

# Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD

Patrícia Cristina Gomes<sup>1\*</sup>, Ricardo Pereira Ribeiro<sup>1</sup>, Nelson Lopera Barero<sup>1</sup>, Jayme Aparecido Povh<sup>1</sup>, Lauro Vargas<sup>1</sup> e Rodolfo Nardez Sirol<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil.

<sup>2</sup>Estação de Aquicultura e Hidrologia, Duke Energy International Geração Paranapanema, Salto Grande, São Paulo, Brasil.

\*Autor para correspondência. E-mail: patriciacristinagomes@hotmail.com

**RESUMO.** Recentemente a produção aquícola brasileira tem apresentado grande progresso. Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, a piapara (*Leporinus elongatus*) tem sido amplamente preconizada. Com objetivo de avaliar os programas de repovoamento, foram analisadas a variabilidade e a divergência genética de três estoques de piapara com a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic*). O primeiro estoque pertence à Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A); o segundo, à piscicultura de Rolândia (B) e o terceiro, ao Programa de Repovoamento dos Rios do Paraná (C). Os dez primers para RAPD utilizados produziram 105 fragmentos polimórficos, conferindo um polimorfismo de 98,1% para os três estoques avaliados. A porcentagem de locos polimórficos e índice de Shannon foi superior para o estoque A. Porém, todos valores foram elevados, indicando alta diversidade intrapopulacional. Os valores de *Gst* indicam que houve baixa diferenciação genética entre os estoques A x B e moderada diferenciação entre os demais. O *Nm* foi maior entre os estoques A x B. A distância genética e o dendrograma indicam que os estoques A x B são menos distantes geneticamente.

**Palavras-chave:** divergência genética, locos polimórficos, peixe, RAPD, reprodutores, variabilidade genética.

**ABSTRACT. Genetic diversity of three stocks of piapara (*Leporinus elongatus*), using RAPD.** Lately, aquiculture production in Brazil has made great strides. Among the native species cultivated in Brazil, piapara (*Leporinus elongatus*) has been widely praised. With the objective of evaluating restocking programs, the variability and genetic divergence of three piapara stocks were analyzed using the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) technique. The first stock belongs to the Aquiculture and Hydrology Station of Duke Energy International (A); the second one belongs to a fish farm in the city of Rolândia (B); and the third to the River Restocking Program of Paraná (C). The ten primers used for RAPD produced 105 polymorphic loci, conferring a polymorphism of 98.1% for the three evaluated stocks. Polymorphic loci percentage and Shannon index were higher for stock A. However, all values were high, indicating high intrapopulation diversity. The *Gst* values indicate a low genetic variation between A x B stocks and a moderate differentiation among the others. The *Nm* was higher between A x B stocks. Genetic distance and the dendrogram indicate that A x B stocks are genetically less distant.

**Key words:** genetic divergence, polymorphic loci, fish, RAPD, reproducers, genetic variability.

## Introdução

A produção aquícola brasileira passou de 20,5 mil toneladas, em 1990, para 210 mil toneladas, em 2001, com um aumento de 925%, enquanto a aquicultura mundial teve um crescimento de 187% no mesmo período, o que fez com que o país ocupasse a 19ª posição na produção de organismos aquáticos (Borghetti *et al.*, 2003). De acordo com o estudo “O estado da aquicultura mundial em 2006”, realizado pela subcomissão de Aquicultura da FAO (2006) em Nova Déli, na Índia, em 1980, apenas 9% dos

peixes consumidos no mundo vinham da aquicultura. Hoje, o índice é de 43%. Esse percentual equivale a 45,5 milhões de peixes de cativeiro por ano, que totalizam cerca de U\$ 63 bilhões. Porém, o Brasil apresenta uma série de condições que poderiam aumentar ainda mais sua produtividade, tais como clima adequado, baixo custo da terra, variedade de espécies com valor econômico adaptáveis aos cultivos, profissionais qualificados e com experiência internacional, mercado consumidor potencial, infra-estrutura de

apoio e escoamento para exportação, linhas de crédito, ausência de poluição e contaminação acentuada dos ecossistemas aquáticos, além de ser um grande produtor e exportador de soja e outros grãos que formam a base da maior parte da alimentação dos peixes (Lovshin, 2000).

