de 2005, no Rio Araguari (48°14'20" Norte e 18°46'53" Sul) município de Uberlândia - MG. Devido à captura dos exemplares ter sido realizada em ambiente natural, não foi possível determinar a idade dos mesmos; porém, pelo tamanho dos mesmos, foi possível verificar que se tratavam de animais em idade reprodutiva.

Os animais dos dois plantéis foram mantidos isolados em viveiros com dimensões 10,4m de comprimento x 7,3m de largura x 1,1m de profundidade, localizado no setor de piscicultura do Parque do Sabiá, (Figura 2), onde receberam alimentação à base de ração comercial, utilizada para engorda de peixes.

Os peixes apresentaram máximo desenvolvimento gonadal entre os meses de outubro a março, sendo que este foi confirmado através de punção abdominal de algumas fêmeas capturadas, aleatoriamente, para retirada de amostra de ovócitos.



Figura 2: Tanques de confinamento de matrizes e reprodutores, no Parque do Sabiá.

As amostras foram obtidas com agulha 40 x 20mm conectada a uma cânula plástica tipo equipo hospitalar com diâmetro interno de 3mm, acoplada a uma seringa. A técnica utilizada foi a descrita por Bernardino et al. (1993).

Nos meses de dezembro 2004, janeiro 2005, dezembro 2005 e janeiro 2006 foram inoculados um total de 77 animais dos dois grupos separadamente, sendo 31 machos com peso variando entre 200g e 700g e 46 fêmeas, com peso entre 200g e 1300g.

As fêmeas selecionadas apresentavam o ventre abaulado e papila genital avermelhada. Os machos foram selecionados, aleatoriamente, não sendo possível a observação da fluidez do sêmen.

Os animais foram pesados em balança comum com precisão de cinco gramas. Para quantificar a dose de hipófise necessária à indução hormonal, empregou-se o método descrito por Woynarovich e Horváth (1983), utilizando-se hipófises desidratadas (com peso médio de 3µg) de carpa comum (*Cyprinus carpio*). A quantidade empregada para a indução das fêmeas, consistiu em 2 doses de 0,3µg e 3µg, respectivamente, de hipófises por quilo vivo maceradas e diluídas em soro fisiológico (solução de cloreto de sódio 0.9%), injetadas com seringa de vidro graduada, em intervalo de 10 horas entre as aplicações. Nos machos, aplicou-se 1,5µg por kg de peso vivo em dose única, ao tempo da segunda aplicação nas fêmeas, ressaltando que as inoculações ocorreram na base da nadadeira peitoral.

Os reprodutores e matrizes foram mantidos juntos em tanques de contenção (1,5 x 0,6 x 0,6m) no interior do laboratório de reprodução da Estação de Piscicultura do Parque do Sabiá, em grupos de 5 exemplares. Sobre a superfície da água colocou-se placas de isopor de 40 x 60 cm para abrigo dos animais. A temperatura da água foi mantida em 26° com renovação constante, utilizando bomba de aquário e aquecedor.

Sêmen e ovócitos foram obtidos, em média, 8 horas após a aplicação da segunda dose de hipófises nas fêmeas. A extrusão dos gametas femininos (Figura 3a) foi obtida com a mesma técnica empregada para outras espécies, por leve compressão do ventre no sentido antero-caudal, sendo os ovócitos recolhidos a seco (sem contato com água) em vasilha de plástico. Para a coleta do sêmen os animais foram inicialmente introduzidos em aquário contendo benzocaína diluída em água objetivando anestesiá-los, posteriormente, sacrificando-os, através de incisão ventral seguida de cardiectomia.

Os testículos foram removidos e macerados (Figura 3b). Após a coleta do sêmen antes da fecundação, observou-se a motilidade dos espermatozoides em microscópio óptico comum, com aumento de 300x.

A análise da motilidade espermática foi verificada adicionando-se em uma lâmina de microscopia uma gota de sêmen acrescida de uma gota de água comum circulante na estação de piscicultura e, posteriormente em outra lâmina, uma gota de sêmen acrescida de uma gota de solução fertilizante (4,0g de NaCl, 3,0g de ureia diluídos em um litro de água).

Ovócitos e sêmen foram colocados juntos em 46 réplicas. A fecundação foi realizada a seco, utilizando-se uma pena de ave para mistura, seguidos da adição de solução fertilizante objetivando aumento do tempo de motilidade espermática proposta por Woynarovich e Horváth (1983). Também foi testada a fecundação, empregando-se apenas água para ativação dos espermatozoides e hidratação dos ovos, o que foi acompanhado com exames em microscópio óptico.

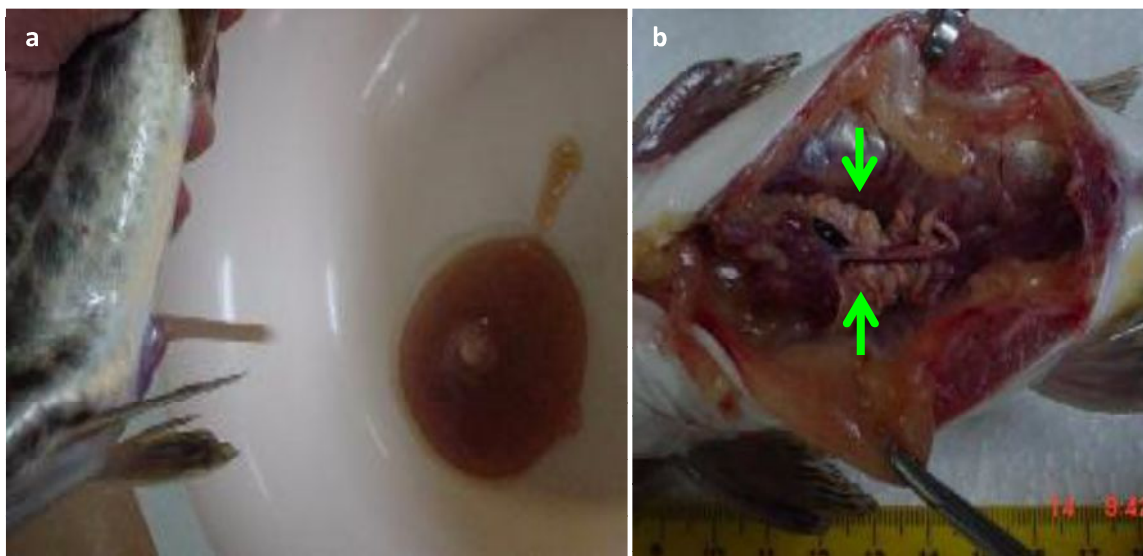


Figura 3: a) Extrusão dos Ovócitos b) Retirada dos Testículos de *Pimelodus maculatus* (as setas indicam os testículos).

