

# CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ESTOQUES DE *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae), UTILIZADOS EM PROGRAMAS DE REPOVOAMENTO: IMPORTÂNCIA PARA A CONSERVAÇÃO DA ICTIOFAUNA E DO ECOSISTEMA

*GENETIC CHARACTERIZATION OF Prochilodus lineatus (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) STOCKS, USED IN STOCKING PROGRAMS: IMPORTANCE FOR THE ICTHYOFAUNA CONSERVATION AND ECOSYSTEM*

**Nelson Maurício Lopera BARRERO<sup>1</sup>; Ricardo Pereira RIBEIRO<sup>2</sup>; Lauro VARGAS<sup>2</sup>; Jayme Aparecido POVH<sup>3</sup>; Patrícia Cristina GOMES<sup>1</sup>; Claudete Aparecida MANGOLIN<sup>2</sup>; Karla Marielli Oliveira BOSO<sup>4</sup>; Thiago GUALDA<sup>4</sup>**

1. Doutorando em Zootecnia, Centro de Ciências Agrárias – CCA, Universidade Estadual de Maringá – UEM, Maringá, PR, Brasil. [Nelson.peixegen@gmail.com](mailto:Nelson.peixegen@gmail.com); 2. Professor, Doutor, CCA – UEM; 3. Professor, Doutor, Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, MT, Brasil; 4. Graduando em Zootecnia, CCA – UEM.

**RESUMO:** Alterações ambientais provocadas pelas mudanças climáticas e principalmente por ações humanas têm reduzido populações naturais de peixes nos últimos anos. Os programas de repovoamento têm sido utilizados como forma de conservação, porém, sem uma correta orientação científica essas medidas podem gerar distúrbios sobre a diversidade genética da ictiofauna e sobre o ecossistema. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de dois estoques de alevinos de *Prochilodus lineatus* utilizados em programas de repovoamento, mediante o marcador molecular RAPD. Foram analisados 60 alevinos (estoque A e B) de uma piscicultura localizada no município de Rolândia, PR (Brasil). Os sete iniciadores selecionados produziram um total de 77 fragmentos, dos quais 81,82% foram polimórficos. Os valores de variabilidade genética estimados pela porcentagem de fragmentos polimórficos (A= 83,12%; B= 81,82%) e pelo índice de diversidade genética de Shannon (A= 0,473; B= 0,463) mostraram que não existe uma alta diferenciação genética entre os dois estoques, possivelmente devido ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo. Este resultado foi corroborado com o valor de  $G_{st}$  (0,043), do dendrograma e da distância e identidade genética (0,967 e 0,034) que mostram uma baixa diferenciação genética entre eles. Os resultados deste estudo possibilitarão o correto manejo reprodutivo e genético dos estoques e a orientação objetiva de programas de repovoamento, permitindo a conservação da ictiofauna e dos ecossistemas impactados.

**PALAVRAS-CHAVE:** Curimba. Genética da conservação. Peixe. RAPD. Variabilidade genética.

## INTRODUÇÃO

O curimba *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), conhecido também como curimbatá, grumatã ou papa-terra (Characiformes: Prochilodontidae) é uma espécie migratória, de desova total, de fecundação externa sem cuidado parental e de hábito alimentar iliófago (FURUYA, 2001). É um peixe endêmico das bacias formadas pelos rios Paraná e Paraguai, que atualmente apresenta uma diminuição do número de populações naturais.

Vários são os fatores que têm influenciado na diminuição das populações naturais, sendo a contaminação dos rios (MONTEIRO et al., 2006), a construção de usinas hidrelétricas (AHO et al., 2006), a sobrepesca (POVH, 2007) e o ecoturismo mal planejado (METZGER; CASATTI, 2006) as principais.

