



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

IDENTIFICAÇÃO E VARIAÇÃO GENÉTICA DE *Colossoma*
macropomum E SEUS HÍBRIDOS, NATIVOS E DE CATIVEIROS
DA REGIÃO OESTE DO PARÁ

JONAS DA PAZ AGUIAR

Santarém, Pará
Março, 2012

JONAS DA PAZ AGUIAR

IDENTIFICAÇÃO E VARIAÇÃO GENÉTICA DE *Colossoma macropomum* E SEUS HÍBRIDOS, NATIVOS E DE CATIVEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARÁ

MARIA IRACILDA CUNHA SAMPAIO
Orientadora

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Genética da Conservação e Manejo da Biodiversidade.

Santarém, Pará
Março, 2012

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Gestão da Informação – SIGI/UFOPA**

- A284i Aguiar, Jonas da Paz
Identificação e variação genética de *Colossoma macropomum* e seus híbridos, nativos e de cativeiros da região oeste do Pará. / Jonas da Paz Aguiar. – Santarém, 2012.
60 f.: il.
Inclui bibliografias.
- Orientadora Maria Iracilda Cunha Sampaio.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2012.
1. Aquicultura. 2. Recursos pesqueiros. 3. Tambaqui. 4. Diversidade genética. 5. DNA mitocondrial. 6. PCR multiplex. 7. Bacia amazônica. I. Sampaio, Maria Iracilda Cunha, orient. II. Título.

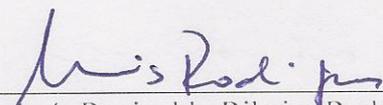
CDD: 21 ed. 639.8

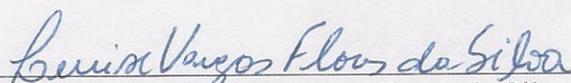
IDENTIFICAÇÃO E VARIAÇÃO GENÉTICA DE *Colossoma macropomum* E SEUS HÍBRIDOS, NATIVOS E DE CATIVEIROS DA REGIÃO OESTE DO PARÁ

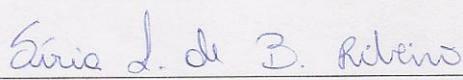
Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, Área de concentração: Genética da Conservação e Manejo da Biodiversidade. Aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Recursos Naturais da Amazônia, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, 30 de março de 2012.

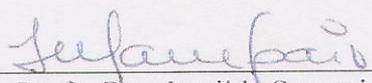
Profª. Dra. Rosa Veras Mourão (UFOPA)
Coordenadora do PGRNA

Apresentada á Comissão Examinadora, integrada pelos professores:


Prof. Dr. Luis Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Examinador 01


Profª. Dra. Lenise Vargas Flores da Silva
Examinadora 02


Profª. Dra. Sírnia Lisandra de Barcelos Ribeiro
Examinador 03


Profª. Dra. Iracilda Sampaio
Orientadora

Santarém, Março – 2012

DEDICATÓRIA

Maria da Paz e Laís Soares

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Maria Iracilda Cunha Sampaio por todo o apoio e atenção dados durante o desenvolvimento do trabalho. A simplicidade na resolução dos problemas e a maneira como trata as pessoas justificam seu sucesso e a grande contribuição para formação de pesquisadores na Amazônia. Muito Obrigado.

À Sra. Doutoranda Maria de Fátima Gomes Cunha pelo auxílio na aplicação da técnica, pelos conselhos, brincadeiras, discussões e a amizade.

Ao Professor Dr. Luís Reginaldo pela iniciação científica que muito me ajudou para o progresso na vida profissional.

À Estação de Piscicultura de Santa Rosa da Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado do Pará, em especial ao Biólogo Zacarias Marques por permitir que a coleta das amostras fosse realizada na estação.

Aos piscicultores que nos receberam e cederam as amostras para a realização do trabalho.

Ao Programa de Pós Graduação em Recursos Naturais da Amazônia, em especial à coordenadora Dra. Rosa Veras Mourão.

Aos Professores do PGRNA pela contribuição na minha formação.

Aos Colegas da turma 2010, sou muito feliz por fazer parte dessa turma.

Aos amigos do LGBIO, Aline, Beatriz, Diego, Erika, Fabiola e Vinicius. Muito obrigado pelo companheirismo e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Jeferson, Josy, Luciana, Kelly, Yrlene e Iketani. Foi muito bom conviver com vocês.

Aos funcionários e amigos do alojamento da Universidade Federal do Pará, Dona Elisa, Sr. Pedro, Sr. João e o Sr. Sid. Meu muito obrigado.

À minha família, parentes amigos que contribuíram e incentivaram para que esse sonho fosse realizado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Pará pelo auxílio financeiro.

À todas as pessoas que contribuíram direto ou indiretamente para execução desse trabalho.

Muito Obrigado a todos!!

EPÍGRAFE

**“Há quatro coisas que não voltam para trás:
a pedra atirada, a palavra dita,
a ocasião perdida, o tempo passado”.**

Anônimo.

AGUIAR, Jonas da Paz. **Identificação e variação genética de *Colossoma macropomum* e seus híbridos, nativos e de cativeiros da Região Oeste do Pará.** 2012, 72. Área de concentração: - Genética da Conservação e Manejo da Biodiversidade. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2012.

RESUMO

Na região Norte do Brasil a aquicultura tem apresentado um grande crescimento nos últimos anos. Esse crescimento tem sido atribuído principalmente ao cultivo de *Colossoma macropomum* e híbridos produzidos a partir desta espécie com *Piaractus mesopotamicus* e *Piaractus brachypomus*. Apesar do cultivo desses organismos ser essencialmente importante para fornecer fontes alternativas à exploração dos recursos pesqueiros, ele precisa ser estrategicamente planejado e monitorado para que seja rentável e não tragariscos para as populações selvagens das espécies relacionadas, nem prejuízos para populações humanas. Híbridos de tambaqui são bastante semelhantes às espécies parentais e o cultivo destes indivíduos pode ser especialmente problemático. Indivíduos cultivados podem ser geneticamente diferenciados das populações selvagens ou possuírem baixa diversidade genética, apresentando risco para populações nativas e de cativeiros. No presente trabalho, utilizando-se a Região controle do DNA mitocondrial e a técnica de PCR Multiplex do gene α – tropomiosina em indivíduos nativos e de cativeiros da Região Oeste do Pará foram registrados erros de identificação em 75% das pisciculturas analisadas, com o cultivo simultâneo de híbridos com espécies parentais, e 22% de erros em pisciculturas que se acreditava existirem somente espécies puras. Foram também encontrados alta diversidade genética nas duas populações nativas e níveis médios de diversidade nos indivíduos de cativeiros de *Colossoma macropomum*, com discreta divergência genética entre as populações nativas e de cativoiro. Estes resultados evidenciam a problemática do cultivo de híbridos na Amazônia, principalmente simultâneo com espécies parentais, e alerta para possíveis comercializações de híbridos como espécies puras ou vice-versa. Os resultados com relação à diversidade genética das populações cultivadas de *Colossoma macropomum* contrastam com os estudos conduzidos em outras regiões do Estado do Pará e em outros Estados do Brasil que apontaram para uma endogamia histórica nas matrizes produtoras de alevinos, e revelam um novo modelo de produção.

Palavras chave: Aquicultura brasileira, Tambaqui e híbridos, Diversidade genética, DNA mitocondrial, PCR Multiplex.

AGUIAR, Jonas da Paz. **Identificação e variação genética de *Colossoma macropomum* e seus híbridos, nativos e de cativeiros da Região Oeste do Pará.** 2012, 72. Área de concentração: - Genética da Conservação e Manejo da Biodiversidade. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2012.

ABSTRACT

In northern Brazil aquaculture has shown a steady growth in recent years. This growth has been attributed mainly to the cultivation of *Colossoma macropomum* and hybrids produced from this species with *Piaractus mesopotamicus* and *Piaractus brachypomus*. Despite the cultivation of these organisms is critically important to provide alternative sources to the exploitation of fishing resources, it needs to be strategically planned and monitored in order to be profitable and do not bring risks to wild populations of related species, or damage to human populations. Hybrids of Tambaqui are quite similar to the parental species and the cultivation of these individuals may be especially problematic. Cultivated individuals may be genetically distinct from wild populations or have low genetic diversity, representing a risk for native and captivity specimens. In this study, using the Control Region of mitochondrial DNA and PCR Multiplex gene α - Tropomyosin on native and captive individuals of the Western Region of Para, identification errors were recorded in 75% of analyzed fish farms, with the cultivation simultaneous hybrids with parental species, and 22% of errors in fish farms believed to exist only pure species. We also found high genetic diversity in both native populations and medium levels of diversity in captive individuals of *Colossoma macropomum*, with a slight divergence among native and captive populations. These results highlight the problem of growing hybrids in the Amazon, specially if they are simultaneously cultured together with native specimens, and warns of possible commercialization of hybrid as pure species or vice versa. The results regarding the genetic diversity of populations cultured *Colossoma macropomum* contrast to studies conducted in other regions of the state of Para and other states of Brazil that pointed to historical inbreeding in a matrix-producing fingerlings, and reveal a new model of production.