2.4.2 Avaliação da motilidade e do número de espermatozoides

O experimento foi realizado em janeiro de 2006 no Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal de Uberlândia – campus Umuarama. Foram utilizados dez animais previamente inoculados com extrato hipofisário de carpa (*Ciprinus carpio*) - 1,5µg por kg de peso vivo - adotando-se a técnica descrita por Moraes-Filho & Schubart (1955). Os animais utilizados foram retirados ao acaso do segundo plantel de matrizes e reprodutores, capturados no leito do Rio Araguari (48°14'20" Norte e 18°46'53" Sul).

Os peixes foram sacrificados, individualmente, com água gelada e em seguida, foi feita a medição e pesagem dos mesmos. Após a retirada das gônadas, procedeu-se à pesagem do material testicular e maceração em soro fisiológico.

Foram obtidas soluções de ácido sulfúrico (concentração 0,2 molar) com pHs 4,0 e 6,0 e solução de bicarbonato de sódio com pH 8,0. Em seguida preparou-se três lâminas distintas, enumeradas 1, 2 e 3, cada uma contendo uma gota de sêmen diluído em soro fisiológico sendo às mesmas adicionado as soluções acima citadas, da seguinte forma: lâmina 1: solução com pH 4,0, lâmina 2: solução com pH 6,0 e lâmina 3: solução com pH 8,0.

Utilizou-se uma micropipeta para cada amostra submetida aos testes de pH. Avaliou-se a motilidade celular em microscópio óptico para cada uma das condições, testadas, utilizando-se a técnica descrita por Ferreira et al. (2001).

Para a contagem dos espermatozoides, um volume de 0,001 ml de sêmen foi diluído em 1 ml de solução de formol citrato (citrato de sódio 2,9 gramas, água destilada 100 ml, solução comercial formaldeído 35%). Uma alíquota dessa solução foi retirada e colocada em câmara de Neubauer, onde o número de espermatozoides por ml foi obtido (MILIORINI et al, 2002) (MURGAS et al, 2002). Para a análise estatística dos resultados utilizou-se o programa Systat Version 5,0.

O número de espermatozoides pode ser explicado pela interação existente entre a correlação do peso e comprimento do animal e peso da gônada, onde r múltiplo = 0,89 e r quadrático = 0,792, ajustados pela equação de regressão:

$$Y = - 58.882 - 1678 * x_1 + 15.197 * x_2 + 512.120 * x_3$$

Em que x_1 = peso do animal (g); x_2 = comprimento do animal (cm); x_3 = peso da gônada (g), y = número estimado de espermatozoides.

2.5 Resultados e Discussão

2.5.1 Indução Hormonal

Os peixes mantidos em cativeiro iniciaram seu período reprodutivo a partir de outubro, encerrando esse processo no mês de março, fato observado pelo abaulamento abdominal das fêmeas, seguido de punções e retirada de amostras investigativas de ovócitos, coincidindo com observações feitas em pesquisas realizadas por Godinho et al. (1999) em trabalhos com *Pimelodus maculatus* capturados na Represa de Miranda (Rio Araguari) e também no reservatório da Usina de Furnas (Rio Paranaíba - Tupaciguara /Itumbiara).

Os espermatozoides, em contato com a água, exibiram motilidade por um período de 25 segundos e em solução fertilizante esta aumentou para 2 minutos. O aumento do período de motilidade ocorreu em virtude da ionização do sal (NaCl) em água, liberando íons de sódio e cloreto, alterando as concentrações extra e intracelulares. De acordo com Lahnsteiner et al. (2004), esse processo intervém no metabolismo energético dos espermatozoides, promovendo, assim, um prolongamento no período de motilidade. Severi (2001) também verificou um tempo maior de motilidade espermática em condições de maior salinidade e o período reprodutivo nos meses de outubro a março para a espécie em estudo.

Destaca-se que inicialmente uma amostra do sêmen de cada animal foi colocada em água pura, objetivando observar se a utilização do gelo influenciaria ou não na motilidade espermática, sendo constatado que não houve influência.

Durante o período reprodutivo os animais exibiram dimorfismo sexual, caracterizado nas fêmeas por diferenças no abaulamento abdominal, devido ao desenvolvimento dos ovários, cuja produção de ovócitos representa 16% do peso vivo (Figuras 4, 5 e 6). Os machos, potencialmente reprodutores, exibem a papila genital evidente (Figura 4).

No período de outubro a março, observa-se elevação da turbidez e da temperatura da água, ficando em torno de 24°C. Estas condições ambientais

fazem parte do conjunto de fatores, que estimulam o hipotálamo, desencadeando os efeitos metabólicos da reprodução (BAZZOLI et al, 1997).

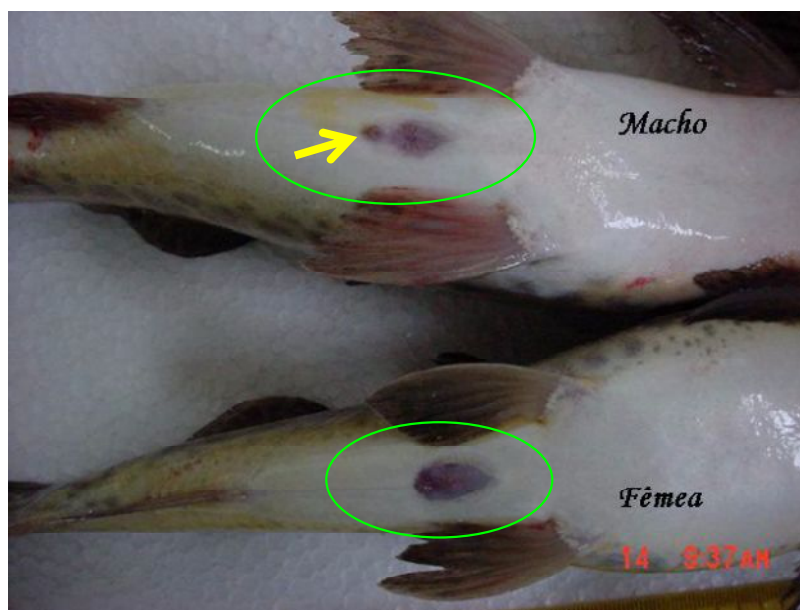


Figura 4: Dimorfismo sexual, a seta indica a papila genital no macho.