Uma das ferramentas utilizadas na conservação da ictiofauna dos rios é a implantação

de programas de repovoamento. Apesar de esses programas serem aceitos pela sociedade (SIROL; BRITTO, 2006) e parte da comunidade científica, é primordial o seu monitoramento genético e biológico, já que o repovoamento pode representar riscos genéticos nas populações naturais (SØNSTEBØ; BORGSTRØM; HEUN, 2007) e no ecossistema, podendo conduzir uma espécie à extinção (AGOSTINHO; THOMAZ; GOMES, 2005).

Por isso, é necessário o desenvolvimento de manejos genéticos de progênies que direcionem os potenciais riscos genéticos para ações específicas do manejo, incluindo a seleção dos reprodutores, acasalamentos e práticas de criação e liberação. Para isso, as análises genéticas em estoques de pisciculturas representam informações importantes para conseguir resultados expressivos na produção e na conservação de peixes (LOPERA BARRERO, 2005), já que a perda de variabilidade genética em estoques de estações de piscicultura devido ao

inadequado manejo reprodutivo (FROST; EVANS; JERRY, 2006) ou por deficiências no número efetivo de reprodutores (AHO et al., 2006) pode produzir problemas de endogamia, adaptabilidade e sobrevivência de progênies usadas em programas de repovoamento (POVH et al., 2008).

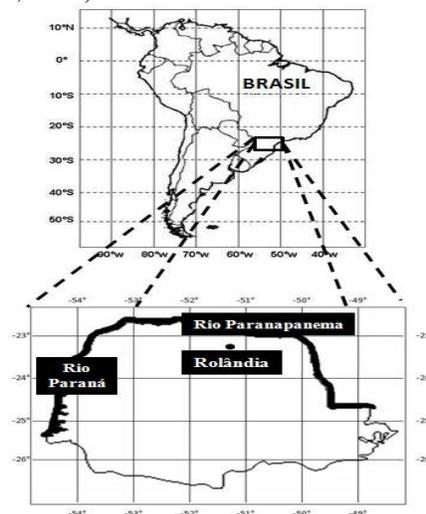
Os marcadores moleculares têm se mostrado eficientes na determinação da diversidade genética de populações naturais e estocadas utilizadas em programas de piscicultura ou de repovoamento dos rios. Entre os vários marcadores moleculares desenvolvidos nos últimos anos, o marcador RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) é um dos mais usados em estudos de genética de peixes (LIU; CORDES, 2004), devido ao seu alto potencial de detecção de polimorfismo (ALI et al., 2004).

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar a variabilidade genética de dois estoques de alevinos de *Prochilodus lineatus* utilizados em programas de repovoamento do rio Paraná, mediante o marcador molecular RAPD.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material Biológico

Foram coletadas 60 amostras de cada estoque de alevinos de *P. lineatus* (A e B), utilizados em programas de repovoamento do rio Paraná e provenientes de uma piscicultura localizada na cidade de Rolândia, PR (Figura 1).



**Figura 1.** Localização do estoque de reprodutores de *P. lineatus* e dos rios Paraná e Paranapanema no Estado do Paraná.

### Extração de DNA

Para extração de DNA foi utilizada a metodologia descrita Lopera-Barrero et al. (2008). Em microtubos contendo as nadadeiras, foram adicionados 550  $\mu\text{L}$  de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl e 1% SDS) e 7  $\mu\text{L}$  de proteinase K (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Foram incubadas em banho-maria a 50  $^{\circ}\text{C}$  por 12 horas. O DNA foi precipitado com 600  $\mu\text{L}$  de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novos microtubos (600  $\mu\text{L}$ ), precipitado com 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico absoluto e incubado por uma hora a -20  $^{\circ}\text{C}$ . O DNA foi centrifugado, lavado com 700  $\mu\text{L}$  de álcool etílico 70%, suspenso em 80  $\mu\text{L}$  de tampão TE (10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA) e tratado com 7  $\mu\text{L}$  de RNase (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em banho-maria a 37  $^{\circ}\text{C}$  por uma hora, e em seguida estocado no freezer a -20  $^{\circ}\text{C}$ .