Dentre as espécies nativas cultivadas no Brasil, a piapara (*Leporinus elongatus*) é amplamente preconizada para piscicultura, principalmente nos Estados da região Sudeste e Sul, pois em cativeiro apresentam bom ganho em peso e boa conversão alimentar, podendo atingir mais de 1,0 kg de peso no período de um ano (Moreira et al., 2001).

Apesar de ter grande importância econômica, houve redução na quantidade de indivíduos coletados de piapara nos últimos anos, ocorrido provavelmente pelas alterações em seu hábitat. Dessa forma, o *L. elongatus* é uma espécie promissora para o cultivo, desde que seja realizado manejo adequado baseado em critérios genéticos (Martins et al., 2003).

A espécie *Leporinus elongatus* pertence à ordem Characiformes, família Anostomidae, é também conhecida popularmente como piapara, piaba, piau (Reis et al., 2003). Os representantes da ordem Characiformes encontram-se distribuídos pelos continentes africano e americano, desde o México até a Patagônia. Esta ordem representa um dos maiores grupos de peixes de água doce do mundo com 237 gêneros e 1.343 espécies (Nelson, 1994). Estes organismos apresentam enorme diversidade de formas, vivendo nos mais variados tipos de ambientes aquáticos, exibindo ampla diversidade de itens em sua dieta, desde detritívoros e herbívoros até predadores piscívoros. O *L. elongatus* é herbívoro, preferencialmente frugívoro, e esconde-se em troncos e outros substratos existentes no seu hábitat (Filho e Ribeiro, 1991).

O conhecimento da diversidade genética dos estoques naturais ou cultivados de peixes é de fundamental importância para o manejo correto desses estoques. Surpreendentemente, as informações sobre a diversidade genética dessa espécie são incipientes. Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações, quer nativas, quer selvagens. Esses marcadores permitem a verificação tanto de relações filogenéticas entre espécies quanto de segregação reprodutiva entre populações isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (Kotoulas et al., 1997; McConnell et al., 1997; Birstein et al., 1998; Policansky e Maguson, 1998).

Dessa forma, a determinação da variabilidade e da divergência genética é de grande importância para o progresso do melhoramento genético. A técnica de

RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) tem sido utilizada com muito sucesso para a estimação do valor de diversidade genética em populações, espécies e linhagens de peixes (Povh et al., 2005). A ampla utilização da técnica RAPD deve-se, principalmente, a sua rapidez, relativa acessibilidade, alto polimorfismo, pequena quantidade de material biológico para extração de DNA e não-necessidade do conhecimento prévio do genoma (Bártfai et al., 2003). A técnica RAPD é a de menor custo, necessita de um pequeno número de etapas, pouco tempo para obter os resultados e facilidade de implementação (Milach, 1998). Segundo Moreira et al. (2003), a técnica de RAPD é uma ferramenta adequada para o melhoramento genético em peixes.

Até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados com *Leporinus elongatus* com objetivo de avaliar a diversidade genética; portanto, o conhecimento da variabilidade e divergência genética dos estoques naturais ou cultivados desta espécie poderá contribuir para o desenvolvimento de um manejo adequado, garantindo o monitoramento para que não ocorra redução de variabilidade genética nos programas de cultivo.

Assim, objetivou-se com este trabalho estimar a variabilidade e a divergência genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), pertencentes à Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema), Piscicultura de Rolândia e ao Programa de Repovoamento dos rios do Paraná.

## Material e métodos

### Material biológico

Para avaliar a variabilidade e a divergência genética, foram utilizadas três populações estocadas de piapara (*Leporinus elongatus*); a primeira pertencente à Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (Geração Paranapanema) (A), localizada no município de Salto Grande, Estado de São Paulo; a segunda pertencente à piscicultura de Rolândia, Estado do Paraná (B); e a terceira pertencente ao Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C).

Foram utilizadas 57 amostras de reprodutores, sendo 28 indivíduos pertencentes a Duke Energy, 29 indivíduos à piscicultura de Rolândia e 27 amostras de larvas fornecidas pelo Programa de Repovoamento dos rios do Paraná.

Estes estoques de piapara são destinados à produção de alevinos para o programa de repovoamento dos rios do Paraná, financiado pelo Governo do Estado do Paraná.