Keywords: Brazilian aquaculture, tambaqui and hybrids, Genetic diversity, Mitochondrial DNA, Multiplex PCR.

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Revisão Bibliográfica	
1.1.1. <i>Considerações gerais sobre o tabaqui, pacu e pirapitinga.....</i>	3
1.1.2. <i>Cultivo de tabaqui, pacu, pirapitinga e seus híbridos.....</i>	5
1.1.3. <i>Aspectos genéticos.....</i>	6
1.1.4. <i>Hibridação e a variabilidade genética.....</i>	8
1.1.5. <i>Marcadores genéticos e o monitoramento</i>	11
1.2. Objetivos	
1.2.1 <i>Objetivo Geral.....</i>	13
1.2.2. <i>Objetivos específicos.....</i>	13
1.3. Referências Bibliográficas	14
2. CAPITULO 1	22
1. Introdução	25
2. Materiais e Métodos	
2.1. <i>Amostras.....</i>	27
2.2. <i>Extração do DNA</i>	29
2.3. <i>PCR Multiplex.....</i>	29
2.4. <i>Amplificação da região D-loop e sequenciamento</i>	30
3. Resultados	
3.1. <i>PCR Multiplex.....</i>	31
3.2. <i>Região D-loop do DNA mitocondrial</i>	33
4. Discussão.....	35
5. Referências Bibliográficas.....	39
3. CAPITULO 2	43
1. Introdução	46
2. Materiais e Métodos	
2.1 <i>Amostras.....</i>	49
2.2. <i>Extração de DNA</i>	49
2.3. <i>Amplificação da região controle e sequenciamento</i>	50
2.4. <i>Estimativas de diversidade genética</i>	51
3. Resultados.....	51
4. Discussões.....	56
5. Referências Bibliográficas.....	60
4. CONCLUSÕES INTEGRADORAS	67
5. ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

A Bacia Amazônica abriga mais da metade das espécies de peixes descritas para a região Neotropical, que é de 4.435 (Reis et al., 2003). Destas, cerca de 200 espécies são exploradas pela pesca comercial e de subsistência, podendo esse número ser ainda maior devido aos erros de identificação e ao fato de algumas espécies estarem agrupadas em uma única espécie o que dificulta o planejamento de políticas para a conservação e para o manejo dos recursos pesqueiros (Barthem, 1995; Barthem e Fabré, 2004). Apesar da estatística apontar para uma grande quantidade espécies exploradas comercialmente, os estudos conduzidos em diferentes locais da Bacia Amazônica indicam que grande parte da exploração pesqueira é concentrada em um pequeno número de espécies, o que aumentam os riscos de sobreexploração (Batista e Petrere, 2003; Barthem e Fabré, 2004). Este fato fica evidenciado no relatório da FAO (2009) indicando que cerca de 30% das espécies exploradas comercialmente na Amazônia estão ameaçadas de sobreexploração, entre elas espécies de grande porte como o tambaqui *Colossoma macropomum* (Holmberg, 1887) e o surubim *Pseudoplatystoma* sp., e de médio porte como o jaraqui *Semaprochilodus* sp.

De uma forma geral se tem observado que os limites de exploração dos estoques pesqueiros estão próximos, pois a quantidade de pescado produzido pela pesca extrativista continental no Brasil vem apresentando uma tendência praticamente estável, com pequenas oscilações entre crescimento e queda. Esta situação é também observada na região Norte do país. No Estado do Pará, um dos maiores produtores da região Norte, o cenário é ainda mais drástico, apresentando uma pequena tendência de queda na produção de pescado durante os últimos cinco anos (IBAMA, 2007a; IBAMA 2007b; IBAMA, 2008; MPA, 2010). Por outro lado, a aquicultura na região Norte do Brasil apresenta um cenário inverso ao da pesca extrativista continental. Enquanto que a pesca extrativista continental é a maior entre as regiões do país e sem tendência de crescimento, a aquicultura continental da região Norte é menos expressiva que em outras regiões do país, embora apresente um grande crescimento nos últimos anos, acompanhando a tendência nacional (MPA, 2010).

Segundo Suplicy (2007) o aumento da produção na aquicultura nacional nos últimos anos pode ser atribuída ao cultivo de algumas espécies de peixes como o tambaqui, o pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e a pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Cuvier,

1818), além dos híbridos produzidos a partir do cruzamento entre essas espécies, como o tambacu, a tambatinga, o paqui e a patinga, que em geral são bem aceitos pelos mercados locais e são produzidos em quase todo o país.

Na região Norte do país a produção da aquicultura continental é baseada principalmente no cultivo do tambaqui, chegando a contribuir no ano de 2004 com cerca de 80% da produção da região e sendo responsável por 51,4% da produção total de tambaqui no país (Ostrensky et al., 2008; MPA, 2010). De acordo com o levantamento feito por Suplicy (2007) referente à produção de 2006, além do tambaqui, outras espécies também são produzidas na região Norte como o pacu, o curimatã, e os híbridos tambacu e a tambatinga, sendo produzidos em nove estações de piscicultura distribuído nos Estados da região Norte.

A estação de piscicultura de Santa Rosa localizada na cidade Santarém no Estado do Pará é uma das nove pisciculturas descrita por Suplicy (2007) para região Norte do país. Esta estação é de propriedade da Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado Pará (SEPAq), e é responsável por atender toda a Região Oeste do Pará, que compreende as mesorregiões do Baixo Amazonas e Sudoeste Paraense. Com uma produção média de 742.367 mil alevinos/ano e 546.000 mil pós-larva/ano, a estação de piscicultura de Santa Rosa atende mais de 230 piscicultores distribuídos em 18 cidades da Região Oeste do Pará de acordo com a base de dados da própria estação, referentes aos anos de 2008, 2009 e 2010 (SEPAq, dados não publicados).

Apesar da grande importância da aquicultura para a Bacia Amazônica, por constituir uma fonte alternativa para produção de alimentos e de forma indireta aliviar as pressões sobre alguns estoques selvagens, ela precisa ser estrategicamente pensada para que cause o menor impacto possível sobre as populações naturais (Arbelaez-Rojas et al., 2002). Pelo fato da Estação de piscicultura de Santa Rosa atender regiões situadas nas proximidades de dois importantes rios da região, o Rio Tapajós e o Rio Amazonas, é fundamental que se conheça a diversidade genética dos estoques naturais da região. Adicionalmente, a correta identificação dos indivíduos comercializados pela piscicultura, principalmente das espécies mais produzidas como o tambaqui, torna-se de fundamental importância, para se conhecer os possíveis impactos sobre as populações naturais em casos de escapes. Outro aspecto importante é a detecção de irregularidades, como a identificação incorreta de alevinos. O conhecimento de todos estes aspectos é primordial para se traçar estratégias para conservação e a gestão em programas de Aquicultura.

1.2. Revisão Bibliográfica

1.1.1. Considerações gerais sobre a pirapitinga, pacu e tambaqui

Taxonomicamente, o tambaqui, o pacu e a pirapitinga, pertencem à subfamília Serrasalminae, que possui 15 gêneros e 80 espécies com distribuição restrita à região Neotropical, embora algumas espécies possam ser encontradas em outras regiões do mundo como resultado de introduções. A subfamília Serrasalminae está incluída na Família Characidae, Ordem Characiformes, Classe Actinopterygii, e Filo Chordata (Reis et al., 2003; Nelson, 2006). O tambaqui, o pacu e a pirapitinga são também conhecidos como peixes redondos, sendo consideradas espécies reofílicas, e que, portanto, realizam grandes migrações durante o período reprodutivo (Kubitza, 2004).

A pirapitinga (Figura 1), *Piaractus brachipomus*, é uma espécie nativa do Rio Solimões, Amazonas, Orinoco e seus afluentes, podendo atingir 80 cm de comprimento e 20 kg de peso. De hábito alimentar onívoro, a pirapitinga se alimenta de frutas, folhas, sementes e microcrustáceos; atinge a maturidade sexual com cerca 3 a 4 anos de idade, sendo um peixe de piracema; sua desova é observada entre os meses de novembro a fevereiro (Honda, 1974; Vásquez-Torres, 2005).