### Quantificação e Amplificação do DNA

O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Shimadzu com absorvância de 260nm. As amostras foram diluídas para uma concentração de 10 ng/  $\mu\text{L}$ . Para conferir a qualidade do DNA, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1%, conduzida em tampão TBE 1X (500 mM Tris-HCl, 60 mM ácido bórico e 83 mM EDTA) por uma hora a 70 volts.

As condições de amplificação foram baseadas nos procedimentos descritos por Williams et al. (1990), com modificações. O DNA foi amplificado em um volume de reação de 15  $\mu\text{L}$ , no qual se utilizou tampão 1X Tris-KCl, 2,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,46  $\mu\text{M}$  iniciador, 0,2 mM de cada dNTP, uma unidade de Platinun Taq DNA Polimerase (Invitrogen®, EUA), e 10 ng de DNA alvo. O DNA foi desnaturado a 94  $^{\circ}\text{C}$  por quatro min e em seguida foram realizados 40 ciclos, cada um consistindo de:

um min de desnaturação a 94 °C, 90 seg de anelamento do iniciador a 40 °C e dois min para extensão a 72 °C. Após realizou-se uma extensão final a 72 °C por cinco min. As reações de RAPD foram amplificadas em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (EUA).

Foi avaliada a amplificação de 60 diferentes iniciadores 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 15 µL do produto amplificado e 2 µL de tampão de amostra (40% sacarose e 0,25% azul de bromofenol) em eletroforese horizontal. A eletroforese foi conduzida em tampão TBE 0,5X (45 mM Tris-Borato e 1 mM EDTA) por quatro horas a 70 volts. Os géis de quantificação e amplificação foram visualizados sob radiação UV, depois da sua exposição com brometo de etídio (0,5 µg/ mL) por uma hora. A imagem foi fotografada utilizando o programa Kodak EDAS (Kodak 1D Image Analysis 3.5, EUA).

### Análise Estatística

O tamanho dos fragmentos obtidos com as amplificações foi estimado por comparação com o padrão ladder 100 pb (Invitrogen®, EUA). A presença ou ausência de fragmentos de tamanhos moleculares idênticos foi usada para a construção de uma matriz de similaridade com base no cálculo no coeficiente de similaridade de Jaccard, codificando 1 como presença de fragmento e 0 como sua ausência.

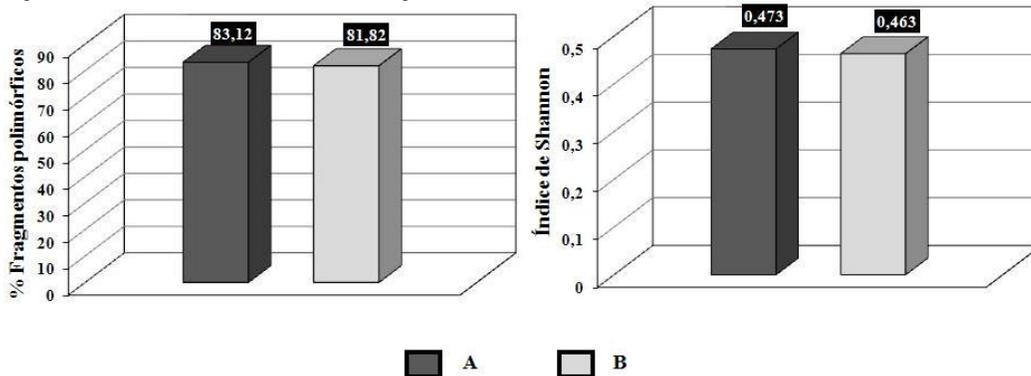
A variabilidade genética dos reprodutores e das progênes foi determinada pelo índice de diversidade genética de Shannon e pela porcentagem de fragmentos polimórficos. A diferenciação genética entre os estoques foi determinada pelo cálculo de Nei (1973) ( $G_{ST}$ ). Para a determinação do nível de diferenciação se

estabeleceu a definição proposta por Wright (1978), onde valores entre 0,00 a 0,05; 0,05 a 0,15; 0,15 a 0,25 e > 0,25 indicaram pequena, moderada, alta e elevada diferenciação genética. Essas análises estatísticas junto com a determinação da distância e identidade genética foram determinados através do programa PopGene 1.31 (YEH; BOYLE; XIYAN, 1999). A matriz do coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de agrupamento UPGMA foram utilizados para elaborar um dendrograma, utilizando o programa estatístico NTSYS 1.7 (ROHLF, 1989).