### Extração e quantificação de DNA

Para a extração de DNA, foi utilizada a metodologia descrita por Bardakci e Skibinski (1994), modificada por Povh *et al.* (2005). Os fragmentos de nadadeira caudal de aproximadamente 0,5 cm<sup>2</sup>, preservados a -20°C com etanol 70%, foram colocados em microtubos com 550 µL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 50 mM de EDTA, 100 mM de NaCl e 1% de SDS) e 200 µg mL<sup>-1</sup> de proteinase K, e, em seguida, incubados em banho-maria a 50°C “overnight”. Posteriormente, o DNA foi purificado com duas extrações com fenol-Tris pH 8,0 e três de clorofórmio. O DNA obtido foi precipitado com duas vezes e meia de volume de etanol absoluto e um décimo de volume de acetato de sódio em relação ao volume recuperado, e foi incubado por 2h a -20°C. Em seguida, o DNA foi centrifugado, lavado com 2 mL de etanol 70%, ressuscitado em 60 µL de tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA) e tratado com 30 µg mL<sup>-1</sup> de RNase. O DNA permaneceu por 40 min. em banho-maria a 37°C, sendo, em seguida, conservado a -20°C.

Estimou-se a quantidade de DNA presente em cada amostra pela comparação com DNA do fago λ, de concentração conhecida, por meio de eletroforese em gel de agarose 1% com tampão TAE (40 mM tris-base; 10 mM ácido bórico; 2M EDTA Ph 8,0) e a imagem capturada por um sistema da EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5). Com base nestas estimativas, as amostras foram diluídas para a concentração de 10 ng µL<sup>-1</sup>.

### Amplificação

As condições de amplificações foram baseadas nas descritas por Williams *et al.* (1990), com algumas modificações. O DNA genômico foi amplificado em um volume de reação de 15 µL, no qual se utilizou tampão Tris-KCl 1X (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,46 mM de *primer* (oligonucleotídeos), 0,2 mM de cada dNTPs, uma unidade de Taq DNA Polimerase e 10 ng de DNA molde. As reações de RAPD foram amplificadas num termociclador “Eppendorf Mastercycler® Gradient”, programado para 40 ciclos, com um passo inicial de desnaturação a 96°C, por 5 min. e um passo final de extensão a 72°C, por 7 min. Cada ciclo consistiu em 1 min. a 94°C, 1 min. e 30 s a 36°C e 2 min. a 72°C.

Foram avaliados 60 *primers* do Kit Operon (Operon Technologies Inc. Alameda, CA, EUA). Para avaliar os diferentes estoques, foram selecionados dez, que apresentaram bom padrão de amplificação.

Os produtos de amplificação foram separados em

gel de agarose 1,7%. Foram utilizados 15 µL do produto amplificado e 2 µL de tampão de amostra (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em 60 volts por 4h em uma cuba horizontal usando tampão TBE 1X (500 mM de Tris-HCl, 60 mM de ácido bórico e 83 mM de EDTA). Foi utilizado um controle negativo (N) para cada reação, em que sua amplificação foi executada adicionando-se todos componentes, citados anteriormente, exceto o DNA alvo.

Para a revelação do gel, utilizou-se banho de brometo de etídeo a 0,5 µg mL<sup>-1</sup>, por 30 min. Posteriormente, os géis foram fotografados usando o sistema EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5).

### Análise dos dados

O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o padrão DNA Ladder de 100 pb (15 bandas com tamanho entre 100 e 2072 pb).

A presença ou ausência de bandas de tamanhos moleculares idênticos (mesmo fragmento) foi usada para a construção de uma matriz de similaridade, codificando “1” como a presença da banda no gel e “0” como sua ausência.

A variabilidade genética para cada estoque foi determinada pela porcentagem de locos polimórficos e pelo índice de diversidade de Shannon, e a variabilidade genética entre os estoques foi determinada pela diversidade genética de Nei (1972) (*Gst*) e pelo número de migrantes por geração (*Nm*). Para estas análises, foi utilizado o programa PopGene 1.31 (Yeh *et al.*, 1999). A divergência genética entre os estoques foi analisada pela distância genética de Nei (1972). A fim de representar graficamente o padrão de divergência genética, foi construído um dendrograma da distância genética, baseado em Nei (1972), pelo algoritmo de agrupamento UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Using na Arithmetic Average*). Foi utilizado o programa PopGene 1.31 para essas análises (Yeh *et al.*, 1999).