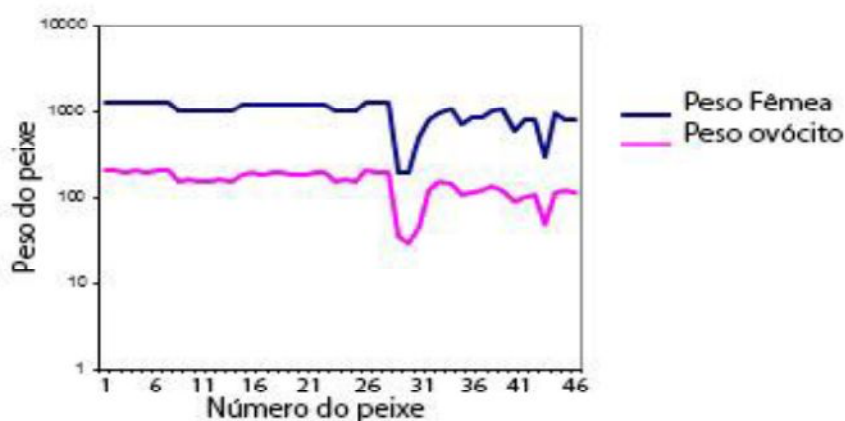


Figura 5: Relação entre peso da fêmea x peso ovócitos para *Pimelodus maculatus*.

Algumas fêmeas foram utilizadas para se determinar o momento adequado para a hipofiseação, efetuando-se punções abdominais nas mesmas e obtendo-se amostras de ovócitos destinados a análise microscópica do estágio de desenvolvimento.

A avaliação da migração dos núcleos dos ovócitos (central, intermediário e periférico) foi eficaz para determinar os vários estágios de maturação dos

mesmos, em concordância com o descrito por Bazzoli et al (1997) e Bazzoli (2002). A indução hormonal foi realizada quando a soma dos núcleos, em estágio de migração e periférico era inferior a 60%.

Todos os animais responderam positivamente à indução hormonal, dado que contribui favoravelmente na condução de trabalhos para produção de alevinos desta espécie. O uso da solução fertilizante, além de aumentar o tempo de motilidade espermática, propicia desagregação dos ovócitos. Esta solução não foi aplicada em todas as tentativas, sendo também, testadas a água da estação e o soro fisiológico como alternativas.

Os resultados observados são concordantes integralmente com os citados por Severi (2001) em estudos do desenvolvimento larvário do *Pimelodus maculatus* a saber: o período reprodutivo ocorre de outubro a março, os ovos não são aderentes e apresentam alto potencial de hidratação.

2.5.2 Avaliação da motilidade e do número de espermatozoides

Os dados obtidos encontram-se nas Tabelas 2, 3 e 4. As variações de pH propostas neste experimento não influenciaram a motilidade dos espermatozoides de *Pimelodus maculatus*, fato também observado por Lahnsteiner et al. (2004) em sêmen de *Acipenser ruthenus*. Nesta espécie, ao contrário, Hadi Alavie Cosson (2005) observaram que variações de pH e osmolaridade do meio podem despolarizar a membrana dos espermatozoides, interferindo assim na motilidade dos mesmos.

A osmolaridade e o pH do meio são cruciais e pré-requisitos, pois podem despolarizar a membrana das células espermáticas. No esturjão (*Acipenser persicus*) as atividades espermáticas máximas e mínimas ocorrem respectivamente nos valores 8,0 e 6,0 de pH, sendo que esta motilidade decresce quando o sêmen é mantido em pH abaixo de 7,5 (SAYYED et al, 2005).

Em estudos biológicos de sêmen e criopreservação dos espermatozoides feitos com *Acipenser ruthenus*, observou-se que variações de pH entre 7,0 e 9,0 não promovem alterações na motilidade espermática,

mas na presença de magnésio há um prolongamento no período de motilidade (LAHNSTEINER et al, 2004).

Em truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), a concentração de CO₂ e o pH do meio afetam a motilidade espermática, pois alteram a atividade enzimática na permeabilidade da membrana celular (WOOLSEY e INGERMANN, 2004).

Tabela 2: Efeito do pH sobre o tempo de motilidade espermática.

Animal	Tempo em segundos de motilidade espermática		
	pH 4,0	pH 6,0	pH 8,0
1	37,5	31,0	33,0
2	27,0	31,0	33,0
3	27,0	26,0	28,5
4	25,0	23,5	27,5
5	20,0	21,5	21,0
6	32,5	31,0	30,0
7	29,0	32,5	27,5
8	30,0	30,5	29,0
9	29,0	25,5	26,5
10	26,5	26,0	25,0

Tabela 3: Relações métricas analisadas em exemplares do Rio Araguari.

Animal	Peso corporal (g)	Peso da gônada (mg)	No de espermatozoides (10 ⁹ /mm ³)	Comprimento do animal (mm)
2	273	620	271	300
6	268	560	253	290
1	250	530	165	290
3	239	430	220	290

9	169	390	208	230
8	188	380	240	265
10	252	380	119	265
4	226	340	118	270
7	224	240	119	280
5	208	210	106	265

Tabela 4: Correlação entre os parâmetros analisados (Motilidade em segundos, Comprimento do peixe em mm, Peso animal em gramas, Peso da gônada miligramas , Número de espermatozoides $\times 10^9/\text{mm}^3$).

	pH	Motilidade	Comprimento	Peso animal	Peso gônada
Motilidade	-0.075				
Comprimento	-0.024	0.351			
Peso animal	-0.025	0.274	0.859		
Peso gônada	-0.031	0.486	0.555	0.639	
Nº espermato-zoides	-0.028	0.329	0.287	0.192	0.745

Segundo WOOSLEY e INGERMANN (2004) variações de pH e na concentração de CO_2 do meio, podem alterar a atividade enzimática ao nível da membrana plasmática dos espermatozoides que afetam, consequentemente, a motilidade dos mesmos. De acordo com esses autores, variações de pH alteram também a atividade de enzimas ATPásicas, sendo que o pH ótimo para ação das mesmas estaria entre 7.0 e 7.5. Nestes valores de pH, as células espermáticas deveriam apresentar a sua maior atividade. Entretanto, os resultados do presente trabalho não revelaram influência das alterações de pH no padrão da motilidade e nem no tempo da mesma.

Dentre os parâmetros analisados, todos apresentaram baixa correlação, embora seja relevante ressaltar que correlação entre motilidade e peso da

gônada tenha sido mais expressiva e tal dado permite inferir que gônadas maiores são mais maduras e conseqüentemente produzem maior quantidade de hormônios androgênicos, os quais influenciam a atividade espermática. Este dado também pode ser observado em outros grupos de vertebrados, como em bovinos, suínos e equinos (HAFEZ; HAFEZ, 2004).

A correlação motilidade e comprimento do animal também se apresentou baixa, ou seja, percebe-se que animais menores também podem produzir gametas com motilidade satisfatória para garantir sua capacidade fecundante e variabilidade genética intrapopulacional.

O peso da gônada apresenta relação direta com o número de espermatozoides (Figura 6) ou seja, gônadas maiores e mais pesadas ocorrem em animais com maturidade sexual mais avançada e, conseqüentemente, mais aptos a produzir maior número de espermatozoides, proporcionando-lhes maior capacidade reprodutiva (MIES FILHO, 1975).