### RESULTADOS E DISCUSSÃO

A amplificação das amostras de *P. lineatus* com os iniciadores selecionados OPA01 (5'-CAGGCCCTTC-3'), OPW02 (5'-ACCCCGCCAA-3'), OPW03 (5'-GTCCGGAGTG-3'), OPW08 (5'-GACTGCCTCT-3'), OPW13 (5'-CACAGCGACA-3'), OPW19 (5'-CAAAGCGCTC-3') e OPX01 (5'-CTGGGCACGA-3') utilizando o marcador molecular RAPD, gerou um total de 77 fragmentos dos quais 63 foram polimórficos (81,82%). O número de fragmentos variou de nove (OPW08 e OPW19) até 13 (OPA01 e OPW02), com um tamanho entre 350 pb (OPA01, OPW03 e OPX01) e 2200 pb (OPA01 e OPX01).

A porcentagem de fragmentos polimórficos (LEUZZI et al., 2004; SOFIA et al., 2006) e o índice de diversidade genética de Shannon (LOPERA-BARRERO, 2005; GOMES, 2007) têm sido utilizados com sucesso na estimação de níveis de diversidade genética em estoques e populações naturais de peixes neotropicais. Neste estudo, essas estimativas mostraram que apesar dos estoques apresentarem uma alta variabilidade genética intrapopulacional, não existe uma alta diferenciação genética entre eles (Figura 2). Assim, a utilização dessas estimativas foi eficiente para determinar a variabilidade genética dos estoques avaliados.



**Figura 2.** Porcentagem de fragmentos polimórficos e índice de diversidade genética de Shannon obtidos para os estoques (A e B) de *P. lineatus*.

A baixa diferenciação genética encontrada entre os estoques é possivelmente devida ao efeito fundador. Normalmente no momento da formação dos estoques de reprodutores existe uma pressão de seleção sobre indivíduos com características visuais favoráveis (de maior tamanho e com melhores condições reprodutivas), o que pode levar ao aparecimento do efeito boca de garrafa (*bottleneck effect*) o qual promove o aparecimento de endogamia (AHO et al., 2006), e em conseqüência ocasionará uma perda de variabilidade genética e um aumento da correlação negativa entre a similaridade genética e o número de gerações (FREITAS; GALETTI JR, 2005). Isto pode afetar as progênes que serão utilizadas na formação de novos estoques e aquelas destinadas para programas de repovoamento.

Outro fator que pode ter influenciado é o manejo reprodutivo. Alguns autores têm relatado que a diminuição da variabilidade genética em estações de piscicultura é normalmente irreversível (WASKO et al., 2004; SEKINO et al., 2004).

Porém, com um adequado manejo reprodutivo que implique a formação de estoques com suficiente variabilidade genética, a introdução de reprodutores geneticamente divergentes e de diferentes origens (FREITAS; GALETTI JR, 2005) e a utilização de sistemas reprodutivos e de acasalamentos eficientes (POVH, 2007), é possível manter o pool genético de estoques mantidos em cativeiro e de aqueles utilizados com fines de repovoamento.

