

Caracterização genética de estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*) utilizados em programas de repovoamento

Genetic characterization of curimba ("Prochilodus lineatus") stocks used in stock enhancement programs

LOPES, Taís da Silva^{1*}; RIBEIRO, Ricardo Pereira²; BARRERO, Nelson Mauricio Lopera³; SIROL, Rodolfo Nardez⁴; POVH, Jayme Aparecido⁵; GOMES, Patrícia Cristina³; VARGAS, Lauro²

¹Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Centro de Aqüicultura, Pós-graduação em Aqüicultura, Jaboticabal, SP, Brasil.

²Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Maringá, PR, Brasil.

³Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Pós-graduação em Zootecnia, Maringá, PR, Brasil.

⁴Estação de Aqüicultura e Hidrologia da Duke Energy International, Salto Grande, SP, Brasil.

⁵Universidade Federal de Mato Grosso, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Rondonópolis, MT, Brasil.

*Endereço para correspondência: tais.peixegen@gmail.com

RESUMO

Objetivou-se com este estudo determinar a diversidade genética de estoques de *P. lineatus*, destinados a programas de repovoamento, com o marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). Foram analisados 52 reprodutores de duas pisciculturas localizadas nas cidades de Salto Grande - SP (A) e Palotina - PR (B) e 32 alevinos da progênie do estoque de Palotina (C). Os seis *primers* produziram 63 fragmentos (96,83% polimórficos). Os valores de variabilidade genética determinados pela porcentagem de fragmentos polimórficos (A: 80,95%; B: 85,71% e C: 79,37%) mostraram que houve diminuição da variabilidade genética em C, devido possivelmente ao inadequado manejo reprodutivo. A variabilidade genética entre os estoques A e B mostrou moderada diferenciação genética entre eles, decorrente possivelmente do efeito fundador. Esse resultado foi corroborado pelos valores de G_{st} (0,084), fluxo gênico N_m (5,48), identidade (0,926) e distância genética (0,077) e similaridade genética (A: 0,603 e B: 0,658), que forneceram informações importantes para uma segura conservação da ictiofauna e do ecossistema.

Palavras-chave: conservação, diversidade genética, ictiofauna, repovoamento pesqueiro

SUMMARY

The aim with this study was to determine the genetic diversity of *P. lineatus* stocks, destined to stocking programs, with the RAPD molecular marker (Random Amplified Polymorphic DNA). Fifty two broodstocks of two fish farmings located at Salto Grande - SP (A) and Palotina - PR (B) counties and 32 juvenile progenies of Palotina stock (C) were analyzed. The six primers produced 63 fragments (96.83% polymorphism). The genetic variability values determined by the polymorphic fragments percentage (A: 80.95%; B: 85.71% and C: 79.37%) showed decreasing genetic variability in C possibly due to the inadequate reproductive management. The genetic variability between A and B stocks showed moderate genetic differentiation among them, mainly due to the founder effect. This result was confirmed by the values of G_{st} (0.084), gene flow N_m (5.48), genetic identity (0.926) and distance (0.077) and genetic similarity (A: 0.603 and B: 0.658), that provided important informations for a safe ichthyofauna and ecosystem conservation.

Keywords: conservation, fish settlement, genetic diversity, ichthyofauna

INTRODUÇÃO

Em muitos rios brasileiros tem ocorrido redução e até mesmo o desaparecimento de espécies de peixes que antes eram comumente capturadas por pescadores. O curimba (*Prochilodus lineatus*) é raro em alguns rios brasileiros, como por exemplo, o rio Paranapanema (BRITTO et al., 2003), em decorrência principalmente da poluição, do assoreamento, da construção de barragens e sobrepesca (AGOSTINHO et al., 2005; HATANAKA et al., 2006). Entre as ações empregadas para reduzir esses impactos, destacam-se os programas de repovoamento, que se tornaram métodos comuns para a conservação da ictiofauna (HILSDORF et al., 2006).