## Resultados e discussão

### Locos polimórficos

Dos 60 *primers* do kit Operon (Operon Technologies Inc., Alameda, CA, EUA) avaliados, foram selecionados os dez melhores, com base no número e na nitidez dos fragmentos produzidos.

Na Tabela 1, são apresentadas as sequências dos dez *primers* selecionados, a porcentagem das bases pirimidínicas (G e C), o número de fragmentos,

número de fragmentos polimórficos e o tamanho dos fragmentos amplificados para os estoques de piapara.

**Tabela 1.** Sequências de nucleotídeos dos *primers*, porcentagem de bases pirimidínicas G + C, número de fragmentos, número de fragmentos polimórficos e tamanho dos fragmentos amplificados para os estoques de piapara (*Leporinus elongatus*).

**Table 1.** Primer nucleotide sequences, G + C pyrimidine base percentage, number of loci, number of polymorphic loci and size of amplified fragment in piapara (*Leporinus elongatus*) stocks.

Primers	Sequência de nucleotídeos (3' → 5') Primer nucleotide sequences	% (G + C) fragmentos	Nº de fragmentos number of loci	Nº de fragmentos polimórficos number of polymorphic loci	Tamanho dos fragmentos amplificados (pb) size of amplified fragment
A-16	AGC CAG CGA A	60	15	15	200-2.072
X-01	CTG GGC ACG A	70	11	11	480-1.700
X-03	TGG CGC AGT G	70	9	9	500-2.072
X-11	GGA GCC TCA G	70	12	11	400-2.072
W-01	CTC AGT GTC C	60	9	9	400-2.200
W-02	ACC CCG CCA A	70	11	11	300-2.072
W-03	GTC CGG AGT G	70	10	10	400-2.500
W-04	CAG AAG CGG A	60	8	8	400-2.172
W-08	GAC TGC CTC T	60	9	9	350-1.500
W19	CAA AGC GCT C	60	13	12	200-2.100
Total	-	-	107	105	200-2.500

Todos os *primers* selecionados produziram diferentes padrões de fragmentos RAPD para as três populações. O número de fragmentos nítidos e reproduzíveis gerados por *primer* nos três estoques variaram de oito a 15 e o tamanho desses produtos amplificados permaneceu entre 200-2500 pb. Não foram encontrados fragmentos exclusivos para as três populações avaliadas. Dos 107 locos analisados para os dez *primers* randômicos, 105 foram polimórficos (98,1%) e dois monomórficos (1,9%).

Valores semelhantes quanto ao número de *primers* utilizados e polimorfismo genético foram encontrados por Prioli et al. (2002) que com dez *primers*, obtiveram 87 locos, com um total de 90,0% de polimorfismo para o gênero *Astyanax*. Oliveira et al. (2002), trabalhando com populações de gênero *Steindachnerina* identificou valores semelhantes de número de *primers* e número e tamanho de fragmentos, e, com nove *primers*, obteve um número de fragmentos que variou de oito a 16 e o tamanho dos produtos amplificados permaneceu entre 330-2400 pb; destes, 76 fragmentos foram polimórficos. Dados superiores foram encontrados por Almeida et al. (2003) que, analisando populações de *Pimelodus maculatus*, obtiveram o total de 210 locos utilizando 15 *primers*, variando de seis a 19 locos. Valores inferiores de polimorfismo foram encontrados por Lopera-Barrero (2005) que, trabalhando com estoques de piracanjuba (*Brycon orbignianus*), encontrou um total de 87 fragmentos, dos quais 61 locos eram polimórficos (70,11%); por Povh et al.

(2005) que, tabalhando com linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), obtiveram 90 locos com nove *primers*, dos quais 50% dos locos eram polimórficos e por Foresti et al. (2001) que, trabalhando com estoques de reprodutores de curimatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) obtiveram 78,94 e 45,45% de porcentagem de locos polimórficos para estas espécies, respectivamente.

### Variabilidade genética

A porcentagem de fragmentos polimórficos e os valores do índice de Shannon dos estoques de reprodutores da Duke Energy International (A), da piscicultura de Rolândia (B) e de larvas fornecidas pelo Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C) estão apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Porcentagem de fragmentos polimórficos e índice de Shannon dos estoques de reprodutores e larvas de piapara (*Leporinus elongatus*), obtidos pelo programa Poppene 1.31.