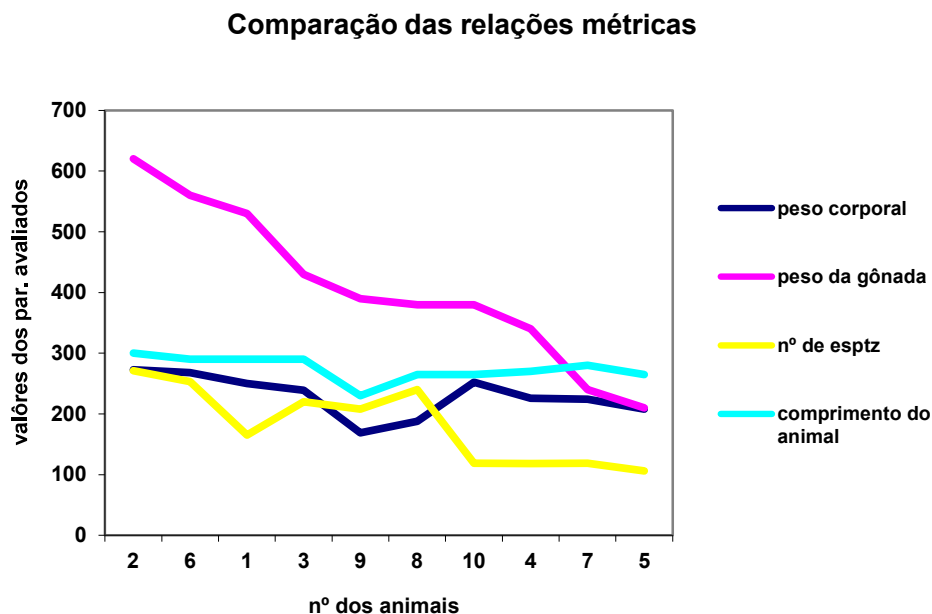


Figura 6: Relações métricas avaliadas. Peso do animal em gramas, peso da gônada em miligramas, comprimento do animal em milímetros e número de espermatozoides $\times 10^9/\text{mm}^3$.

O número médio de espermatozoides por mm^3 de sêmen foi $1,8 \times 10^9$, evidenciando um grande potencial reprodutivo, dado concordante com a classificação proposta por MIES FILHO (1975).

A densidade é dada pelo número de espermatozoides por milímetro cúbico de líquido espermático e a concentração pode ser avaliada, analisando-se os espaços intercelulares. A densidade do sêmen é considerada densa ou muito densa quando não há espaço entre as células; semi-denso, com pequenos espaços entre as células e ralo quando os espaços intercelulares são amplos, sendo o sêmen do *Pimelodus maculatus*, estudado no presente trabalho, classificado como denso, de acordo com os aspectos anteriormente expostos por MIES FILHO (1975).

Os parâmetros peso, comprimento do animal e peso da gônada são importantes de serem avaliados. As correlações existentes entre o peso do animal e o peso da gônada (0,639); peso da gônada e número de espermatozoides (0,745) pode ser utilizado na previsão do potencial de produção de células espermáticas.

Com relação ao número de espermatozoides, a figura 7 representa graficamente a relação existente entre as variáveis estudadas e os dados observados.

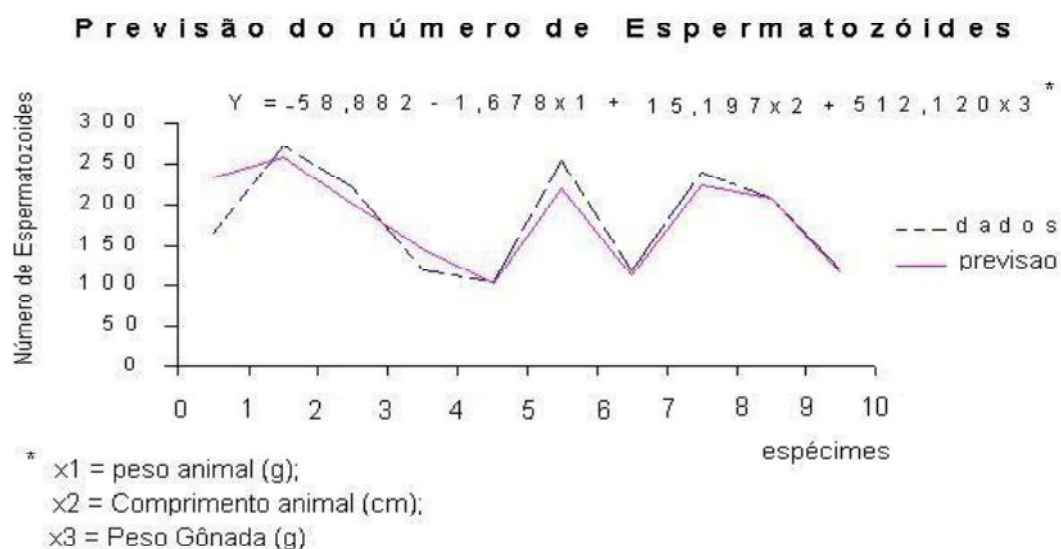


Figura 7: Previsão do número de espermatozoides $\times 10^9/\text{mm}^3$ de sêmen em função do peso e do comprimento do animal e peso da gônada.

A correlação positiva entre os parâmetros: comprimento e peso do animal (0,859), comprimento do animal e peso da gônada (0,524), peso do animal e peso da gônada (0,617), peso da gônada e número de espermatozoides (0,766) reforçam a potencialidade reprodutiva e comercial da espécie, merecendo assim estudos futuros de sua viabilidade para a piscicultura.

2.6 Conclusões

Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que a espécie *P. maculatus* apresenta viabilidade para sua inclusão nas práticas de piscicultura comercial em virtude da elevada produção de ovócitos e espermatozoides.

Trata-se de excelente material para manejo e biopreservação de gametas, o que garantirá no presente e no futuro a produção de alevinos destinados ao repovoamento de cursos hídricos onde ocorre declínio desta espécie como já ocorre para outros Siluriformes.

Pela não influência das variações de pH na motilidade espermática dessa espécie, conclui-se, também, que se trata de uma espécie altamente adaptável a diferentes ambientes, o que é comprovado pela sua ampla distribuição.

3 - Capítulo 2 - Comparações Moleculares Entre Duas Populações de *Pimelodus maculatus* (Siluriformes, Pimelodidae)

3.1 Resumo

Através da obtenção de dados moleculares, é possível uma interpretação mais ampla na organização da filogenia de espécie. O presente trabalho, utilizando marcador RAPD, revelou maior homogeneidade das populações, e também um distanciamento genético interpopulacional. Marcadores moleculares podem revelar níveis de parentesco e assim auxiliar programas de criação em cativeiro de espécies raras e ameaçadas. No campo da biologia pesqueira, marcadores moleculares têm sido amplamente empregados na identificação e caracterização de estoques populacionais em exploração.