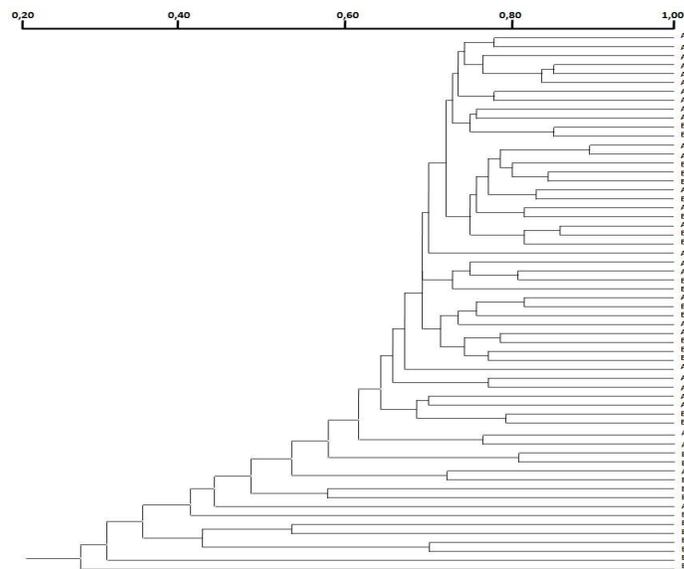
Nos resultados encontrados no presente estudo, observou-se que possivelmente esses fatores influenciaram na variabilidade genética dos estoques de alevinos de *P. lineatus*, pois apesar destes serem oriundos de lotes de reprodutores de diferentes origens (reprodutores do estoque A: rio Paraná e do estoque B: rio Paranapanema) foi encontrada uma baixa diferenciação genética. Estes resultados foram corroborados pelo valor de  $G_{st}$  (0,043) e pelos valores de distância e identidade genética que mostram uma pequena diferenciação e uma menor distância genética entre os estoques A e B (Quadro 1).

**Quadro 1.** Identidade genética (acima da diagonal) e distância genética (abaixo da diagonal) dos estoques de alevinos A e B de *P. lineatus*.

Estoques	A	B
A	****	0,967
B	0,034	****

O dendrograma de similaridade coincide com estes resultados, já que não caracterizou a

formação de agrupamentos para os dois estoques (Figura 3).



**Figura 3.** Dendrograma de similaridade genética para os estoques de alevinos A e B de *P. lineatus*.

A diminuição da variabilidade genética pode tornar um programa de repovoamento

ineficiente (baixa sobrevivência dos alevinos no ambiente aquático) e proporcionar impactos

genéticos irreversíveis nas populações naturais (POVH et al., 2008) que podem provocar a extinção das espécies. Segundo Sønstebø, Borgstrøm e Heun (2007) e Melo et al. (2006), o acasalamento de indivíduos geneticamente distintos a aqueles encontrados numa população natural pode promover a perda de genes importantes de adaptabilidade ao ambiente, o que vai influenciar conseqüentemente na sobrevivência de progênies no ambiente natural.

A partir destas evidências e dos resultados de variabilidade, distância e identidade genética, pode-se sugerir que o manejo reprodutivo, genético e de melhoramento dos estoques A e B de *P. lineatus* devem ser realizados de maneira homogênea e não como estoques diferentes, especialmente quando o objetivo seja a formação de novos estoques de reprodutores ou a sua utilização em programas de conservação de populações naturais desta espécie mediante o repovoamento.

Da mesma forma, para manter a variabilidade genética dos estoques de reprodutores dos quais são oriundos estes alevinos, é necessária a introdução de novo material genético (reprodutores), os quais podem ser coletados a partir de populações naturais geneticamente diferentes dos rios Paraná ou Paranapanema ou também com o intercâmbio de reprodutores de outras estações de piscicultura. Assim, a correta seleção dos reprodutores que serão utilizados na formação de um estoque e o monitoramento genético destes e suas progênies podem oferecer bases importantes para formular estratégias de manejo reprodutivo (SØNSTEBØ; BORGSTRØM; HEUN, 2007), as quais permitirão um intercâmbio de reprodutores entre pisciculturas e dessa forma fragmentar ciclos de endogamia que são comuns em ambientes controlados (MOREIRA et al., 2007) e que definirão a conservação de uma espécie e seu futuro potencial biológico (MELO et al., 2006). Segundo Hansen et al. (2001), geralmente um pequeno número efetivo de reprodutores e a falta de monitoramento dos programas de criação são as maiores causas da perda de diversidade genética na piscicultura. Por isso, é importante entender a distribuição da diversidade genética dentro de um estoque de reprodutores para obter um bom manejo reprodutivo (ZHU et al., 2006) e assim viabilizar a manutenção da diversidade genética nas progênies.