**Table 2.** Polymorphic loci percentage and Shannon index of piapara (*Leporinus elongatus*) reproducers and larvae stocks, obtained using the Poppene 1.31 software.

Populações Populations	% de Fragmentos Polimórficos Polymorphic loci percentage	Índice de Shannon Shannon index
A	88,8%	0,4470
B	85,1%	0,4394
C	81,3%	0,4086

A porcentagem de fragmentos polimórficos foi superior para o estoque A (88,8%), quando comparado ao estoque B (85,1%) e C (81,3%). Porém, todos valores foram elevados, indicando alta variabilidade. Dessa forma, a ausência de seleção e o controle da seleção não-intencional foram eficientes para preservar a diversidade genética dos reprodutores.

Segundo Pineda (2004), os peixes cultivados em ambientes controlados podem estar expostos à diminuição da sua variabilidade genética, pelo cruzamento de indivíduos geneticamente aparentados e por práticas de manejo inadequadas, ocasionando homogeneização do componente genético dos descendentes. Os resultados deste trabalho indicam que a variabilidade genética obtida pela porcentagem de fragmentos polimórficos foi alta, denotando que as condições de manejos realizados para as duas populações-estoques e para a de larva têm garantido a manutenção da variabilidade genética.

Chiari e Sodré (2001) também estudaram espécies da família Anostomidae e encontraram valores inferiores de variabilidade genética pela porcentagem de fragmentos polimórficos (29,3 a 58,7%). Oliveira (2004), analisando relações

genéticas entre populações do gênero *Cicla* introduzidas na bacia do rio Paraná, encontrou baixos valores percentuais de fragmentos polimórficos dentro de populações, com valores entre 0 e 42,2%, evidenciando baixa variabilidade genética intrapopulacional. A proporção de fragmentos polimórficos encontrada por Almeida *et al.* (2003) também foi inferior à encontrada (60,2; 51,9 e 52,4%) para *Pimelodus maculatus* no baixo, médio e alto rio Tietê, respectivamente.

Os valores de índice de Shannon encontrados foram superiores para o estoque A (0,4470), enquanto que para os estoques B e C os valores foram 0,4394 e 0,4086, respectivamente. Estes valores indicam, do mesmo modo que a porcentagem de locos polimórficos, que a variabilidade genética dos três estoques foi elevada. Pode-se afirmar também que ocorreu alta diversidade genética intrapopulacional.

Prioli (2001) encontrou valores superiores de índice de Shannon estudando espécies naturais do gênero *Astyanax*, em que a estimativa da diversidade genética foi de 0,5114 para amostras da população da bacia do rio Paraná e de 0,5257 para a população amostrada no rio Iguazu. Segundo o autor, as populações também indicavam níveis semelhantes nas duas bacias hidrográficas. Panarari (2003), estudando populações naturais de corvina (*Plagioscion squamosissimus*), encontrou menores valores de índice de Shannon com valores de 0,0269 para a população de Porto Rico, 0,0481 para a do reservatório de Itaipu e 0,0792 para a de Tocantins.

Já Lopera-Barrero (2005), trabalhando com populações cultivadas de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), também encontrou valores de índice de Shannon semelhantes para as populações de Castilho (0,3184) em relação aos indivíduos da sua progênie (0,3433) e para a população de Porto Ferreira, indicando que a variabilidade genética das populações é muito semelhante e é mantida na progênie. Povh *et al.* (2005) também, estudando populações estocadas, encontraram menores valores de índice de Shannon em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*), com valores de 0,1040 para a linhagem Bouaké da geração de reprodutores de 1997, 0,068 para a Bouaké de 2002, 0,198 para a Chitralada de 1997 e 0,2140 para a Chitralada de 2002.

Os valores de diversidade genética entre os estoques ( $G_{st}$ ) e o número de migrantes por geração ( $N_m$ ) são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Valores de diversidade genética entre os estoques ( $G_{st}$ ) e o número de migrantes por geração ( $N_m$ ) para os estoques de reprodutores e larvas de piapara (*Leporinus elongatus*) da Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C), obtidos pelo programa Popgene 1.31.

**Table 3.** Genetic diversity values between stocks ( $G_{st}$ ) and number of migrants per generation ( $N_m$ ) for the piapara (*Leporinus elongatus*) reproducers and larvae stocks, from the Aquaculture and Hydrology Duke Energy International Station (A), Rolândia fish farm (B) and River Restocking Program of Paraná (C), obtained using the Popgene 1.31 software.