O pacu, *Piaractus mesopotamicus* (Figura 2), anteriormente classificado como *Colossoma mitrei*, está largamente distribuído nos Rios da Bacia do Prata, sendo o peixe mais representativo do Pantanal; ocorre em todas as partes da região no período de águas altas, possui corpo com forma de oval a elíptica, e chega a atingir 70 cm de comprimento com cor variando de preto em áreas inundadas a amarelo-brilhante quando nas cabeceiras do rio para reprodução (Moreira, 2001; Araujo-Lima e Ruffino, 2003). A alimentação do pacu é composta de frutas, folhas, sementes, insetos e moluscos. Seu período de desova perdura de outubro a dezembro, com pico no mês de novembro (Araujo e Ruffino, 2003; Urbinati e Gonçalves, 2005).



Figura 1: Vista lateral de um indivíduo juvenil de *Piaractus brachypomus*. Foto: Jonas Aguiar.



Figura 2: Vista lateral de um indivíduo adulto de *Piaractus mesopotamicus*. Foto: Eliane Yoshioka.

O tambaqui *Colossoma macropomum* (Figura 3), é naturalmente encontrado nos Rios Solimões-Amazonas, Orinoco e seus respectivos afluentes; é considerado o segundo maior peixe de escamas da Bacia Amazônica chegando a alcançar em torno de 100 centímetros de comprimento e 30 kg de peso; seu hábito alimentar é bem amplo, mas come principalmente frutas e microcrustáceos planctônicos; é capaz de resistir a baixas concentrações de oxigênio, de até 1mg/L (Gouding e Carvalho, 1982; Isaac e Rufino, 2000). O *C. macropomum* exibe padrões de cor preta na parte dorsal e de amarelo a verde oliva na parte ventral. A intensidade da cor dos indivíduos é influenciada pela transparência da água. Nas águas escuras, como as do Rio Negro, os indivíduos são mais escuros, e nas águas turvas do Rio Amazonas o peixe é bem mais claro. Geralmente o tambaqui vive em água caracterizada por ser rica em nutrientes, e com temperaturas médias entre 25° e 34°C (Vieira et al., 1999; Araujo- Lima e Gomes, 2005).



Figura 3: Vista lateral de um exemplar adulto de *Colossoma macropomum*. Foto: Jonas Aguiar.

Reprodutivamente o *C. macropomum* possui fecundação externa e o período de desova é sincronizado com o período chuvoso. As fêmeas atingem a maturidade sexual com o comprimento médio de 60,59 cm (Goulding e Carvalho, 1982; Vilacorta-Correa e Saint-Paul, 1999; Vieira et al., 1999).

1.1.2. Cultivo de tambaqui, pacu, pirapitinga e seus híbridos

Historicamente a produção de espécies de peixes nativos do Brasil, particularmente dos peixes redondos, se tornou efetivamente viável a partir de 1980 com a geração e a difusão de tecnologias para a produção de alevinos por quatro principais centros: Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS); Companhia de Desenvolvimento do Vales do São Francisco e Parnaíba (CODEVASF); Universidade Estadual de São Paulo (UNESP); e Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura (CEPTA) (Kubitza et al., 2007). Antes disso, alguns avanços já tinham sido feitos principalmente para reprodução em cativeiro de espécies reofílicos, como o tambaqui, o pacu e a pirapitinga, que em geral em condições de cultivo não conseguem se reproduzir naturalmente sendo necessária a indução da desova através da aplicação de hormônios naturais presente na hipófise de peixes maduros (Crepaldi et al., 2006; Zaniboni Filho e Weingartner et al., 2007).

Para a indução da desova ou hipofisacção tem se optado pela utilização de extrato de hipófises de carpa, ainda que, já tenha sido bem sucedida com a utilização de curimatã, curimatá e de jaraqui. O procedimento de hipofisacção para as fêmeas consiste,

frequentemente, de duas aplicações de extrato de hipófise com intervalos de 8 a 12 horas, na primeira aplicação com concentrações de 0,5mg de extrato de hipófise por kg de peso e a segunda de 4,5mg a 5mg/kg. Nos machos é feita uma única aplicação. A desova ocorre entre 8 a 10 horas depois de aplicada a segunda dose, dependendo da temperatura (Kubitza et al., 2004).

Na busca de indivíduos com vigor positivo, a hibridação entre as espécies nativas também são utilizados. A produção de híbridos no Brasil se iniciou em 1982, primeiro com a produção de pequi (fêmea da pirapitinga x macho do tambaqui) pelo Departamento de Obras Contra as Secas (DNOCS) (Toledo e Filho et al., 1998; Pinheiro et al., 1991), e posteriormente, com a produção de tambacu a partir do cruzamento da fêmea do tambaqui com o macho do pacu, pelo Centro de Pesquisa e Treinamento em Aquicultura (CEPTA – Pirassununga, SP (Bernardino et al., 1986).

Atualmente o tambaqui, o pacu, a pirapitinga e alguns de seus híbridos como o tambacu e a tambatinga estão entre os peixes mais cultivados pela piscicultura nacional, perdendo somente para duas espécies exóticas, a tilápia e a carpa (MPA, 2010). As principais razões para esse domínio é o rápido crescimento em cativeiro, hábito alimentar diversificado, rusticidade e a boa qualidade da carne apresentada por essas espécies de peixes (Kubitza et al., 2007). Dentre essas espécies o cultivo do tambaqui se destaca sendo produzido em quase todo país, principalmente na região norte, onde existe um grande mercado local para esta espécie e o cultivo de espécies exóticas é restrito (Suplicy et al., 2007; Ostrensky et al., 2008).

1.1.3. Aspectos genéticos

A importância do tambaqui e as preocupações relacionadas ao manejo genético têm sido refletidos na grande quantidade de trabalhos que enfocam sua diversidade genética tanto no meio natural como em estoques de piscicultura (Calcagnotto, 1998; Calcagnotto e Toledo-filho, 2000; Santos et al., 2007; Castro, 2008; Santos et al., 2009; Lopes et al., 2009; Santos, 2010; Cunha, 2010; Jacometo et al., 2010; Farias et al., 2010). Entre os marcadores disponíveis, a região D-loop do DNA mitocondrial tem sido o mais utilizado (Santos et al., 2007; Castro, 2008; Cunha, 2010; Farias et al., 2010). Os estudos genéticos envolvendo o

pacu, ainda que em menor número, também podem ser encontrados (Calcagnotto, 1998; Suganuma, 2008; Povh et al., 2008; Iervolino et al., 2010).

Com relação aos trabalhos envolvendo o *Colossoma macropomum* nativo da Bacia Amazônica, com exceção de Calcagnotto (1998) utilizando fragmentos do DNA mitocondrial produzidos por 14 enzimas que indicaram haver baixa diversidade genética, todos os outros apontam para grande diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica nas seqüências da região D-loop do DNA mitocondrial (Santos et al., 2007; Castro, 2008; Cunha, 2010; Farias et al., 2010; Santos, 2010) e em microssatélites, locos altamente polimórficos (Santos et al., 2009; Santos, 2010). Os estudos também indicam que o *C. macropomum* constitui uma grande população panmítica com altas taxas de migrações entre as localidades, não havendo estruturação populacional ao longo da Bacia Amazônica, nem mesmo em regiões onde existem corredeiras, que se pensava serem uma barreira para a troca de material genético (Santos et al., 2007; Farias et al., 2010; Santos, 2010).

O mais amplo estudo genético populacional feito com indivíduos nativos de *Colossoma macropomum* é o de Santos (2010), que amostrou 21 locais distribuídos ao longo da calha do Rio Amazonas, incluindo alguns tributários. A autora, analisou 1561 pares de base de seqüências do DNA mitocondrial (região controle mais o gene ATPase) de 539 indivíduos e dados de microssatélites de 12 locos de 604 indivíduos. Foram encontrados 444 haplótipos, sendo 400 haplótipos únicos para as seqüências do DNA mitocondrial com níveis de diversidade haplotípica altos e homogêneos para todas as localidades amostradas e para os dados de microssatélites em média foram encontrados 21,4 alelos por loco. Com base nestes resultados, a autora sugeriu altos níveis de variabilidade genética para o tambaqui indicando que a população de *C. macropomum* forma uma grande população panmítica com intenso fluxo gênico entre as localidades.

Nos estudos genéticos realizados com o tambaqui em pisciculturas em geral é encontrada baixa diversidade genética (Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000, Castro, 2008; Cunha, 2010), exceto nos estudos de Lopes et al., (2009) utilizando RAPD com 10 iniciadores para 30 reprodutores de dois cultivos do Estado de Rondônia e de Jacometo et al., (2010) também utilizando RAPD com 10 iniciadores, porém com 116 indivíduos de quatro pisciculturas de três estados, e que observaram alta variabilidade genética.

Calcagnotto e Toledo-Filho (2000), por exemplo, utilizando indivíduos oriundos de uma piscicultura da região Sudeste (São Paulo) e de três pisciculturas da região Nordeste (Ceará e Sergipe), mediante ao uso de marcadores de isoproteína transferrina encontraram apenas três alelos para os 437 indivíduos coletados.