O repovoamento existente a mais de três décadas no Brasil, tem sido realizado, em geral, sem respaldo científico (AGOSTINHO et al., 2005), podendo se tornar uma ameaça para os ecossistemas e para as populações naturais de peixes (POVH, 2007), maior até que a escassez desta espécie. Por isso, é necessário o apoio de ferramentas que ofereçam mais informações para a produção dos peixes que serão soltos, como a genética, a ecologia, a reprodução, bem como a participação de outras áreas que permitam determinar objetivamente quais sistemas de conservação devem ser adotados ou recomendados (LOPERA-BARRERO et al., 2007).

A abordagem genética de populações naturais e de estoques mantidos em cativeiro monitorado por marcadores moleculares, por exemplo, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), representa informações de grande importância para obter ganhos expressivos em sua produção e conservação (GOMES, 2007). A ausência de monitoramento

genético dos peixes que serão soltos no ambiente é preocupante, pois o manejo reprodutivo pode proporcionar, em uma única geração, redução da variabilidade genética (PORTA et al., 2006) e, conseqüentemente, da resistência às doenças e da capacidade de adaptar-se em um novo ambiente (BARROSO et al., 2005). Segundo Aho et al. (2006), em razão ao inadequado manejo reprodutivo tem ocorrido perda de variabilidade genética dos estoques de peixes utilizados na piscicultura. Esta perda pode acarretar a problemas de adaptabilidade e sobrevivência de progênies usadas em programas de repovoamento (POVH et al., 2008), afetando as populações naturais de peixes (SØNSTEBØ et al., 2007) e o ecossistema (LOPERA-BARRERO, 2007). Objetivou-se com este estudo determinar a diversidade genética de estoques de *Prochilodus lineatus* de duas estações de piscicultura, destinados a programas de repovoamento dos rios Paraná e Paranapanema, com o marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*).

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de nadadeira caudal (0,5 cm² aproximadamente) foram coletadas de 52 reprodutores de pisciculturas localizadas nas cidades de Salto Grande/*Duke Energy International* - SP (estoque A: 24 indivíduos) e Palotina - PR (estoque B: 28 indivíduos), Brasil. Trinta e dois alevinos da progênie do estoque de Palotina (estoque C) também foram avaliados. Esses estoques são utilizados em programas de repovoamento dos rios Paraná e Paranapanema (Figura 1).