Palavras-chave: Filogenia, marcador RAPD, distanciamento, interpopulacional.

3.2 Abstract

Through the getting of molecular data, it is possible one wider interpretation in the organization of the specie's phylogeny. The present study, using RAPD markers, revealed more homogeneity of the populations, and also one genetic distancing interpopulation. Molecular markers can reveal levels of kinship then helping the creation of captivity of rare and endangered species. In the field of fishing biology, molecular markers has been widely used on identification and characterization of population stocks in exploration.

Keywords: phylogeny, RAPD markers, distancing, interpopulation.

3.3 Introdução

Os marcadores do tipo restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) e amplified fragment length polymorphism (AFLP) foram os marcadores de DNA mais utilizados nas décadas de 80 e 90, sendo ainda aplicados para alguns estudos genéticos. Esses marcadores foram responsáveis pelo desenvolvimento dos primeiros mapas genéticos de muitas espécies sendo capazes de fornecer um número praticamente ilimitado de polimorfismos distribuídos aleatoriamente ao longo de todo o genoma, de forma automatizada e a custos cada vez mais reduzidos, possibilitando o estudo da variabilidade intra e interpopulacional (GUIMARÃES et al., 2009; WILLIAMS et al., 1990; WELSH; MCCLELLAND, 1990).

O conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie é uma etapa importante para o planejamento e o sucesso de programas de conservação *in situ* e de repovoamento. Para isso, deve-se levar em conta se uma espécie está distribuída como uma ou mais populações geneticamente diferentes, qual o grau de distanciamento entre elas e o grau de interação (HILSDORF, 2013).

No caso de peixes de água doce, suas populações em geral se distribuem por locais isolados, o que pode minimizar o fluxo genético entre elas, levando a processos de diferenciação genética (WRIGHT, 1978). Estudos com marcadores bioquímicos e moleculares são importantes para o manejo de populações selvagens e em cativeiro, pois permitem evidenciar o grau de isolamento de uma população, além da avaliação e caracterização dos recursos genéticos do país (JARAMILLO; BAENA, 2000) (HILSDORF, 2013) (HOLTSMARK et al., 2008).

Em virtude do pequeno volume de informações precisas sobre a totalidade da ictiofauna de água doce neotropical, trabalhos com diversos grupos envolvendo marcadores moleculares estão sendo desenvolvidos (DERGAM et al., 2002) (MATOSO et al., 2004) (TORRES et al., 2004). Marcadores RAPD em populações de *Astyanax altiparanae* do rio Paranapanema revelaram diferenças na estrutura genética das mesmas (LEUZZI et al., 2004), ao contrário do que ocorreu em populações de *Pimelodus maculatus* dos rios Tiete e Paranapanema,

em que ALMEIDA et al (2003) observaram a inexistência de diferenças entre os representantes do rio Tiete, porém constataram diferenciações entre as amostras do rio Paranapanema.

Pimelodus maculatus trata-se de uma espécie migradora abundante em rios e reservatórios (AGOSTINHO et al., 2003). Essa espécie possui características que permitem um bom ajuste para diferentes condições ambientais, em diferentes locais de sua distribuição geográfica natural, devido sua grande plasticidade alimentar e comportamento oportunista, o que pode garantir exploração de todos os níveis tróficos dos ecossistemas aquáticos RAMOS et al. (2011), contudo é a mais afetada em usinas hidrelétricas (ANDRADE et al., 2012). Relata-se que em 9 das 16 usinas mais potentes da Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG), *P. maculatus* é a espécie mais abundante durante manutenção de turbinas, tal fato tem sido observado também em outras barragens no Brasil (ANDRADE et al, 2012).

Em virtude de no Triângulo Mineiro encontrarem-se importantes rios, não só por seu volume hídrico como também pela variedade de habitats e grande diversidade da ictiofauna, o presente trabalho teve por objetivo fazer o estudo comparativo de duas populações do *Pimelodus maculatus* (Pisces, Pimelodus) oriundas do rio Tijuco (19°03'29" sul e 48°35'37" oeste), localizado no município de Prata-MG; e do rio Araguari (18°46'53" sul e 48°14'20" oeste), no município de Uberlândia-MG e ambos pertencentes à bacia do rio Paranaíba ,utilizando técnicas de biologia molecular (marcadores RAPD).

3.4 Materiais e Métodos

Foram analisadas amostras de duas populações de *Pimelodus maculatus*, oriundas dos rios Tijuco, localizada no triângulo mineiro, entre as coordenadas geográficas 18° 40' sul e 47° 53' a 50° 13' oeste, e Araguari, que situa-se entre as coordenadas geográficas 18° 46' sul e 48° 14' oeste. Tais amostras foram coletadas entre os meses de agosto e outubro do ano de 2006. Foram coletados dez exemplares de cada população utilizando isca natural (minhoca) e anzol. Foram colhidas de cada espécime fragmentos (15 gramas) de musculatura da cauda e nadadeira peitoral que foram armazenadas em tubos eppendorfs (1,5 ml) à – 20°C (freezer) até o momento da extração do ADN.

A extração de ADN foi realizada conforme Miller et al (1988), com modificações, pois a extração foi procedida a partir de fragmentos de músculo. Foi adicionado 500µL de Tampão de Lise de Núcleo (TLN), 20µL de Duodecil sulfato de sódio (SDS 10%), 40µL de Proteinase K (PK 10mg/mL) ao eppendorf contendo 15 gramas de fragmentos a serem analisados, após homogeneizada a mistura foi incubada em banho-maria a 60°C por no mínimo 3 horas. Acrescentou-se 350µL de Fenol, 336 µL de clorofórmio e 14 µL de álcool isoamilico foi homogeneizado e mantido em temperatura ambiente por quinze minutos, depois foi centrifugado a 10.000 rpm por 15min., e o sobrenadante transferido para outro tubo, onde acrescentou-se 600µL de etanol 100%, e novamente centrifugado a 10.000 rpm por 10min. O sobrenadante foi descartado, e ao tubo adicionado 350µL de etanol 70%, este foi centrifugado a 10.000 rpm por 5min. O sobrenadante foi descartado, e o *pellet* diluído em água ultra pura.

O volume final da reação foi de 25 µL com os seguintes componentes: 3µL de DNA, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, tampão da taq 1x, 1U de Taq polimerase e 1,5mM de primer.

As amostras de ADN foram amplificadas por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em um termociclador “PTC-100 Peltier Thermal Cycler”, utilizando os *primers* do Kit pharmacia (Operon), indicados na aplicação da técnica RAPD; conforme o programa descrito na **Tabela 5**. Foram testados 41 primers conforme **quadro 1**.