Castro (2008), utilizando seqüências da região controle do DNA mitocondrial de em 33 amostras de uma piscicultura de Santarém – Pará encontrou somente dois haplótipos, o mesmo resultado foi encontrado por Cunha (2010) também utilizando seqüências do DNA mitocondrial, mas para 93 indivíduos oriundos de dez pisciculturas da Região Norte.

Nos estudos genéticos feitos com o pacu tanto para os indivíduos nativos como para os indivíduos de cativeiro os resultados encontrados não tem sido muito diferentes do encontrado para o tambaqui, indicando também para as populações nativas a existência de uma população panmítica com alta diversidade haplotípica e intenso fluxo gênico entre as localidades, e para as populações de cativeiro menor variabilidade genética nas estações de aqüicultura (Suganuma, 2008; Povh et al., 2008; Iervolino et al., 2010) .

1.1.4. Hibridação e a variabilidade genética

A hibridação e a perda de variabilidade genética tem sido uns dos principais problemas enfrentados para conservação das populações naturais e para manutenção das populações em cativeiro (Allendorf et al, 2001; Reed et al., 2002). Conceitualmente a hibridação pode ser entendida como o cruzamento de indivíduos ou grupos geneticamente diferentes, abrangendo tanto o cruzamento de indivíduos de uma mesma espécie, mas de linhagens diferentes (hibridação intraespecífica), como o cruzamento de indivíduos de espécies diferentes (hibridação interespecífica) (Dowling e Secor, 1997; Bartley et al., 2001).

A hibridação entre populações geneticamente similares, mesmo em indivíduos de uma mesma espécie, pode ter importantes efeitos sobre a adaptação das populações locais, pois, alelos especialmente importantes em episódios de condições extremas como chuva ou secas podem ser perdidos pelas hibridações, algo também conhecido como “Outbreeding depression” (Allendorf et al., 2001; Goto et al., 2011).

As populações de programas de cultivo, por exemplo, podem ser geneticamente diferenciadas das populações selvagens, como resultado de diferentes pressões seletivas. Em cultivos de *Salmo salar*, por exemplo, foram observadas diferenças em genes codificadores de proteínas, no DNA mitocondrial e em *loci* nucleares (Verspoor et al., 2007). Em razão destas diferenças, as interações entre os indivíduos cultivados e os selvagens podem causar impactos diretos nas populações selvagens, como redução no número efetivo das populações, deriva genética e perda de adaptações locais (McLean et al., 2004; Svasand et al., 2007). Por esse motivo, ações que aumentam a hibridação intra-específica, como os escapes ou liberações intencionais de programas de aquicultura devem ser evitadas. Além disso, estudos para se avaliar os riscos das populações selvagens quanto à divergência existente com as populações cultivadas devem ser prioritários (Allendorf et al., 2001; Svasand, 2007).

Híbridos produzidos pelo cruzamento de indivíduos de espécies diferentes também constituem uma ameaça para as populações selvagens. Híbridos interespecíficos podem ser encontrados naturalmente ou promovidos em laboratório, denominados hibridação natural e artificial respectivamente (Epifanio & Nielson, 2001; Bartley et al., 2001)

A hibridação interespecífica é mais encontrada em plantas que em animais, sendo mais comum entre os peixes que em outros vertebrados. No caso dos peixes, isto ocorre pela própria condição ecofisiológica do grupo, que apresenta características peculiares entre elas a fertilização externa, competição por territórios de desova, abundância desigual de espécies parentais, complexidade de habitat decrescente e suscetibilidade para contato entre indivíduos com divergências recentes (Scribner et al., 2001). Por razões antrópicas, seja pela introdução, pela translocação de organismos, ou pela modificação de habitats, a hibridação natural tem aumentado drasticamente no mundo (Allendorf et al., 2001).

Na busca de melhorar aumentar produção, a hibridação artificial interespecífica também vem sendo utilizada pelos programas de Aquicultura, buscando indivíduos que apresentem vantagens, ou seja, melhor vigor híbrido. Entre as características desejadas pelos programas de aquicultura, destacam-se as seguintes: melhores taxas de crescimento, esterilidade dos híbridos, tolerância ambiental, resistência a doenças, melhor robustez global (Bartley et al., 2001). No entanto, a hibridação interespecífica oferece risco para as populações naturais e cultivadas que dependendo do grau de esterilidade dos híbridos podem resultar em redução demográfica, perda de características zootécnicas desejáveis, introgressão gênica e extinção de espécies. Os híbridos estéreis, tanto em populações naturais como em

cultivadas, podem competir por alimento e impedir que o esforço reprodutivo da população pura resulte em prole, e conseqüentemente, incidirem na redução do número de indivíduos da população (Toledo-Filho et al., 1994). Híbridos férteis nas populações cultivadas podem cruzar com as espécies parentais colocando em risco a manutenção de características zootécnicas desejáveis e em populações naturais incidir na redução do número de indivíduos e promover a introgressão gênica que em casos extremos pode levar a extinção da espécie (Allendorf et al., 2001). Os riscos das populações naturais relacionada a indivíduos produzidos através de hibridação artificial tornam-se mais evidente quando temos em vista que a piscicultura é considerada o principal mecanismo de dispersão de espécies, principalmente, pelos escapes dos indivíduos dos tanques de criação em virtude do rompimento, transbordamento, esvaziamento ou em atividades normais de manejo, ou ainda pela liberação intencional dos indivíduos de cativeiros (Agostinho e Julho Jr, 1996).

No Brasil, uma ampla variedade de híbridos vem sendo produzido pelos programas de aquicultura entre eles híbridos produzidos a partir do cruzamento de *C. macropomum* com *P. mesopotamicus* e *C. macropomum* com *P. brachypomus*. No entanto, os riscos destes híbridos para os programas de aquicultura e para populações selvagens ainda não são totalmente definidos devido à falta de conhecimento a respeito do grau de esterilidade dos mesmos (Kubitza, 2004; Hashimoto, 2008).

A perda da variabilidade genética populações naturais e cultivadas tem sido outra constante preocupação. As preocupações quanto à variabilidade genética estão principalmente relacionadas à depressão endogâmica. Conceitualmente, a depressão endogâmica pode ser entendida como a redução da aptidão de indivíduos oriundos de cruzamentos entre aparentados com relação aos descendentes entre indivíduos não aparentados. (Allendorf e Luikart, 2007). A redução da fertilidade, diminuição da taxa de crescimento e da sobrevivência são alguns dos efeitos resultantes da depressão endogâmica em populações com pouca variabilidade genética. Geneticamente esses efeitos podem se explicadas pelo aumento da homozigose em alelos com mutações danosas recessivas ou em loci com vantagem para heterozigotos (Charlesworth e Willis, 2009; Reed et al., 2002). Em populações de programas de aquicultura a perda de variabilidade genética ainda é mais preocupante, principalmente em cultivos de espécies que apresentam alta fecundidade e onde em geral é utilizado um pequeno número de reprodutores aumentando assim as chances do endocruzamento (Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000; Moss et al., 2007).

1.1.5. Marcadores genéticos e o monitoramento

A identificação genética e o conhecimento da variabilidade genética dos estoques de programas de aquicultura são exigências fundamentais em qualquer programa de cultivo que é dirigida para produção comercial ou para reabilitação de populações naturais (Ferguson, 1994; Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000). Para isso uma ampla variedade de marcadores moleculares tem sido utilizada pelos programas de aquicultura incluído Aloenzimas, DNA mitocondrial, RFLP, RAPD, AFLP, microssatélites, SNP, e marcadores de EST (Liu e Cordes, 2004).

Para identificação de híbridos interespecíficos que são frequentemente morfologicamente indistinguíveis das espécies parentais, tem se utilizado tanto marcadores genéticos nucleares como mitocondriais, sendo em alguns estudos empregados de maneira simultânea (Scribner, 2001; Hashimoto, 2008 Puigcerver et al., 2007). Marcadores nucleares ou marcadores mendelianos constituem uma ferramenta inequívoca para identificação de indivíduos puros ou híbridos, tendo em vista que são de origem biparental e que a primeira geração é totalmente heterozigota para todos os loci com alelos população específica, sendo, por isso, considerada uma ferramenta poderosa para identificação de híbridos (Anderson e Thompson, 2002; Mallet, 2005). O DNA mitocondrial também é utilizado para a identificação de híbridos, no entanto de maneira complementar. Possuindo origem predominantemente materna (uniparental), o DNA mitocondrial fornece informações necessárias para indicar a direção da hibridação, ou seja, a origem materna dos híbridos produzidos (Rhymer e Simberloff, 1996; Liu e Cordes, 2004; Ibrahim et al., 2011).