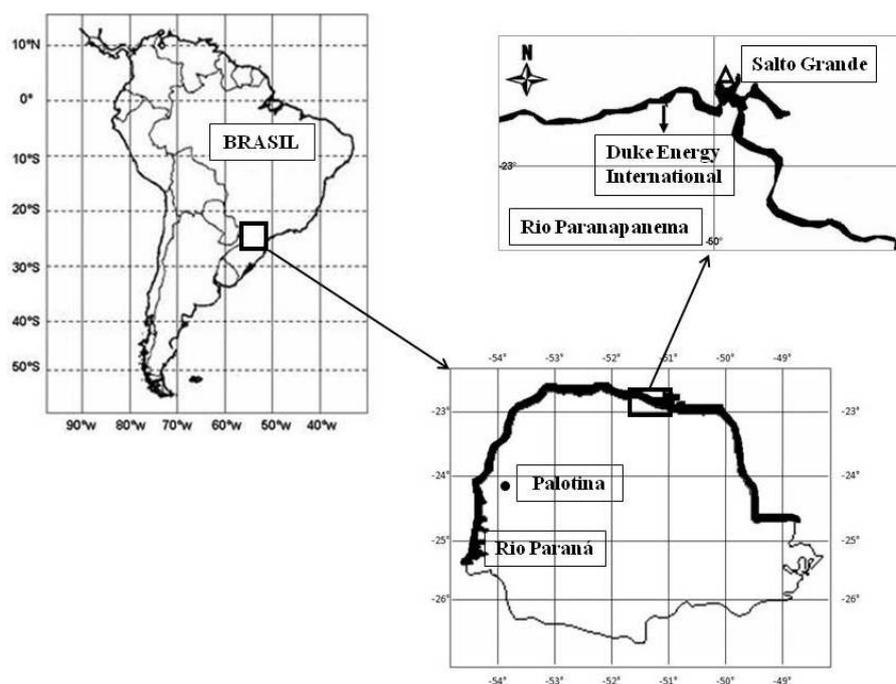


Figura 1. Localização das pisciculturas das cidades de Salto Grande (Estação de Aqüicultura e Hidrologia da *Duke Energy International* - Geração Paranapanema) e Palotina e dos rios Paraná e Paranapanema, Brasil.

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita por Lopera-Barrero et al. (2008). Foram adicionados 550 μ L de tampão de lise (50mM Tris-HCl, 50mM EDTA, 100mM NaCl e 1% SDS) e 7 μ L de proteinase K (200 μ g/mL⁻¹), em microtubos contendo as amostras de nadadeira. As amostras foram incubadas em banho-maria a 50 °C por 12 horas. O DNA foi precipitado com 600 μ L de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos, precipitado com 700 μ L de álcool etílico absoluto e incubado a -20°C por uma hora.

O DNA foi centrifugado, lavado com 700 μ L de álcool etílico 70%, ressuspensionado em 80 μ L de tampão TE (10mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA) e tratado com 7 μ L de RNase (30 μ g/mL⁻¹) em banho-maria a 37 °C por uma hora, e em seguida estocado em freezer a -20°C. O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260nm. As amostras

foram diluídas para uma concentração de 10ng/ μ L⁻¹. Para conferir a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500mM Tris-HCl, 60mM ácido bórico e 83mM EDTA) por uma hora a 70 V.

A amplificação foi realizada em um volume de reação de 15 μ L, no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2,5mM de MgCl₂, 0,46 μ M de *primer*, 0,2mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA) e 10 ng de DNA alvo. O DNA foi desnaturado a 94 °C por quatro minutos: em seguida, foram realizados 40 ciclos. Cada ciclo consistiu de um minuto de desnaturação a 94°C, 90 segundos de anelamento do *primer* a 40°C e dois minutos para extensão a 72°C. Após, realizou-se uma extensão final a 72°C por cinco minutos. As reações de RAPD foram realizadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (EUA). Foi avaliada a amplificação de 60 *primers* de 10 bases dos Kits OPA OPX e

OPW (Operon Technologies Ltd., EUA), sendo escolhidos os que apresentaram melhor definição e reprodutibilidade. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,5%. Foram utilizados 15µL do produto amplificado e 2µL de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45mM Tris-Borato e 1mM EDTA) por quatro horas a 70 volts. Os géis de quantificação e amplificação foram visualizados sob radiação UV, após a coloração em banho de brometo de etídio ($0,5\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) por uma hora. A imagem foi fotografada por intermédio do programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EUA).

O tamanho dos fragmentos obtidos foi estimado por comparação com um marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®, EUA) pelo programa da Kodak EDAS. Foram atribuídos valores à presença (1) ou ausência (0) de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos, que foram usados para a construção de uma matriz de similaridade por meio do coeficiente de similaridade de Jaccard.

A variabilidade genética foi determinada pela porcentagem de fragmentos polimórficos (critério 95%); pela diferenciação genética (G_{st}) (NEI, 1973), estabelecendo-se como método de diferenciação a definição de Wright (1978), em que valores entre 0,00 e 0,05, 0,05 e 0,15, 0,15 e 0,25 e $> 0,25$ indicam, respectivamente, pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética; e pelo fluxo gênico, o qual é equivalente ao número de emigrantes por geração (N_m). Estas análises estatísticas, a determinação da distância e identidade genética (NEI, 1978) foram determinados através do programa PopGene 1.31 (YEH et al., 1999).