Populações Populations	$G_{st}$ Genetic diversity values between stocks		$N_m$ Number of migrants per generation
	Teta	$\chi^2$	
A x B	0,0234	2,6676	20,8801
A x C	0,1224	13,464	3,5834
B x C	0,1199	13,4288	3,6706

A diversidade genética entre populações ( $G_{st}$ ), parâmetro que mede o grau de diferenciação entre populações, foi mais elevada entre os estoques A x C (0,1224), enquanto que entre os estoques A x B e B x C os valores encontrados foram 0,0234 e 0,1199, respectivamente. Segundo Wright (1978), valores de Teta, que correspondente ao  $G_{st}$ , de 0,00 a 0,05 indicam baixa diferenciação genética, valores de 0,05 a 0,15 indicam média diferenciação genética e valores de 0,15 a 0,25 indicam alta diferenciação genética, portanto, os valores obtidos indicam que houve baixa diferenciação genética entre os estoques A x B e média diferenciação entre os estoques A x C e B x C. Pelo teste de  $\chi^2$ , o  $G_{st}$  foi significativo entre os estoques A x C e B x C e não-significativo entre A x B. Tal resultado reflete pequena heterogeneidade entre os estoques estudados.

Galdino *et al.* (2002) também encontraram moderada diferenciação genética entre populações nativas de *Pseudoplatystoma corruscas* (valores variando de 0,030 a 0,112), *Leporinus elongatus* (0,1492) e *Hemisorubim platyrhynchos* (0,08), situadas no alto rio Paraná e reservatório de Itaipu. Segundo os autores, embora em níveis baixos, foi detectada diferenciação genética entre as populações de *P. corruscas* e *L. elongatus*, não sendo detectada entre as populações de *H. platyrhynchos*. Sekine *et al.* (2002) também, trabalhando com populações nativas de *P. corruscas* do alto rio Paraná e reservatório de Itaipu, encontraram valores de diferenciação genética moderada, sendo 0,090 a 0,112, respectivamente.

O número de migrantes por geração foi maior entre os estoques A x B (20,8801), enquanto que entre os estoques A x C (3,5834) e B x C (3,6706) o fluxo gênico foi inferior. De acordo com o elevado fluxo gênico encontrado neste trabalho, sugere-se que os estoques A x B tiveram origem comum, o que justificaria a baixa diferenciação genética e o elevado fluxo gênico entre os estoques A x B e o moderado nível de diferenciação genética encontrado entre A x C e B x C.

Semelhantemente, Sekine *et al.* (2002) constataram que o fluxo de genes foi um fator ativo contra a diferenciação genética entre populações de *P. corruscans* do alto rio Paraná, reservatório de Itaipu e da jusante de Yacyretá (2,0 a 8,1 migrantes por geração).

### Divergência genética

Os dados de distância genética de Nei (1972), calculados para os três estoques de piarara (*Leporinus elongatus*), estão apresentados na Tabela 4.

**Tabela 4.** Matriz da distância genética de Nei (1972) entre os estoques de piarara (*Leporinus elongatus*) da Estação de Aquicultura e Hidrologia Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C), obtidos pelo programa Popgene 1.31.

**Table 4.** Nei matrix genetic distance (1972) among piarara (*Leporinus elongatus*) stocks from the Aquaculture and Hydrology Duke Energy International Station (A), Rolândia fish farm (B) and the River Restocking Program of Paraná (C), obtained using the Popgene 1.31 software.

Populações Populations	A	B	C
A	-		
B	0,0202	-	
C	0,1174	0,1137	-

A distância de Nei leva em conta tanto os fragmentos polimórficos quanto os monomórficos e é apropriada para casos de processos evolutivos longos, em que a divergência entre as populações ocorreu por deriva genética ou mutação (Weir, 1990), e seu valor é proporcional ao tempo de divergência por locus e por geração (Dias, 1998).

Os valores de distância genética de Nei (1972) encontrados indicam que os estoques A x B são menos distantes geneticamente (0,0202), enquanto que para os estoques A x C e B x C as distâncias foram maiores, cujos valores foram 0,1174 e 0,1137, respectivamente. Tais dados são evidenciados por meio do dendrograma da distância genética, baseado em Nei (1972), ilustrado na Figura 1.