Recentemente uma técnica com base em PCR Multiplex, utilizando primers espécie-específica para gene α - tropomiosina do DNA nuclear, que facilmente distingue o híbrido de seus parentais, foi desenvolvida na UNESP - Bauru (Hashimoto et al., 2008). Usada inicialmente para a identificação de híbridos entre *Leporinus macrocephalus* e *L. elongatus*, a mesma foi adaptada para identificação de híbridos de tambaqui (Hashimoto et al., 2009; Cunha, 2010). A PCR Multiplex, que é uma variante da PCR tradicional, em que duas ou mais sequências podem ser amplificadas com a utilização de mais de um par de primers. Está técnica, desde que foi descrita pela primeira vez em 1988 tem sido aplicada em diversas áreas incluindo mutação gênica, polimorfismo e identificação de agentes etiológicos causadores de doença, sendo considerado um método de rápida execução (Markoulatos, et al., 2002). De acordo com Markoulatos et al. (2002), o sucesso da PCR multiplex depende da concentração

relativa dos primers, concentração do tampão da PCR, balanço entre o cloreto de magnésio e a concentração de desoxinucleotídeos, temperaturas dos ciclos, quantidade de DNA molde e da *Taq* polimerase. O equilíbrio desses fatores determina a otimização da reação, que é o maior desafio da aplicação desta técnica. Cunha (2010) utilizou a PCR multiplex e os primers desenvolvidos pelo grupo da UNESP (Dr. Fabio Foresti) para a identificação de híbridos de tambaqui como o pacu e com a pirapitinga em 93 indivíduos de 10 pisciculturas dos Estados do Amapá, Pará, Piauí e Rondônia. Esta autora obteve com sucesso a identificação dos híbridos que em alguns casos discordaram da identificação realizada pelos piscicultores.

Para análise de variabilidade, o DNA mitocondrial também tem sido tradicionalmente utilizado como uma ferramenta genética valiosa para se avaliar o grau de divergência genética entre as populações, bem como os estudos relacionados à estrutura genética, biogeografia e diversidade genética em vários organismos incluindo os peixes, principalmente por ser compacta, herança predominantemente materna e com rápida taxa de substituição de bases (Faber e Stepien, 1997; Lee et al., 1995; Sivasundar et al., 2001). Segundo Brown (2008), as sequências do DNA mitocondrial para os vertebrados possuem em geral uma única região controle, não codificante, responsável pela iniciação da replicação, 13 regiões codificantes de polipeptídeos, 22 RNAs transportadores e dois RNAs ribossômicos. A Região Controle do DNA mitocondrial é considerada uma região hipervariável, possuindo rápida taxa evolutiva e por isso tem sido indicada principalmente para análise de fenômenos recentes como os que envolvem indivíduos de uma mesma espécie ou de espécies próximas. Dentre outras aplicações, as sequências da região controle do DNA mitocondrial também têm sido utilizadas para as análises de depressão de estoques e gargalos de garrafa (Varesi et al., 2000; Faber e Stepien, 1997).

1.2. Objetivos

1.2.1 Geral

Identificar os híbridos e a variação genética existente entre os indivíduos nativos e cultivados do tambaqui *Colossoma macropomum*.

1.2.2. Específicos

- 1 – Averiguar se os indivíduos utilizados nas pisciculturas da Região Oeste do Pará como tambaqui ou híbridos possuem essa real identificação.
- 2 – Verificar se as matrizes utilizadas para produção de alevinos são realmente tambaqui ou são híbridos.
- 3 – Comparar a diversidade genética encontrada na população cultivada com as populações nativas.
- 4 – Avaliar os níveis de divergência genética existentes entre as populações naturais e os indivíduos de programas de aquicultura.

1.3. Referências bibliográficas

AGOSTINHO, A. A.; JULIO-JR, H. F. Ameaça ecológica - Peixes de outras águas. **Ciência Hoje**, v. 21 (124), p. 36 – 44. 1996.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Blackwell Publishing, Malden, MA, USA. 2007. p.642.

ALLENDORF, F.W.; LEARY, R.F.; SPRUELL, P., WENBURG, J.K. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends Ecol. Evol.**, v. 16(11), p. 613-622. 2001.

ANDERSON, E. C.; THOMPSON, E. A. A Model – based method for identifying species hybrids using multilocus genetics data. **Genetics Society of America**, v. 160, p. 1217 – 1229. 2002.

ARAÚJO-LIMA, A. R. M.; GOMES, L. C. Tambaqui (*Colossoma macropomum*). In: **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**: Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes. Santa Maria: ED. da UFSM. 2005, p. 468.

ARAÚJO-LIMA, C. R. M.; RUFFINO, M. L. Migratory Fishes of the Brazilian. Amazon in: **Migratory Fishes of South America**; Carolsfeld, J. et al, Canada: World Bank. 2003. p. 361.

ARBELÁEZ - ROJAS, G. A.; FRACALOSSO, D. M., FIM, J. D. I. Composição Corporal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e Matrinxã, *Bryconcephalus*, em Sistemas de Cultivo Intensivo, em Igarapé, e Semi – Intensivo, em Viveiros. **R. Bras. Zootec.** 31, pp. 1059 – 1069. 2002.

BARTHEM, R.B.; FABRÉ, N.N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. In: RUFFINO, Mauro Luís. **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira - Provárzea**, p. 11-55. 2003.

BARTHEM, R.B. Development of commercial fisheries in the Amazon basin and consequences for fish stocks and subsistence fishing. In: Clüsener-Godt, M.S., I. **Brazilian Perspectives on Sustainable Development of the Amazon Region**. v. 15, p. 175-204. 1995.

BARTLEY, D.M.; RANA, K.; IMMINK, A.J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 325-337. 2001.

BATISTA, V. S.; PETRERE JR. M. Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. **Acta Amazonica**, v. 33, p. 53-66. 2003.

CALCAGNOTTO, D. Caracterização de Bancos Genéticos de Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de Análise do DNA Mitocondrial. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. 1998.

CALCAGNOTTO, D; TOLEDO-FILHO, S.A. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 1, p. 127-130. 2000.

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

CHARLESWORTH, D.; WILLIS, J. H. The genetics of inbreeding depression. **Nature Reviews**, v. 10, p. 783 – 796. 2009.

CREPALDI, D. V.; FARIA, P. M. C.; TEIXEIRA, E. A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C.; CINTRA, A. P. R.; PRADO, S. A.; COSTA, F. A. A.; DRUMOND, M. L.; LOPES, V. E.; MORAES, V. E. Utilização de Hormônios na reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma* spp) Rev. Bras. Reprod. Anim. v. 30, p. 168 – 173. 2006.

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

DOWLING, T. E.; SECOR, A. C. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals: **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 28, n. 1, p. 593-619. 1997.

EPIFÂNIO, J.; NIELSON, J. The Role of Hybridization in the Distribution, Conservation and Management of Aquatic Species. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 245-251.

2001.

FABER, J. E.; STEPIEN, C. A. The utility of mitochondrial DNA Control Region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species and genera of the Percidae. **Molecular Systematics o Fishes**, 129-143. 1997.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture – 2008 (SOFIA). **Food and Agriculture Organization of the United Nations** - FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma. 2009.

FARIAS, I.P.; TORRICO, J.P.; GARCIA-DAVILA, C.; SANTOS, M. C. F.; HRBEK T.; RENNO J.-F. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56 (3), p. 1129-1135. 2010.

FERGUSON, A. Molecular genetics in fisheries: current and future perspectives. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 379 – 383. 1994.

GOTO, S., IJIMA, H., OGAWA, H. AND OHYA, K. Outbreeding depression by intraspecific hybridization between local and nonlocal genotypes in *Abies sachalinensis*. **Restoration Ecology**, v. 19, n.2, p. 243 – 250. 2011.

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

HASHIMOTO, D. T.; MENDONÇA, F. F.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO – FORESTI, F. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongates* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: Tools for genetic monitoring in aquaculture. **Aquaculture**, v. 298, p. 346–349. 2009.

HASHIMOTO, D.T. Caracterização citogenética e molecular de híbridos interespecíficos das espécies Piaçu (*Leporinus macrocephalus*) e Piaupara (*Leporinus elongatus*), utilizados na piscicultura brasileira. **Tese de mestrado**. Universidade Estadual Paulista-UNESP. Instituto de Biociência de Botucatu. p. 164. 2008

HONDA, E. M. S. Contribuição ao conhecimento de peixes do Amazonas. II. Alimentação do tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Acta Amazonica**. Manaus. v. 4, p. 47-53. 1974.

IBRAHIM, A. A.; KHAN, H. A.; BAHKALI, A. H.; HOMAIDAN, A. A.; FARHAN, A. H.; SADOON, M. A.; SHORAK, M. DNA marker technology for wildlife conservation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 219 – 225. 2011.