A similaridade genética para cada estoque foi obtida com base no cálculo do coeficiente de similaridade de Jaccard, formando um dendrograma pelo agrupamento UPGMA, utilizando-se o programa NTSYS 1.7 (ROHLF, 1989).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os seis *primers* selecionados OPA01 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPW01 (5'-CTCAGTGTCC-3'), OPW08 (5'-GACTGCCTCT-3'), OPW19 (5'-CAAAGCGCTC-3'), OPX01 (5'-CTGGGCACGA-3') e OPX02 (5'-TTCCGCCACC-3') amplificaram 63 fragmentos, com tamanhos entre 350 e 3100 pb, dos quais 96,83% foram polimórficos.

Os valores de variabilidade genética estimados pela porcentagem de fragmentos polimórficos (%FP) mostraram que houve variabilidade genética similar entre os estoques de reprodutores. Igualmente, foi verificada diminuição da variabilidade na progênie de estoque de Palotina (Figura 2). Estes resultados podem ser explicados pelo efeito fundador (*founder effect* – diversidade genética com o qual o estoque de reprodutores foi fundado), uma que a variabilidade genética estimada para os estoques caracteriza baixa diferenciação genética entre seus indivíduos, demonstrando que possivelmente no momento da formação dos estoques estes tinham uma origem em comum.

Ao analisar a origem dos estoques de reprodutores da *Duke Energy International* (A) e da cidade de Palotina (B), estes resultados foram confirmados. A formação desses estoques foi efetuada a partir de indivíduos adultos coletados nos rios Paranapanema e Paraná respectivamente.

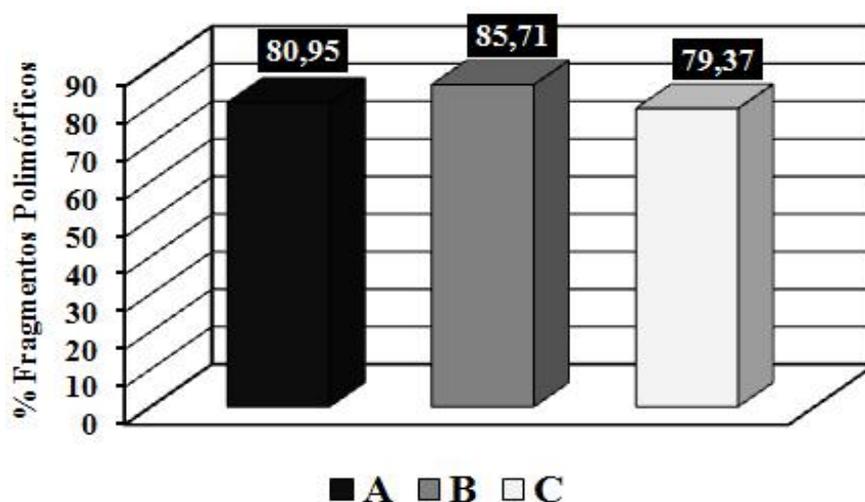


Figura 2. Porcentagem de fragmentos polimórficos dos estoques de reprodutores da *Duke Energy International* (A), Palotina (B) e da progênie (C) de *Prochilodus lineatus*

O rio Paranapanema é um importante afluente do alto rio Paraná que drena as regiões sudoeste de São Paulo e noroeste do Paraná, servindo ainda como divisor entre os dois estados (NOGUEIRA et al., 2006). Apesar da separação geográfica das

pisciculturas e dos diferentes locais de captura, é possível que entre os indivíduos existisse um fluxo gênico no ambiente natural, o que explicaria sua similaridade genética (A: 0,603; B: 0,658) e os baixos valores de distância genética (Tabela 1).