**Figura 1.** Dendrograma baseado nos complementos aritméticos dos coeficientes de similaridade de Nei (1972), obtidos com marcadores RAPD. Os indivíduos dos estoques de *L. elongatus*, da Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International (A), piscicultura de Rolândia (B) e do Programa de Repovoamento dos rios do Paraná (C) foram agrupados pelo método UPGMA, obtidos pelo programa Popgene 1.31.

**Figure 1.** Dendrogram based on the arithmetical complements of Nei similarity coefficients (1972), obtained with the RAPD markers. The individuals from the *L. elongatus* stocks, from the Aquaculture and Hydrology Duke Energy International Station (A), Rolândia fish farm (B) and the River Restocking Program of Paraná (C), were grouped by the UPGMA method, obtained using the Popgene 1.31 software.

Galdino *et al.* (2002) também estudaram a espécie *Leporinus elongatus* e encontraram 0,0648 como valor de distância genética entre as populações à montante e jusante do rio Paraná, indicando que os saltos de Sete Quedas eram uma barreira que promovia, ao menos parcialmente, o isolamento reprodutivo entre essas populações. Prioli *et al.* (2005), estudando três populações do gênero *Steindachnerina* (com mácula, sem mácula e mácula com coloração intermediária) da planície de inundação do alto rio Paraná, encontraram grande distância genética entre as populações com mácula e sem mácula e baixa distância entre as populações com mácula e intermediária.

### Conclusão

A técnica de RAPD pode ser empregada para o monitoramento genético, obtendo-se informações sobre a estimativa da variabilidade e da divergência genética dentro e entre estoques de peixe, com intuito de melhorar a produtividade em programas de seleção e repovoamento.

A variabilidade genética estimada pela técnica de RAPD nos estoques de piarara (*L. elongatus*), coletados na Estação de Aquicultura e Hidrologia da Duke Energy International, do estoque fornecido pela piscicultura de Rolândia e do fornecido pelo Programa de Repovoamento dos rios do Paraná é alta nos três estoques e a divergência genética entre os estoques é grande.

### Referências

- ALMEIDA, F.S. *et al.* Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.
- BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, London, v. 75, p. 117-123, 1994.
- BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp brood stocks by RAPD and microsatellite markers. *Aquaculture*, Amsterdam, v. 219, p. 157-167, 2003.
- BIRSTEIN, V.J. *et al.* Molecular identification of *Acipenser sturio* specimens: A warning note for recovery plants. *Biol. Conserv.*, Essex, v. 84, p. 97-101, 1998.
- BORGHETTI, N.R.B. *et al.* *Aquicultura: uma visão geral sobre a produção de organismos aquáticos no Brasil e no mundo.* Curitiba: Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais, 2003.
- CHIARI, L.; SODRÉ, L.M.K. Study of eight species of the Anostomidae family (Pisces Characiformes) by RAPD analysis. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 445-451, 2001.
- DIAS, L.A.S. Análises multidimensionais. In: ELETROFORESE de isoenzimas e proteínas afins: fundamentos e aplicações em plantas e microorganismos. Viçosa: UFV, 1998. p. 405-476.