IERVOLINO, F.; RESENDE, E. K.; HILSDORF, A. W. S. The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. **Fisheries Research**, v. 101, p. 27–31. 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS^a. **Estatística da pesca 2005 Brasil**: Grandes Regiões e Unidades da Federação/ Brasília: IBAMA. p.108. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS^b. **Estatística da pesca 2007 Brasil**: Grandes Regiões e Unidades da Federação/ Brasília: IBAMA. p.113. 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS. **Estatística da pesca 2006 Brasil**: Grandes Regiões e Unidades da Federação/ Brasília: IBAMA. p.174. 2008.

ISAAC, V. J.; RUFFINO, M. L. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992-1993. In: Fischer, C. F. (Ed.). Recursos Pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira. IBAMA/GTZ/GOPA, Brasília. p. 225-280. 2000.

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

KUBITZA, F. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. **Panorama da Aquicultura** v. 14, n. 82, p. 26-39. 2004.

KUBITZA, F.; ONO, E. A.; CAMPOS, J. L. Os caminhos da produção de peixes nativos no

Brasil: Uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. *Panorama da Aquicultura*, p. 14 – 23. 2007.

LEE, W.; COROY, J.; HOWELL, W. H.; KOOCHER, T. D. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions. *J. Mol. Evol.*, v. 41, p. 54-66. 1995.

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

LOPES, T. S.; S. STREIT JR., D. P.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; LOPERA – BARRERO, N. M.; VARGAS, L.; PINTO FILHO, C.; QUEIROZ, J. R. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*, v. 61, n.3, 728-735. 2009.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 20, n. 5, p. 229 – 237. 2005.

MARKOULATOS, P.; SIAFAKAS, N.; MONCANY, M. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *J. Clinical Lab. Analysis*, v. 16, p. 47–51. 2002.

MCLEAN, J. E.; BENTZEN, P.; QUINN, T. P. Differential reproductive success of sympatric, naturally spawning hatchery and wild steelhead, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Biology of Fishes*, v. 69, p. 359 – 369. 2004.

MINISTÉRIO DA PESCA E DA AQUICULTURA. **Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2008 – 2009**. Brasília: MPA. p. 99. 2010.

MOREIRA, H. L. M. **Fundamentos da Aquicultura Moderna**. 1ed. Canoas: ULBRA, p.200. 2001.

MOSS, D. R.; ARCE, S. M.; OTOSHI, C. A.; DOYLE, R. W.; MOSS, S. M.; Effects of inbreeding on survival and growth of Pacific white shrimp *Penaeus (Litopenaeus) vannamei*. *Aquaculture*, p. 30 – 37. 2007.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4th. Wiley. 2006. p. 601.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, JR.; SOTO, D. **Aqüicultura no Brasil: O Desafio é**

Crescer / Editores : Antonio Ostrensky, José Roberto Borghetti e Doris Soto. – Brasília. 2008. p. 276.

PINHEIRO, M. H.; SILVA, J. W.; NOBRE, M. I.; PINHEIRO, F. A. Cultivo do híbrido tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818, com a pirapitinga, *C. brachypomum* CUVIER, 1818, na densidade de 5.000 peixes/há: **Ciência Agronômica**, v. 22, p. 77-87. 1991.

POVH, J. A. Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. **Tese Doutorado**. Universidade Estadual de Maringá, Maringá – Paraná. 2008.

PUIGSERVER, M.; VINYOLES, D.; RODRIGUEZ-TEIJEIRO, J. Does restocking with Japanese quail or hybrids affect native populations of common quail *Coturnix coturnix*? **Biological Conservation**, v. 136, n. 4, p. 628-635. 2007.

REED, D. H.; BRISCOE, D. A.; FRANKHAM, F. Inbreeding and extinction: The effect of environmental stress and lineage. **Conservation Genetics**, v. 3 , p. 301-307. 2002.

REIS, R.E., KULLANDER, S.O., FERRARIS, C.J. Introduction In: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C.J. (eds.). **Checklist Of The Freshwater Fishes of South and Central America**. p. 1-3. 2003.

RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction By Hybridization and Introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, n. 1, p. 83-109. 1996.

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

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**. v. 71, p. 33–44. 2007.

SANTOS, M.C. F., HRBEK, T., FARIAS, I. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important

keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular Ecology Resources**, p. 874-876. 2009.

SCRIBNER, K. T.; PAGE, K. S.; BARTRON, M. L. Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference: **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 10, p. 293-323. 2001.

SIVASUNDAR, A., BERMINGHAM, E.A., AND ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers: **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407-417. 2001.

SUGANUMA, C. H., Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microsatélites. **Tese de Doutorado**. Universidade Estadual Paulista. Jaboticabal – São Paulo. 2008.

SUPLICY, F.M., Freshwater fish seed resources in Brazil. In: M.G. Bondad-Reantaso (ed.). **Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture**. Rome: FAO Fisheries Technical Paper. n. 501, p. 129-143. 2007.

SVASAND, T.; CROSETTI, D.; GARCÍA – VÁSQUEZ, E.; VERSPOOR, E. **Genetic impact of aquaculture activities on native populations**, p.176. 2007.

TOLEDO-FILHO, S. A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI F.; BERNARDINO, G.; CALCAGNOTTO, D.; Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e Tambaqui: **Cadernos de Ictiogenética**, v. 2, São Paulo, CCS/USP. 1994.

TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; CALCAGNOTTO, D., SANTOS, S.B.A.F.; & BERNARDINO G. Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura: **Cadernos de Ictiogenética**, v. 4, São Paulo, CCS/USP, 1998.

URBINATI, E.C.; GONÇALVES, F. D. Pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**: Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes. Santa Maria: ED. da UFSM. p. 468. 2005.

VARESI, L.; MEMMI, M.; CRISTOFARI, M. C.; MAMELI, G. E.; CALO, C. M.; VONA,

G. Mitochondrial control – region sequence variation in the Corsican population, France. **American Journal of Human Biology**, v. 12, p. 339 – 351. 2000.

VÁSQUEZ-TORRES, W. A Pirapitinga, reprodução e cultivo. *In: Espécies nativas para piscicultura no Brasil*: Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes. Santa Maria: ED. da UFSM. p. 468. 2005.

VERSPoor, E.; OLESEN, I.; BENTSEN, H. B.; GLOVER, K.; McGINNITY, P.; NORRIS, A. Atlantic salmon – *Salmo salar* In: Svasand, T., Crosetti, D., García – Vazquez, E., Verspoor, Eric., **Genetic impact of aquaculture activities on native populations**. pp. 23 – 31. 2007.

VIEIRA, E. F.; ISAAC, V. J.; FABRÉ, N. N.; Biologia Reprodutiva do Tambaqui, *Colossoma macropomum* Curvier, 1818 (Teleostei Serrasalminidae), no Baixo Amazonas Brasil. **Acta Amazonica**, v. 29, n. 4, p. 625- 638. 1999.

VILACORTA-CORRÊA, M.A.; SAINT - PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) (Characiformes: Characidae) in Central amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n.4, p. 637-652. 1999.

ZANIBONI FILHO, E. E WEINGARTNER, M. Técnicas de indução da reprodução de peixes migradores. **Rev. Bras. Reprod. Anim.** v. 31, p. 367 – 373. 2007.

CAPITULO I

Identificação molecular do tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos em pisciculturas da Região Oeste do Pará, Amazônia - Brasil

Identificação molecular do tambaqui *Colossoma macropomum* e seus híbridos em pisciculturas da Região Oeste do Pará, Amazônia - Brasil

Autores:

Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto de Estudos Costeiros Universidade Federal do Pará – Campus Bragança, PA, Brasil

Correspondência do Autor: Telefone: (093) 9115-4408; E-mail: jonasdapaz@hotmail.com
(Jonas da Paz Aguiar).

Resumo

Híbridos de tambaqui com pacu e com a pirapitinga vêm sendo rotineiramente utilizados em cultivos em todo o Brasil. Como são bastante semelhantes morfológicamente com as espécies parentais podem ser confundidos e comercializados de forma inadequada, ocasionando desconfiança entre os piscicultores e consumidores. Do ponto de vista ambiental a principal preocupação na região norte são os escapes para a natureza, que poder resultar em impactos sobre as populações selvagens. No presente trabalho tivemos como objetivo verificar se os indivíduos utilizados nas pisciculturas e no plantel como tambaqui e híbridos possuem essa real identificação. Utilizando a técnica de PCR Multiplex do gene nuclear α - Tropomiosina e de sequências da Região Controle do DNA mitocondrial, analisamos indivíduos de um plantel produtor de alevinos, e de várias pisciculturas da região oeste do Pará. Foram registrados erros de identificações de 75% em cultivo simultâneo de híbridos e de espécimes puros e de 22% em pisciculturas que se presumia existir somente espécimes puros. Os resultados indicam que a ferramenta genética empregada é robusta e pode ser de grande valia para identificar matrizes, monitorar cruzamentos interespecíficos, e validar rotulagens de derivados oriundos do cultivo de tambaqui e seus híbridos e alerta para problemática do cultivo de híbridos na Amazônia.