Tabela 1. Identidade (acima da diagonal) e distância genética (embaixo da diagonal) dos estoques de reprodutores (A e B) e da progênie (C) de *Prochilodus lineatus*

Estoques	A	B	C
A	----	0,926	0,906
B	0,077	----	0,910
C	0,098	0,095	----

O alto número de migrantes por geração (N_m : 5,48) e a moderada diversidade genética (G_{st} : 0,084) entre os estoques de reprodutores podem indicar a existência de um fluxo gênico. Isto pode ser devido à troca de reprodutores entre as estações de piscicultura ou ainda à origem comum dos estoques de reprodutores. Povh et al. (2008), analisando uma população natural do Rio Paranapanema e um estoque de *Piaractus mesopotamicus*, também encontram alto número de migrantes por geração e moderada diferenciação genética

entre os indivíduos, sugerindo alta taxa de ancestrais em comum.

O valor de N_m é considerado alto, uma vez que o rio Paraná está separado da piscicultura da Duke pelas barragens das usinas hidrelétricas de Rosana, Taquaruçu, Capivara, Canoas I, Canoas II e Salto Grande. Esta situação é comum em populações naturais, como foi verificado por Leuzzi et al. (2004), que observaram fluxo gênico entre populações de *Astyanax altiparanae* separadas geograficamente por barragens.

A porcentagem de fragmentos polimórficos (PAIVA et al., 2006; SOFIA et al., 2006), a diferenciação genética de Nei (G_{st}) (ALMEIDA et al., 2003; LEUZZI et al., 2004) e o número de migrantes por geração (N_m) (LEUZZI et al., 2004; PAIVA et al., 2006) são parâmetros que têm sido utilizados com sucesso na estimação de níveis de diferenciação genética entre estoques e populações naturais de peixes neotropicais. Neste estudo essas estimativas mostraram-se eficientes na determinação da variabilidade genética dos estoques de reprodutores e progênie, demonstrando a sua importância para o adequado manejo dos estoques de reprodutores. Por isso, pode-se sugerir que os manejos reprodutivo, genético e de melhoramento dos estoques de reprodutores de *P. lineatus* analisados neste estudo sejam visualizados de maneira homogênea, e não como estoques separados, principalmente se forem utilizados para conservação por intermédio de programas de repovoamento. Gomes (2007), analisando três estoques de reprodutores de *Leporinus elongatus* utilizados em programas de repovoamento, encontrou valores de variabilidade genética que indicaram a similaridade genética dos estoques, semelhantemente à situação observada para os estoques de reprodutores de *P. lineatus* analisados neste estudo. Este fato demonstra que o monitoramento contínuo dos reprodutores das estações de piscicultura é necessário para manter baixo o coeficiente de endogamia nos programas de produção e conservação (LOPERA-BARRERO et al., 2007).

Por outro lado, ao se analisar a progênie do estoque de Palotina (C), foi verificada diminuição da variabilidade genética, decorrente possivelmente do inadequado manejo reprodutivo do estoque de reprodutores. A perda de variabilidade genética é bastante comum na piscicultura (MOREIRA et al., 2007), posto que o método mais amplamente usado no momento da formação de estoques é a escolha de indivíduos com características

visuais favoráveis, como peso e tamanho. Essa seleção intencional sem base genética pode provocar acasalamentos entre indivíduos aparentados, aumentando o coeficiente de endogamia (KANG et al., 2006) e reduzindo o número efetivo de reprodutores (FROST et al., 2006) e conseqüentemente a variabilidade genética das próximas gerações. Neste estudo foi observada esta tendência nos estoques B e C, comprovado pelo valor de porcentagem de fragmentos polimórficos (79,37%), pelo valor de similaridade (0,714) e pela distância e identidade genética (Tabela 1) observada na progênie, apesar da alta variabilidade genética entre os indivíduos do estoque de reprodutores (porcentagem de fragmentos polimórficos: 85,71%).