- FAO-Food and Agriculture Organization. *O estado da aquicultura mundial em 2006*. Nova Déli: FAO Information Division, 2006.
- FILHO, T.; RIBEIRO, A. *Piscicultura ao alcance de todos*. São Paulo: Nobel, 1991.
- FORESTI, F. *et al.* Análise genética de estoques de reprodutores de curimbatá (*Prochilodus lineatus*) e pacu (*Piaractus mesopotamicus*) da Estação de Piscicultura de Promissão, utilizando marcadores de RAPD. In: CONGRESSO DE INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM ENERGIA ELÉTRICA, 1., 2001, Brasília. *Anais...* Brasília: Aneel, 2001.
- GALDINO, J.C. *et al.* Distância genética entre populações de *Leporinus elongatus* (Characiformes), *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes), *Hemisorubim platyrhynchos* (Siluriformes) isoladas por Sete Quedas. 2002. Disponível em: <[http://www.peld.uem.br/relat2002/pdf/comp\\_biotico\\_distncia.pdf](http://www.peld.uem.br/relat2002/pdf/comp_biotico_distncia.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2006.
- KOTOULAS, G. *et al.* Population genetics and fisheries management: the case of the swordfish, *Xiphias gladius*. In: HELLENIC SYMPOSIUM ON OCEANOGRAPHY AND FISHERIES, 5., 1997, Kavala. *Proceedings...* Kalava: [s.n.], 1997. p. 75-78.
- LOPERA-BARRERO, N.M. *Diversidade genética de populações de piracanjuba (Brycon orbignyanus), com a técnica de RAPD*. 2005. Dissertação (Mestrado em Zootecnia)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.
- LOVSHIN, L.L. Tilapia culture in Brazil. In: COSTA-PIERCE, B.A.; RAKOCY, J.E. (Ed.). *Tilapia aquaculture in the Americas*. Louisiana: The World Aquaculture Society, 2000. v. 2, p. 133-140.
- MARTINS, C. *et al.* Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2003.
- McCONNELL, S.K.J. *et al.* Molecular loci reveal highly significant genetic differentiation among Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks from the east coast of Canada. *Mol. Ecol.*, Oxford, v. 6, p. 1075-1089, 1997.
- MILACH, S. Principais tipos de marcadores moleculares e suas características. In: MILACH, S.C.K. (Ed.). *Marcadores moleculares em plantas*. Porto Alegre: Sandra Milach, 1998. p. 17-28.
- MOREIRA, H.L.M. *et al.* *Fundamentos da moderna aquicultura*. Canoas: Ulbra, 2001.
- MOREIRA, H.L.M. *et al.* The use of RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA) for genetic monitoring in breeding programs of tilapia. In: WORLD AQUACULTURE, 2003, Salvador. *Abstracts...* Salvador: INVE, 2003. v. 2, p. 460.
- NEI, M. Genetic distance between populations. *Am. Naturalist*, Chicago, v. 106, p. 283-292, 1972.
- NELSON, J.S. *Fishes of the world*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1994.
- OLIVEIRA, A.V. *et al.* Diversidade e distância genética em populações do gênero *Steindachnerina* na planície de inundação do alto rio Paraná. In: WORKSHOP - PELD - A PLANÍCIE ALAGÁVEL DO ALTO RIO PARANÁ, 2002, Maringá. *Anais...* Maringá: Eduem, 2002. v. 1.
- OLIVEIRA, A.V. *Relações genéticas entre populações do gênero Cichla Schneider, 1801 (Perciformes: Cichlidae) introduzidas na bacia do rio Paraná, evidenciadas por marcadores nucleares e do genoma mitocondrial*. 2004. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2004.
- PANARARI, R.S. *Variabilidade e estrutura genética de populações de Plagioscion squamosissimus (Perciformes, Sciaenidae) da bacia do rio Paraná*. 2003. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2003.
- PINEDA, H. estudio genético de las cachamas (subfamilia Serrasalminae) en poblaciones naturales y en cautiverio en Colombia. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, Medellín, v. 17, p. 62-63, 2004. Supl.
- POLICANSKY, D.; MAGUSON, J.J. Genetics, metapopulations, and ecosystem management of fisheries. *Ecol. Appl.*, Tempe, v. 8, n. 1, p. 119-123, 1998.
- POVH, J.A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 27, n. 1, p. 1-10, 2005.
- PRIOLI, S.M.A.P. *Relações genéticas e filogenéticas entre espécies do gênero Astyanax do rio Iguazu, analisada por marcadores de DNA mitocondrial e RAPD*. 2001. Tese (Doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos e Continentais)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.
- PRIOLI, S.M.A. *et al.* Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguazu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genet. Mol. Biol.*, Ribeirão Preto, v. 25, n. 4, p. 421-432, 2002.
- PRIOLI, A.J. *et al.* Caracterização molecular de populações de *Steindachnerina* (Pisces, Characiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2005, Guarapuava. *Anais...* Guarapuava: Unicentro, 2005.
- REIS, R.E. *et al.* *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs, 2003.
- SEKINE, E.S. *et al.* Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. *Acta Sci. Anim. Sci.*, Maringá, v. 24, n. 2, p. 507-512, 2002.
- WEIR, B.S. *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. Sunderland: Sinauer, 1990.
- WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.*, Oxford, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- WRIGHT, S. *Evolution and genetics of populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978.
- YEH, F.C. *et al.* *Version 131: Microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis*. Alberta: University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999.

Received on April 19, 2007.

Accepted on June 02, 2008.