Palavras - Chave: *Colossoma*, Piscicultura, Híbridos de tambaqui, PCR Multiplex, identificação molecular.

1. Introdução

A técnica de hibridação interespecífica tem sido bastante utilizada pelos programas de aquicultura, buscando-se, principalmente a produção de indivíduos com melhores taxas de crescimento, melhores tolerâncias ambiental, menor capacidade reprodutiva ou que combine características específicas encontradas separadamente nas espécies parentais, de uma forma geral que aumente o desempenho em condições de cultivo (Bartley et al., 2001).

A técnica de hibridação interespecífica entre *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818), espécie mais produzida pela Aquicultura continental da região, com mais duas espécies de Characiformes, *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) e *P. brachypomus* (Cuvier, 1818), tem sido rotineiramente produzidos em programas de Aquicultura em todo o Brasil, e em particular na região norte. Tal procedimento é decorrente do fato de que esses híbridos, especialmente a tambatinga (cruzamento de fêmea de *C. macropomum* com macho de *P. brachypomus*) e o tambacu (fêmea de *Colossoma macropomum* x macho *P. mesopotamicus*) apresentam melhores taxas de crescimento e tolerâncias ambientais que as espécies parentais (Senhorini et al., 1988; Kubitzka, 2004; Suplicy, 2007). Assim como outros híbridos interespecíficos, a tambatinga e o tambacu são muito semelhantes às espécies parentais, o que torna difícil a identificação quando baseada somente em características morfológicas (Calcagnotto et al., 1999; Puigcerver et al., 2007; Allendorf et al., 2001).

O cultivo de híbridos tem causado grandes preocupações nas estações de produção de alevinos, nos produtores e na população em geral, pois se acredita que os híbridos de tambaqui possam estar sendo confundidos com espécimes puros ou vice-versa, e ainda que alguns indivíduos capturados na natureza sejam híbridos originados de escapes de piscicultura, a exemplo do que já foi observado para o surubim (*Pseudoplatystoma* ssp.) em outras regiões do país (Alves et al., 2007; Carvalho et al., 2008).

O cultivo comercial de híbridos como se fossem espécimes puros pode ser bastante problemático, já que estes, em geral, necessitam de medidas mais rigorosas para prevenção de escapes dos cultivos devido aos riscos potenciais que esses indivíduos apresentam para as populações selvagens. Híbridos estéreis podem competir por alimentos e por reprodução, já que não produzem descendentes, podem implicar no declínio populacional da espécie parental. Híbridos férteis podem cruzar com espécies parentais e incidirem em introgressão gênica e em casos extremos contribuir para a extinção local da espécie (Allendorf et al., 2001). Além disso, híbridos confundidos com espécies parentais serão certamente ilegalmente comercializados com essa mesma identificação, como já foi relatado com outros híbridos produzidos no Brasil (Carvalho et al., 2008).

A utilização de híbridos como matrizes produtoras de alevinos também pode ser especialmente problemática, já que a fertilidade diferencial pode afetar a produtividade, e no caso dos híbridos do tambaqui, ainda existem poucos estudos sobre este aspecto biológico (Kubitza, 2004; Toledo-Filho et al., 1994). Neste sentido, as implicações da utilização de híbridos como matrizes não são totalmente conhecidas, mas alguns autores já chamam a atenção para os prejuízos da manutenção de indivíduos improdutivos e a perda de características zootécnicas desejáveis nos estoques cultivados através do retrocruzamento (Toledo-Filho et al., 1994; McAndrew and Napier, 2010).

A análise genética tem muito a oferecer para o manejo de espécies de peixes, principalmente por prover ferramentas inequívocas para identificação de indivíduos (Ward, 2000). Recentemente com o desenvolvimento de várias técnicas moleculares, a identificação de híbridos tem se tornado uma tarefa mais fácil (Allendorf et al., 2001). Uma destas técnicas é a PCR Multiplex, que permite amplificar em uma só reação mais de uma região utilizando um conjunto de diferentes primers, sendo considerada rápida, de baixo custo e baixa complexidade (Markoulatos et al., 2002; Magnussen et al., 2007; Hashimoto, 2010).

No presente trabalho utilizou-se a técnica de PCR – Multiplex do gene nuclear α - Tropomiosina, e sequências de DNA da Região Controle do DNA mitocondrial, para identificar precisamente o grau de pureza de matrizes reprodutoras de uma central de produção de alevinos, e para confirmar a pré-rotulagem de indivíduos (puros e híbridos) cultivados em várias pisciculturas da região oeste do estado do Pará.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Foram coletadas 195 amostras de indivíduos pré-identificados como tambaqui, pirapitinga, tambacu e tambatinga. Os espécimes foram provenientes de 18 locais, sendo uma central de alevinagem e 17 pisciculturas. A amostra do plantel foi constituída de 41 animais reprodutores da Estação de Piscicultura de Santa Rosa, da Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado do Pará, localizada no Município de Santarém. Os espécimes de cultivo comercial totalizaram 154 indivíduos, obtidos em 17 de pisciculturas localizadas em nove municípios da região Oeste do Pará, que compreende as mesorregiões do baixo Amazonas e o sudeste paraense, conforme ilustrado na Figura 1. Os indivíduos foram coletados com autorização do IBAMA de N° 24297.

Todas as pisciculturas amostradas adquiriram seus alevinos de forma direta ou indireta da Estação de Piscicultura de Santa Rosa, da Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado do Pará. Dois dos produtores também coletaram alevinos na natureza e um produtor adquiriu alevinos de produtores do estado de Sergipe (Tabela 1).

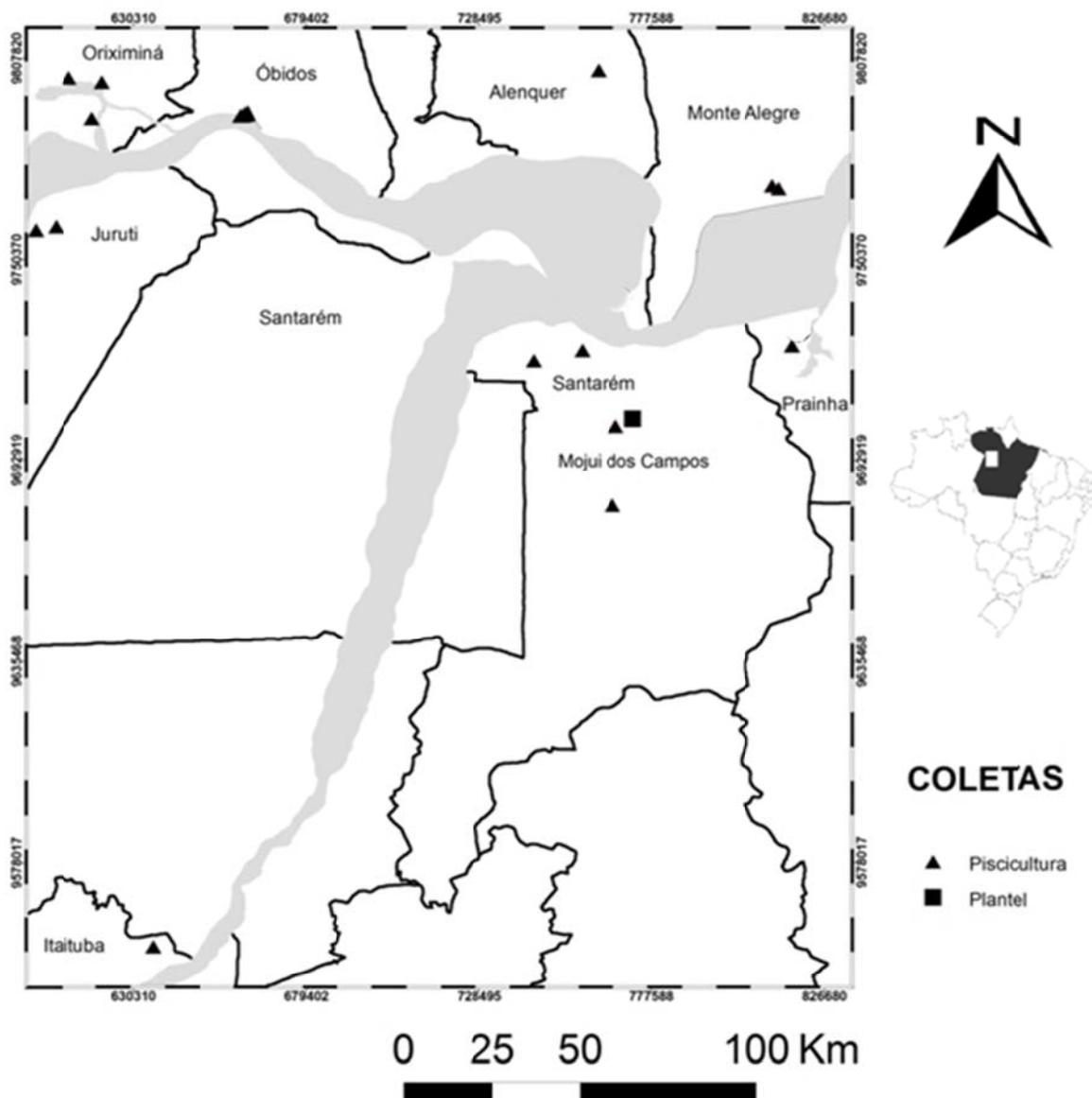


Figura 1: Mapa geográfico da Região Oeste do Pará com os locais amostrados.