Após amplificação, 12 µL de cada amostra foi aplicada em gel de poli(acrilamida (acrilamida 30%, TBE 5X e uréia), e corado pela técnica de prata, e gel de agarose (D-1 Agarose LE-Bio American Inc 2,5%), corado com brometo de ecídio (3µg/ml) . A corrida da eletroforese foi realizada em tampão TBE 0,5x (Tris, Ácido Bórico e EDTA), por quatorze horas a 67 v. Para visualização em gel de agarose foram aplicadas tais amostras no interior das canaletas do gel e logo após adicionou-se tampão. A voltagem foi 80V e duas horas foi o tempo de corrida. Os fragmentos foram visualizados com o auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com um aparato POLAROID.

Os produtos amplificados foram avaliados pela presença ou ausência de bandas, sendo que o índice “1” foi dado à presença, e o índice “0” para a ausência. Foram feitas análises de “*cluster*” a partir de uma matriz de distâncias gerada por Percentual de Desacordo, e pela lei de agrupamento Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Averages (UPGMA) através do programa STATISTICA (tabela 4). Esta análise transforma um grupo heterogêneo de dados, em grupos que evidenciam aspectos da divergência genética obtida pelo percentual de desacordo na matriz de dissimilaridades.

Quadro 1: *Primers* testados com a finalidade de obtenção do padrão de bandas polimórficas para a determinação do cladograma.

Primers		
TOXOA-48	MY11KG	
	GCNCAAGGHCAAYA AYAATGG	HPV31A
PSMI-2	MY11-BGA	
	GCNCARGGHCAAYA ATAATGG	AGT1RRG5
MYRL1-33 ^a	FESR	HPV-51A TTTTTTACAAATCGAT AGGC
	MY09G3	MY11-G3
PSMO-2	CGACCCARBGSRRAA YTGGTC	GCBCAGGGHYWHAA CAATGG
MY09GK	MYRL1-16A	AGT1RF-F8
MY09-BGO	MYG11-1	PSMI-1
HPVMY09	MYRL1-58A	HPV-67 ^a

CGACCYAAHGGAAC		
TCATC		
PSMO-1	MYRL1-45S	HPV-31 ^a
MY11BGB	MYG11-2	MYG-09B
GCNCRGGGHCAHAAC	GCTCAGGGMCAAA	CGTCCMARRGGAWA
AATGG	TAATGG	CTGATG
MYRL1-31S	D4FBA-AS	CCRS-BE5
	MY09G5	
MYG09A	CKSCCWAGWGGAA	HPV-51S
	AYTGATC	
MY09G2	MYG11-3	TOXO S-69
FESF	MY09-G1	MY09EGB
MY09-BGC	MYCIA-B4	

Tabela 5: Programa utilizado para PCR em cágados

Passo	Temperatura	Tempo
1	95°C	3 min
2	94°C	50 seg
3	52°C	50 seg
4	72°C	1 min
5	Voltar ao passo 2, 34 vezes	
10	72°C	5 min
11	4°C	10 min

3.5 Resultado e Discussão

Dos 41 primers utilizados 07 apresentaram ampliações suficientes, entretanto foram lidos 05 que geraram 25 bandas informativas (polimórficas e monomórficas). Foi possível gerar dois “clusters” (*Cluster* 01-população do rio Araguari e *Cluster* 02-população do rio Tijuco), onde os indivíduos dessas populações se separaram completamente, sendo possível diferenciar as duas populações com facilidade. A distância genética entre os dois grupos foi de 59%. A distância entre os indivíduos do mesmo grupo não ultrapassou os 12%. O *cluster* 01 dividiu-se em três grupos: a = (ara20, ara15, ara14); b= (ara18, ara16 e ara19) e c= (ara17, ara11 e ara12). O grupo “a” tem uma distância 8% quando comparado com o grupo “b” e 7% entre o grupo “c”. A distância entre os grupos “a+b” e c foi igual a 13%. Um fato que chama a atenção é a distância zero entre os indivíduos ara20 e ara15; ara18, ara16 e ara13. O cluster 02 formou dois grupos, sendo: d = (tej10, tej9 e tej5); e= (tej7, tej8, tej6, tej4, tej3, tej2 e tej1). A distância entre os dois grupos foi igual a 13%. Os pares tej6 e 8; tej3 e 4; tej1 e 2 tiveram distâncias iguais a zero. As distâncias iguais a zero encontradas sugerem que estes indivíduos são parentes próximos e desta forma a distância não foi detectada pela técnica aplicada (RAPD).

As maiores distâncias individuais ocorreram entre ara10 e tej13 e tej14 (68%). Em média a distância entre os indivíduos dos *clustes* 01 e 02 foi de 60%. Apesar do *cluster* formado pelos indivíduos do rio Tijuco se mostrar mais homogêneo, pois foram formados apenas dois grupos com maior número de indivíduos com zero de distância registrou-se uma distância de 20% entre o indivíduo tej10 e indivíduos tej3 e 4. Esta distância (20%) foi a maior encontrada conforme matriz de distâncias individuais.

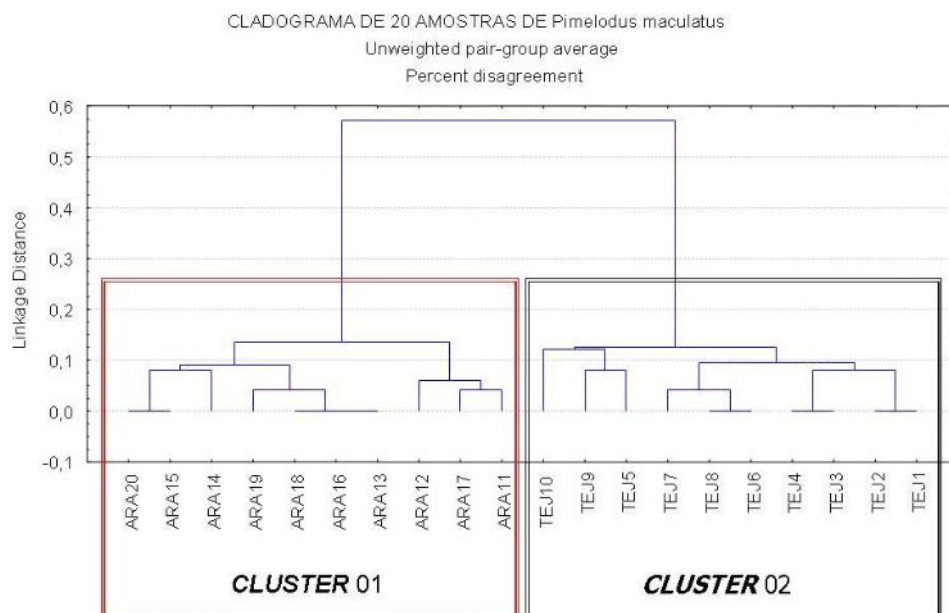
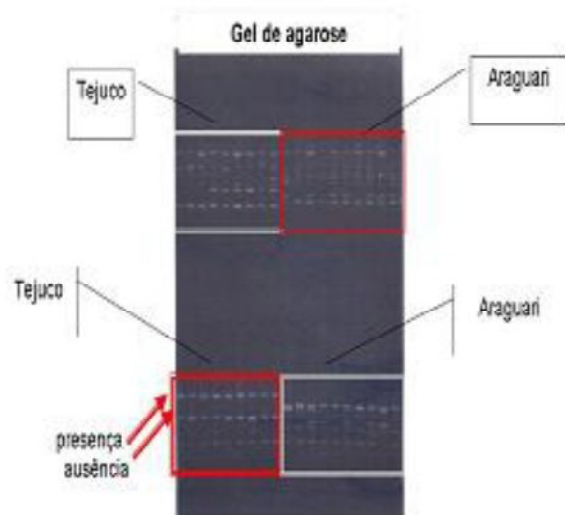