A utilização de sistemas reprodutivos, acasalamentos e outros manejos inadequados podem diminuir a variabilidade genética. Segundo Frost et al. (2006), o sistema reprodutivo (formação de acasalamentos e relação de sexos) e as flutuações no tamanho das populações podem reduzir o número de animais em idade de reprodução que tenham capacidade de deixar uma descendência viável (N_e). Um exemplo disso foi observado por Povh (2007), em estoques de *P. mesopotamicus*, que ao comparar os sistemas reprodutivos por extrusão e seminatural, encontrou aumento da variabilidade genética na progênie quando utilizado o sistema seminatural ($IS = 0,365$ e $\%FP = 60,5\%$). Igualmente, Oota & Matsuishi (2005), ao utilizarem um modelo com base no histórico individual de vida, verificaram que, quando a proporção de fêmeas utilizada no acasalamento é de 10 a 30%, o coeficiente de endogamia aumenta, diferentemente quando utilizada proporção de 40 a 50%, em que este coeficiente tem pequeno efeito. Por isso, para se alcançar manutenção da variabilidade genética nas progênies de *P. lineatus* na piscicultura de Palotina, é recomendado equilibrar o número de fêmeas e machos usados durante a reprodução, utilizar sistemas e manejos reprodutivos adequados e manter

o N_e tão grande quanto possível para assim preservar a variabilidade genética nas progênes (MILLER & KAPUSCINSKI, 2003), diminuindo a correlação negativa entre a similaridade genética e o número de gerações (FREITAS & GALETTI JÚNIOR, 2005).

O dendrograma de similaridade baseado no coeficiente de Jaccard, mostrou a formação de três agrupamentos: um na parte superior envolvendo 14 indivíduos do estoque B,

seis do C e quatro do A, outro no centro envolvendo somente indivíduos do estoque B e C e um na parte inferior envolvendo a maioria dos indivíduos dos estoques A, B e C. Estes resultados demonstram que entre o estoque de reprodutores e a progênie existem poucas diferenças genéticas, as quais seriam evidenciadas se houvesse um agrupamento composto unicamente por indivíduos de um único estoque (Figura 3).