As espécies de importância comercial e especialmente aquelas ameaçadas de extinção como é o caso do *P. lineatus*, requerem um constante monitoramento genético de suas populações naturais, o que é fundamental para o manejo de estoques mantidos nas pisciculturas ao longo do tempo (RAMELLA et al., 2006). Poucos estudos

avaliando estoques de *P. lineatus* destinados para programas de repovoamento têm sido realizados. Lopera-Barrero et al. (2007) analisando um estoque de reprodutores e sua progênie, encontraram que houve uma redução da variabilidade genética (porcentagem de fragmentos polimórficos = 86% e 78%, respectivamente) devido ao manejo deficiente da reprodução e ao efeito fundador. O autor ainda conclui que num programa de piscicultura bem planejado, devem-se evitar mudanças genéticas associadas ao manejo reprodutivo e à formação de estoques (efeito fundador), sendo necessário um contínuo monitoramento genético das populações naturais de dos estoques.

Por isso, a primeira providência a ser tomada na implantação de programas de repovoamento, como é o caso dos estoques de *P. lineatus* analisados neste estudo, é verificar a diversidade genética deles, das progênies e das populações naturais em todos os períodos do ano, evitando a perda de variabilidade genética e de adaptabilidade nas populações naturais de peixes e ao mesmo tempo verificando a eficácia deste tipo de programa de conservação e seus possíveis efeitos adversos na ictiofauna e no ecossistema. Igualmente, Sirol e Britto (2006) enfatizam que a definição de quais espécies de peixes devem ser repovoadas, deve basear-se na sua importância sócio/cultural no ambiente e principalmente na capacidade de formar uma população sustentável, que não afete o ciclo de vida de outras espécies nem a biodiversidade do ecossistema.

Além do monitoramento da variabilidade genética e da estrutura genética de todas as populações de peixes presentes no ambiente aquático, fatores como a preservação da mata ciliar, a proteção dos rios, o controle da pesca, a correta fiscalização dos rios e a participação da sociedade e das entidades públicas e privadas devem ser considerados para alcançar a conservação do ecossistema e o sucesso dos programas de repovoamento.

Com os resultados obtidos neste estudo foi possível obter um perfil dos estoques de alevinos desta piscicultura, sua caracterização genética e a objetiva orientação genética e reprodutiva que vão permitir uma correta conservação do *P. lineatus* mediante o uso de programas de repovoamento e do ecossistema. Para isso, o marcador molecular RAPD foi eficaz e ofereceu bons resultados.

## CONCLUSÕES

A variabilidade genética entre os estoques de alevinos de *P. lineatus* teve uma baixa

diferenciação genética, devido possivelmente ao efeito fundador e ao manejo reprodutivo.

Os resultados deste estudo possibilitarão o correto manejo reprodutivo e genético dos estoques

e a orientação objetiva de programas de repovoamento, permitindo a conservação da ictiofauna e dos ecossistemas impactados.

---

**ABSTRACT:** Environmental alterations caused by the climatic changes and mainly for human actions, it has been reducing fish natural populations in the last years. The stocking programs have been used as conservation form, however, without a correct scientific orientation those measured can generate disturbances about the genetic diversity of the ichthyofauna and on the ecosystem. The objective of this study was to analyze the genetic diversity of two juvenile *Prochilodus lineatus* stocks used in stocking programs, by the RAPD molecular marker. Sixty juvenile (A and B stocks) of a fish farm located in the Rolândia Municipal District, PR (Brazil) were analyzed. The seven primers selected produced a total of 71 fragments, of which 89.44% were polymorphic. The genetic variability values estimated by the percentage of polymorphic fragments (A = 83.12%; B = 81.82%) and for the genetic diversity of Shannon index (A = 0.473; B = 0.463) showed that a high genetic differentiation doesn't exist among the two stocks, possibly due to the founder effect and the reproductive management. This result was corroborated with the  $G_{st}$  value (0.043), of the dendrogram and of the distance and genetic identity (0.967 and 0.034) that show a low genetic differentiation among them. The results of this study will make possible the correct reproductive and genetic management stocks and the objective orientation at of stocking programs, allowing the ichthyofauna and the impact ecosystems conservation.