Figura 8 – Análise dos Clusters

Tabela 6- Matriz de distanciamento individual entre as espécimes dos rios Tijuco e Araguari

	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	TEJ	ARA	ARA	ARA	ARA	ARA	ARA	ARA	ARA	ARA	ARA
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TEJ01	0,00																			
TEJ02	0,00	0,00																		
TEJ03	0,08	8,00	0,00																	
TEJ04	0,08	0,08	0,00	0,00																
TEJ05	0,12	0,12	0,12	0,12	0,00															
TEJ06	0,08	0,08	0,08	0,08	0,12	0,00														
TEJ07	0,12	0,12	0,12	0,12	0,08	0,04	0,00													
TEJ08	0,08	0,08	0,08	0,08	0,12	0,00	0,04	0,00												
TEJ09	0,12	0,12	0,12	0,12	0,08	0,12	0,16	0,12	0,00											
TEJ10	0,12	0,12	0,20	0,20	0,08	0,12	0,08	0,12	0,16	0,00										
ARA 11	0,60	0,60	0,52	0,52	0,56	0,60	0,56	0,60	0,64	0,56	0,00									
ARA 12	0,60	0,60	0,52	0,52	0,56	0,60	0,56	0,60	0,64	0,56	0,08	0,00								
ARA 13	0,64	0,64	0,56	0,56	0,60	0,64	0,60	0,64	0,68	0,60	0,12	0,12	0,00							
ARA 14	0,56	0,56	0,48	0,48	0,52	0,56	0,52	0,56	0,60	0,52	0,20	0,12	0,08	0,00						
ARA 15	0,56	0,56	0,48	0,48	0,52	0,56	0,52	0,56	0,60	0,52	0,12	0,12	0,08	8,00	0,00					
ARA 16	0,64	0,64	0,56	0,56	0,60	0,64	0,60	0,64	0,68	0,60	0,12	0,12	0,00	0,08	0,08	0,00				
ARA 17	0,56	0,56	0,48	0,48	0,52	0,56	0,52	0,56	0,60	0,52	0,04	0,04	0,16	0,16	0,16	0,16	0,00			
ARA 18	0,64	0,64	0,56	0,56	0,60	0,64	0,60	0,64	0,68	0,60	0,12	0,12	0,00	0,08	0,08	0,00	0,16	0,00		
ARA 19	0,60	0,60	0,52	0,52	0,56	0,60	0,56	0,60	0,64	0,56	0,08	0,16	0,04	0,12	0,12	0,04	0,12	0,04	0,00	
ARA 20	0,56	0,56	0,48	0,48	0,52	0,56	0,52	0,56	0,60	0,52	0,12	0,12	0,08	0,08	0,00	0,08	0,16	0,00	0,12	0,00

Análise do RAPD



Marcador genético

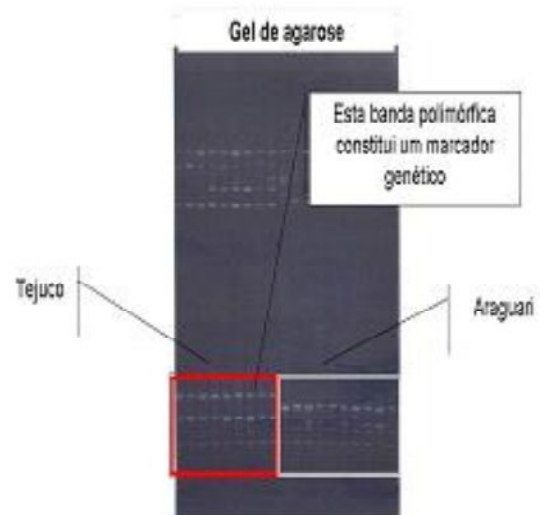


Figura 9 – Análise do Gel de eletroforese

3.6 Conclusão

Através da análise dos dados, conclui-se que a técnica RAPD foi suficiente na diferenciação genética das duas populações em questão (rio Araguari e rio Tijuco). Além disso, foram encontradas bandas polimórficas que representam marcadores moleculares os quais também diferenciam as populações, através de uma reação em cadeia de polimerase utilizando primers longos e uma reação específica.

Foi encontrado que a população do rio Tijuco (cluster 02) apresentou-se mais homogênea apesar de existir dois indivíduos com distâncias acima das encontradas na população do rio Araguari, e que a distância dentro de cada cluster foi pequena, entretanto a distância entre os dois clusters (60%) é suficiente para afirmarmos que se tratam de duas populações bem diferentes, evidenciando o isolamento interpopulacional.

4 - Referências

Agostinho, A. A., L. C. Gomes, H. I. Suzuki & H. F. Júlio JR. 2003. Migratory fish of the upper Paraná River Basin, Brazil. Pp. 19-98. In: Carolsfeld, J., B. Harvey, A. Baer & C. Ross. (Eds.). **Migratory Fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Victoria, World Fisheries Trust, 372p.

ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genet. Mol. Biol.**, vol.26, no.3, p.301-305, 2003.

Andrade, F., I. G. Prado, R. C. Loures & A. L. Godinho. 2012. Evaluation of techniques used to protect tailrace fishes during turbine maneuvers at Três Marias Dam, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 10(4): 723-730.

BAZZOLI, N.; CANGUSSU, L.C.V.; RIZZO, E.; SANTOS, G.B. Reprodução e desova de mandis *Pimelodus maculatus* e *Iheringichthys labrosus* (Pisces, Pimelodidae) nos reservatórios de Furnas, Marimbondo e Itumbiara. **Bios, Cadernos do Departamento de Ciências Biológicas da PUC Minas** n.5, p.7-15, 1997.

BAZZOLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial do rio São Francisco na região de Pirapora. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (Eds). **Águas, peixes e pesca no rio São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: Segrac, 2002. No prelo.

BERNARDINO, G., SENHORINI, J.A., FONTES, N.A., BOCK, C.L., MENDONÇA, J.O.J.. Propagação artificial do matrinxã, *Bryconcephalus* (GUENTER, 1869), (Teleostei, Characidae). **Boletim Técnico do CEPTA**, v. 6, n. 2, p. 1 – 10, 1993.

Companhia Energética de Minas Gerais (CEMIG) & Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais (CETEC). **Guia ilustrado de peixes da bacia do rio Grande.**

Belo Horizonte: CEMIG/CETEC, p. 59, 2000.

DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L. e VEIRA, F. Phylogeography and RAPDPCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. **Genet. Mol. Biol.**, n.25, p.379387, 2002.

FERREIRA, A.A.; NUÑER, A. P.O.; LUZ, D.A.R.; ESQIVEL, J.R.; RESTREPO, J. B. Avaliação quantitativa do sêmen do Jundiá, *Rhamdia quelen*. **Boletim do Instituto de Pesca**, São Paulo, v.27 ,n.1: p. 57-60, 2001.

FURTADO, J. F. R. **Piscicultura uma alternativa rentável.** Guaíba (RS): Livraria e Editora Agropecuária, 1995.

GODINHO, H. M. ; PIMENTEL, C. M. M. ; OLIVEIRA, I. R. ; SERRALHEIRO, P. C. S;G,T. G. . Relação Peso Comprimento do Robalo *Centropomus Undecimalis* Block 1792 da Região Estuarino-Lagunar de Cananéia In: **XIII CONGRESSO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA**, Resumos 1999. São Carlos (SP), p. 645.

GUIMARÃES, C.T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M.A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.30, n.253, nov./dez. 2009.

HADI ALAVI, S. M.; COSSON, J. **Sperm motility in fishes:** (I) Effects of temperature and pH: Dept. of Fisheries and Environmental Sciences, Faculty of **Natural Resources**, 2005.

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.** Pirassununga, 2013.

HOLTSMARK, M.; KLEMETSDAL, G.; SONESSON, A. K.; WOOLLIAMS, J. A. Establishing a base population for a breeding program in aquaculture, from multiple subpopulations, differentiated by genetic drift: II. Sensitivity to assumptions on the additive genetic relationships of base animals. **Aquaculture**, v. 274, p. 241-246, 2008.

JARAMILLO, S.; BAENA, M. **Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de los recursos fitogenéticos**. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali Colombia. 2000. 209p.

LAHNSTEINER F. **Cryopreservation of semen of the Salmonidae with special reference to large scale fertilization**. Methods in Molecular Biology 253, 1–13, 2004.

LEUZZI, M.S.P.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; SODRÉ, L.M.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, 27, 3, 355-362, 2004.

LOWE-MACCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge: Cambridge Universitypress, 1987. 382 p.

LUDWIG, L.; GOMES, E.; ARTONI, R. **Um método de reprodução induzida para o surubim *Steindachneridion melanoderma* (Siluriformes, Pimelodidae) do Rio Iguaçu**. Publ. UEPG Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, 11 (3/4): 23-27, 2005

LUZ, R.K.; ZANIBONI FILHO, Larvicultura do mandi-amarelo *Pimelodus maculatus*, em diferentes densidades de estocagem nos primeiros dias de vida. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, ano 02, Viçosa, 2002.

MANSOUR, N.; RAMOUN, A.; LAHNSTEINER, F. Quality of testicular semen of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with

fertilization and hatching success. **Aquaculture Research**. v.36, p 1422-1428, 2005.

MARQUES, D.K.S.. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

MATOSO, D. A.; ARTONI, R. F. e GALETTI JR., P. M. Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. **Hydrobiologia**, n. 527:223-225, 2004.

MIES FILHO, A.. **Reprodução dos animais e inseminação artificial**. Porto Alegre: Sulina, 1975. p.442-457.

MILIORINI, A.B.; MURGAS, L.D.S.; VIVEIROS, A.T.M. et al. Resfriamento do sêmen de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) a 4°C, utilizando diferentes concentrações de dimetilsulfóxido. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.209-211, 2002.

MORAIS-FILHO, M.B. and O. SCHUBART. 1955. **Contribuição ao estudo do Dourado (*Salminus maxillosus* Val.) do Rio Mogi Guassu**. São Paulo. Ministério da Agricultura. Divisão de caça e pesca, 114 p.

MURGAS, L.D.S.; MILIORINI, A.B.; SILVA, M.O.B. et al. Viabilidade seminal de piapara (*Leporinus obtusidens*), empregando-se diferentes diluentes, no resfriamento do sêmen a 4°C. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.26, n.3, p.211-213, 2002.

NELSON, S. J. **Fishes of the world**. 3 rd. Ed. United States of America. Ed. Jhon Wiley & Sons. 600p, 1994.

SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G. Peixes da bacia Amazônica. In: LOWE-MCCONNEL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução: Anna Emília A. de M. Vazzoler, Angelo Antônio Agostinho, Patrícia T.

M. Cunningham. São Paulo: EDUSP, 1999. cap. 15, p. 345-373. (Coleção Base).
Título do original em inglês: Ecological studies in tropical fish communities.

SAYYED M.; HADI, A.; COSSON, J Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenser persicus*. **Aquaculture Research** v.36 n.9, p.841–850. 2005.

SEVERI, W. **Ovos e Larvas de peixes de água doce**. 2001.
http://www.peld.uem.br/Relat2006/pdf/09_Ovos_larvas_peixes.pdf. Acesso em: 20/07/2011.

TOLEDO FILHO, S.A.; BIGONI, A.P.V., and ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Estudos citogenéticos em *Pseudoplatystoma coruscans* (Pimelodidae, Sorubiminae) do rio Mogi-Guaçu, SP. **Resumos do IV Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes Neotropicais**, Rio de Janeiro, RJ, pp. 32, 1992.

TORRES, R A; MATOSO, DA; ARTONI, RF . Genética De Peixes Neotropicais. li. Biologia Molecular De Peixes Neotropicais. UEPG **Ci. Biol. Saúde**, Ponta Grossa, 10 (2): 27-37, jun. 2004.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid Research**, v.18, p.7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. L.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6531-6535, 1990.

WOOLSEY, J. INGERMANN, R. L.. Acquisition of the for sperm motility in steelhead (*Oncorhynchus mykiss*): effect of pH on dynein ATPase. **Fish Physiology and Biochemistry** v.29, p. 47-56, 2004.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: FAO/CODEVASF/CNPq, 220p, 1983.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Population.** The University of Chicago Press, Chicago, 1978, 590 p.