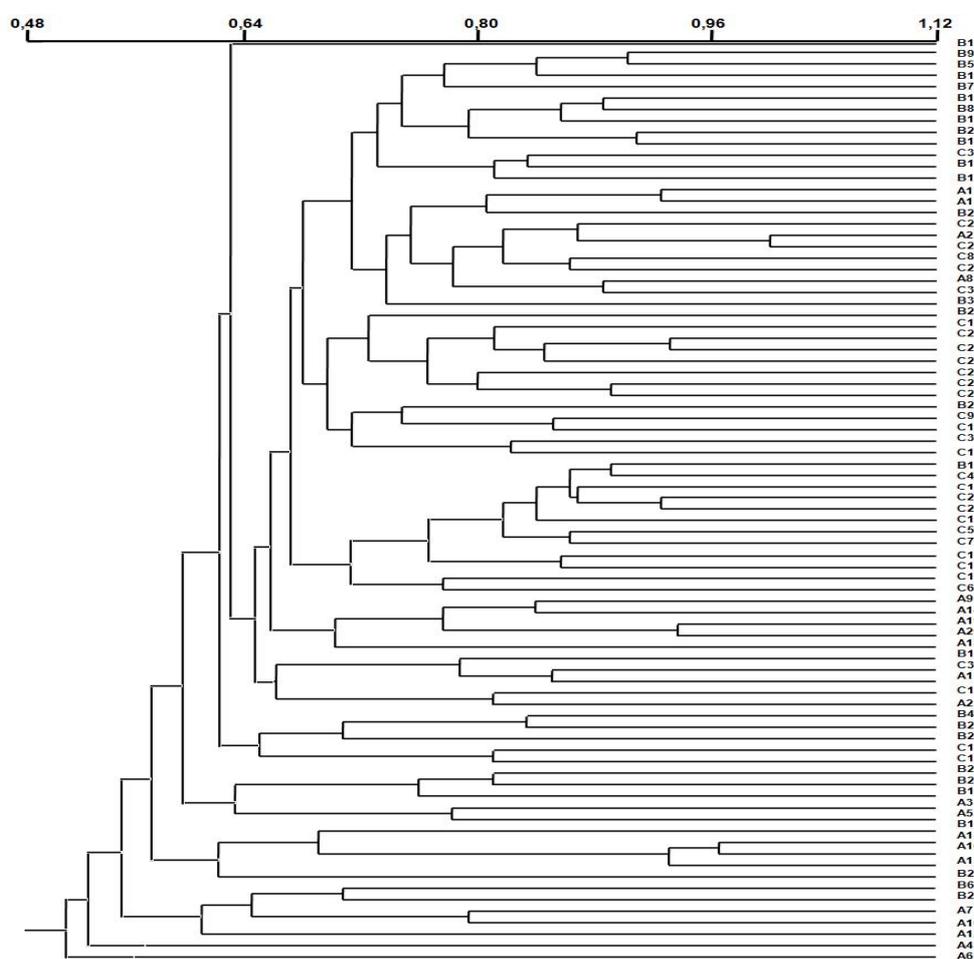


Figura 3. Dendrograma de similaridade genética obtido para os estoques A (*Duke Energy International*), B (Palotina) e C (progênie Palotina) de *Prochilodus lineatus*

As informações obtidas neste estudo permitem orientar objetivamente o manejo reprodutivo desses estoques utilizados em programas de repovoamento dos rios Paraná e Paranapanema. Estas premissas

têm maior impacto por causa do uso do estoque em programas de repovoamento, como é o caso dos reprodutores de *P. lineatus* analisados neste estudo, visto que a introdução de peixes com baixa

variabilidade genética pode tornar um programa de repovoamento ineficiente (baixa sobrevivência de juvenis) e provocar impactos irreversíveis no ecossistema e demais populações de peixes (POVH, 2007). Segundo Melo et al. (2006) e Sønstebø et al. (2007), o acasalamento de indivíduos geneticamente diferentes daqueles encontrados nas populações naturais pode promover a perda de genes de adaptabilidade ao ambiente e o aparecimento de genes deletérios, o qual pode ocasionar baixa sobrevivência de progênes no ambiente natural. Isso vai afetar o N_e e juntamente com a perda de variabilidade genética e o desequilíbrio do ecossistema, pode desencadear a extinção dessa população e a exposição de outras aos mesmos efeitos.

Em razão de o perfil dos estoques de reprodutores e da progênie das pisciculturas estudadas, sua caracterização genética e a objetiva orientação genética e reprodutiva permitirem a correta conservação do *P. lineatus* a ser utilizado em programas de repovoamento, infere-se que o marcador RAPD mostrou-se eficaz e ofereceu bons resultados.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservation of the biodiversity of Brazil's Inland Waters. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p.646-652, 2005.
- AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN J.; BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, v.253, n.1-4, p. 244-248, 2006.
- ALMEIDA, F.S.; SODRE, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v.26, n.3, p.301-305, 2003.
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconia) using microsatellites. **Aquaculture**, v.247, n.1-4, p. 51-65, 2005.
- BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; VIANNA, N.C.; JARDIM, S.M.; SANTOS, J.C.; PELISARI, E. **Peixes do rio Paranapanema**. São Paulo: Duke Energy Internacional Geração Paranapanema, 2003.112 p.
- FREITAS, P. D.; GALETTI JR, P. M. Assessment of the genetic diversity in five generations of commercial broodstock line of *Litopenaeus vannamei* shrimp. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.12, p.1362-1367, 2005.
- FROST, L.A.; EVANS B.S.; JERRY D.R. Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). **Aquaculture**, v.261, n.3, p.1056-1064, 2006.
- GOMES, P.C. **Diversidade genética de três populações de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando marcadores moleculares**. 2007. 75f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v.126, n.1-2, p.513-517, 2006.