**KEYWORDS:** Conservation genetics. Curimba. Fish. Genetic variability. RAPD.

---

## REFERÊNCIAS

AGOSTINHO, A. A.; THOMAZ, S. M.; GOMES, L. C. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. **Conservation Biology**, Boston, 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**, Amsterdam, v. 253, n. 1-4, p. 244-248, 2006.

ALI, B. A.; HUANG, T. H.; QIN, D. N.; WANG, X. M. A review of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in fish research. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, London, v. 14, n. 4, p. 443-453, 2004.

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**, Nairobi, 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**, Amsterdam, v. 261, n. 3, p. 1056-1064, 2006.

FURUYA, W. M. Espécies nativas. In: MOREIRA, H. L. M.; VARGAS, L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. (Ed.). **Fundamentos da Moderna Aqüicultura**. Canoas, ULBRA, 2001. p. 83-90.

GOMES, P. C. **Diversidade genética de três populações de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando marcadores moleculares**. 2007. 75 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

HANSEN, M. M.; RUZZANTE, D. E.; NIELSEN, E. E.; MENSBERG, K. L. D. Brown trout (*Salmo trutta*) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. **Ecological Applications**, Washington, v. 11, n. 1, p. 148-160, 2001.

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

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 238, n. 1-4, p. 1-37, 2004.

LOPERA BARRERO, N. M.. **Diversidade genética de populações de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) com a técnica de RAPD**. 2005. 45 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2005.

LOPERA-BARRERO, N. M.; POVH, J. A.; GUALDA, T.; VARGAS, L.; LOPES, T. S.; BOSO, K. Monitoramento genético de estoques de curimba (*Prochilodus lineatus*) mantidos em ambientes controlados e destinados para programas de repovoamento. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 44, 2007, Jaboticabal. **Anais...Jaboticabal: UNESP**, 2007. CD ROM.

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 sal (NaCl). **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 15-24, 2008.

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**, Belo Horizonte, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.

METZGER, J. P.; CASATTI, L. Do diagnóstico à conservação da biodiversidade: o estado da arte do programa BIOTA/FAPESP. **Biota Neotropica**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 1-23, 2006.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v. 143, n. 2, p. 141-149, 2006.

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**, Brasília, v. 42, n. 4, p. 521-526, 2007.

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

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

POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI JR, E.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 25-35, 2008.

RAMELLA, M. S.; KROTH, M. A.; MEURER, S.; NUÑER, A. P. O.; ZANIBONI FILHO, E.; ARISI, A. C. M. Genetic Variability in four fish species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. **Brazilian Archives of Biology and technology**, Curitiba, v. 49, n. 4, p. 589-598, 2006.

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

SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 233, n. 1-4, p. 163-172, 2004.

SIROL, R. N.; BRITTO, S. G. Conservação e manejo da ictiofauna: repovoamento. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. (Ed.). **Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas**. São Carlos, RiMA, 2006. p. 275-284.

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**, Den Haag, 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**, Dordrecht, v. 8, n. 1, p. 33-44, 2007.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmers. **Journal of Applied Ichthyology**, Hamburg, v. 20, n. 1, p. 48-52, 2004.

WILLIAMS, J. G. K.; RAFALSKI, J. A.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; TINGEY, S. V. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Research**, London, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

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

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

ZHU, Z. Y.; LIN, G.; LO, L. C.; XU, Y. X.; FENG, F.; CHOU, R.; YUE, G. H. Genetic analysis of Asian seabass stocks using novel polymorphic microsatellites. **Aquaculture**, Amsterdam, v. 256, n. 1-4, p. 167-173, 2006.