HILSDORF, A.W.S.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. **Genética e conservação de estoques pesqueiros de águas Continentais no Brasil**: situação atual e perspectivas. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 43p.

KANG, J.H.; NOH, J.K.; KIM, J.H.; LEE, J.H.; KIM, H.C.; KIM, K.K.; KIM, B.S.; LEE, W.J. Genetic relationship between broodstocks of olive flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck and Schlegel) using microsatellite markers. **Aquaculture Research**, v.37, n.7, p.701-707, 2006.

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**, v.27, n.3, p.355-362, 2004.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T.S. Comparación de protocolos de extracción de ADN con muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con cloruro de sodio. **Ciência e Investigación Agrária**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 77-86, 2008.

LOPERA-BARRERO, N.M. **Diversidade genética de *Brycon orbignyianus* em sistema reprodutivo seminatural**. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; POVH, J.A. O repovoamento de peixes: uma estratégia multidisciplinar? **Aqüicultura e Pesca**, v.30, n.1, p.71-74, 2007.

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

MILLER, L.M, KAPUSCINSKI, A.R. Genetic guidelines for hatchery supplementation programs. In: HALLERMAN, E.M. **Population genetics**: principles and applications for fisheries scientists. Bethesda: American Fisheries Society, 2003. p. 329-355.

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

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Science**, v.70, n.12, p.3321-3323, 1973.

NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. **Genetics**, v.89, n.3, p.583-590, 1978.

NOGUEIRA, M.G.; JORCIN, A.; VIANNA, N.C.; BRITTO, Y.C.T. Reservatórios em cascata e os efeitos na limnologia e organização das comunidades bióticas (Fitoplâncton, zooplâncton e zoobentos)-Um estudo de caso no rio Paranapanema (SP/PR). In: NOGUEIRA M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. **Ecologia de reservatórios**: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas. São Carlos: RIMA, 2006. p. 83-125.

OOTA, T.; MATSUSHI, T. Increase of inbreeding by stocking on wild population assessed by using individual-based life history model. **Fisheries Science**, v.71, n.1, p.73-78, 2005.

PAIVA, S.R.; DERGAM, J.A.; MACHADO, F. Determining management units in southeastern Brazil: the case of *Astyanax bimaculatus* (Linnaeus, 1758) (Teleostei: Ostariophysi: Characidae). **Hydrobiologia**, v.560, n.1, p.393-404, 2006.

POVH, J.A. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2007. 75f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; LUPCHINSKI JR., E.; GOMES, P.C.; LOPES, T DA S. Conservación de la diversidad genética de peces a través del monitoramiento por marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, v.35, n.1, p.5-15, 2008.

PORTA, J.; PORTA, J.M.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, G.; ALVAREZ, M.C. Development of a microsatellite multiplex PCR for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) and its application to broodstock management. **Aquaculture**, v.256, n.1, p.159-166, 2006.

ROHLF, F.J. **NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System**. New York: Exeter Publishers, 1989. 191p.

SOFIA, S.H.; SILVA, C.R.M.; GALINDO, B.A.; ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; MARTINEZ, C.B.R. Population genetic structure of *Astyanax scabripinnis* (Teleostei, Characidae) from an urban stream. **Hydrobiologia**, v.553, n.1, p.245-254, 2006.

SØNSTEBØ, J.H.; BORGSTRØM R.; HEUN, M. Genetic structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) from the Hardangervidda mountain plateau (Norway) analyzed by microsatellite DNA: a basis for conservation guidelines. **Conservation Genetics**, v.8, n.1, p.33-44, 2007.

WRIGHT, S. **Evolution and genetics of population**. Chicago: University of Chicago Press, 1978. 580p.

YEH, F.C.; BOYLE, T.Y.Z.; XIYAN, J.M. **Popgene version 131**: microsoft window-based freeware for population genetic analysis. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999. 29p.

Data de recebimento: 25/02/2008

Data de aprovação: 24/09/2008