Após os indivíduos serem pré – identificados pelos piscicultores, foi retirado cerca de 1cm^2 de tecido da nadadeira caudal, que foram então armazenados em microtubos de 1,5 ml contendo álcool absoluto, e posteriormente congelados em freezer a -20°C , até o momento da extração do DNA.

2.2. Extração de DNA

A extração do DNA total foi feita utilizando-se o Kit *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* da Promega, EUA. O protocolo da extração deste kit pode ser sintetizado da seguinte forma: lise do tecido com EDTA e *Nuclei Lysis Solution*; digestão das proteínas com Proteinase K; degradação do RNA com *RNase*; separação das proteínas com *Protein Precipitation Solution*; precipitação do DNA com Isopropanol; purificação do DNA com Etanol; e hidratação do DNA com *Rehydration Solution*.

O produto da extração de DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com GelRed 10.000X diluído conforme recomendações do fabricante, e visualizado no transiluminador de luz ultravioleta, para serem avaliados e estimados a qualidade e a quantidade do DNA resultante da extração.

2.3. PCR Multiplex

Para a identificação molecular de todos os espécimes utilizou-se a técnica de PCR Multiplex do gene α - Tropomiosina, usando-se o seguinte conjunto de primers descritos por Gomes et al. (2012, in press): Tropo Serra F (5' - GAGTTGGATCGGGCTCAG- 3'), comum para as três espécies, e Tropo Cm R (5' - ATACAACAATGCCATCGCT- 3'), Tropo Pm R (5' -CTTCAGCTGGATCTCCTGA-3'), e Tropo Pb R (5' -TTGACTTTATGCCACACAAAT- 3'), específicos respectivamente para o *Colossoma macropomum*, *Piaractus mesopotamicus* e *Piaractus brachypomus*.

As reações de PCR Multiplex foram preparadas para um volume final de 20 μ l contendo 12,35 μ l de ddH₂O, 1,5 μ l de dNTPs (concentração), 2 μ l de Tampão 10X (20mM Tris-HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 0,75 μ l de MgCl₂ (50 mM), 1,5 μ l de DNA, 0,2 de *Taq* polimerase (5UI/ μ l), 0,3 μ l Tropo Serra F, 0,3 μ l de Tropo Pm R, 0,3 μ l de Tropo Pb R e 0,8 μ l de Tropo Cm R.

As condições da reação foram otimizadas em desnaturação inicial a 95° C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação inicial a 95° C por 30 segundos, anelamento a 59° por 30 segundos e extensão a 72° por 5 segundos (PCR) e extensão final por 5 minutos (Pós – PCR).

Os fragmentos de DNA gerados pela PCR multiplex, juntamente com *ladder* para a determinação do tamanho dos fragmentos, foram aplicados em gel de agarose a 2% corado com GelRed 10.000X diluído conforme recomendações do fabricante, sendo submetido à eletroforese de 100 Volts durante 50 minutos e visualizado no transiluminador de luz ultravioleta, e documentado por meio do sistema de imagem KODAK Gel Logic 112.

2.4. Amplificação D-loop e sequenciamento

Para identificação da origem materna dos indivíduos foi amplificada a região D-loop mitocondrial utilizando-se os primers D-loop L1 (5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGGTATTC-3') e D-loop H2 (5'-TGTTTATCACTGCTGRRTTCCCT-3') (Santa Brígida et al., 2007). As reações foram preparadas para um volume total de 25µl contendo: 2,5 de Tampão 10X(20mM Tris-HCl); 4µl dNTPs; 1µl MgCl₂ (50 mM); 1µl a 1,5µl de DNA; 0,25µl de D-loop H1; 0,25µl de D-loop L1; 0,2 de *Taq* polimerase e a quantidade necessária de água para completar o volume final da reação.

As condições utilizadas para a amplificação de D-loop foram: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, hibridização a 57° C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos, finalizando com extensão final a 72 °C por 7 minutos. O produto da PCR foi submetido à reação de sequenciamento de DNA com o Kit *ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction*, seguindo-se de eletroforese no sequenciador ABI 3500XL(ambos da Applied Biosystems, Foster City, USA).

As sequências de DNA foram editadas e alinhadas no programa BIOEDIT 5.0.6 (HALL, 1999), e em seguida foram comparadas com o banco de sequências disponível no GenBank para identificação da linhagem materna parental.

3. Resultados

3.1. PCR Multiplex

A reação de PCR Multiplex amplificou diferentes tamanhos de fragmentos do gene α - Tropomiosina para as três espécies estudadas, sendo 300 pares de bases para o Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), 200 pares de bases para o tambaqui (*Colossoma macropomum*), e 150 para a Pirapitinga (*Piaractus brachypomus*). Indivíduos híbridos exibiram padrões com duas bandas conforme as espécies parentais. Para o híbrido tambatinga foram observadas bandas com 150 e 200 pares de bases e para o tambacu de 200 e 300 pares de bases. (Figura 2).

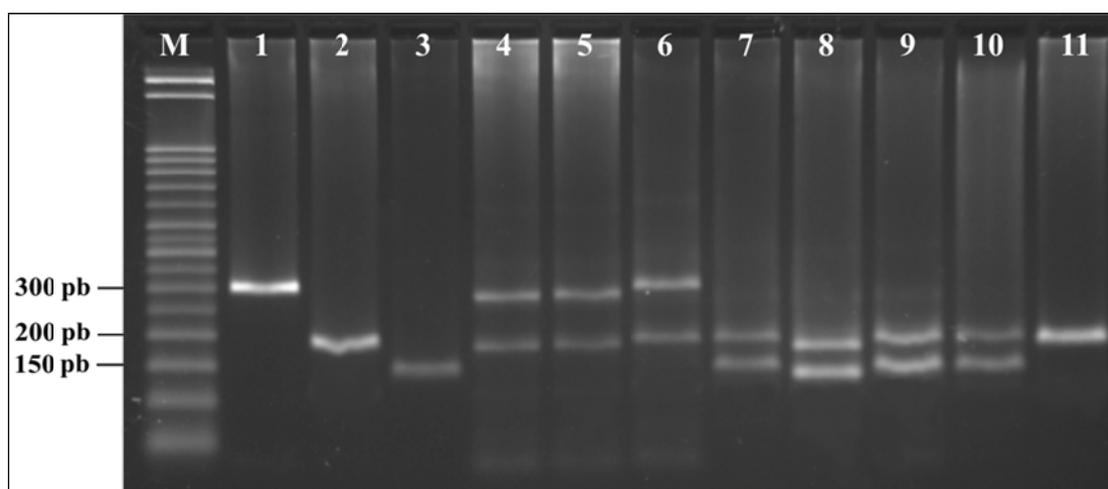


Figura 2: Gel de agarose (2%) corado com GelRed, mostrando o resultado da PCR multiplex do gene α - tropomiosina de espécimes puros de pacu (1), tambaqui (2) e pirapitinga (3), e de exemplares de cultivos da região oeste do Pará: tambacu (4 a 6), tambatinga (7 a 10), tambaqui (11) e (M) a esquerda é mostrado o Ladder de 1 Kb.

Os erros de identificação totalizaram 22 indivíduos, o correspondente a 14% dos espécimes amostrados nas pisciculturas foram identificados erroneamente pelos piscicultores. Destes, 50% dos erros foram híbridos identificados erroneamente como espécie pura, 45% eram espécies puras identificadas como híbridos, e 5% constituíam híbridos diferentes dos originalmente reportados (Tabela 1).

Dos nove municípios amostrados, somente na cidade de Prainha não foram detectados erros de identificação (Tabela 1). Em 47% das pisciculturas amostradas foram encontrados erros de identificação. As pisciculturas que mais tiveram identificações errôneas dos indivíduos foram à piscicultura da Comunidade de Santo Antônio no Rio Cachoeri, município de Oriximiná e a piscicultura da comunidade de Água Branca, município de Mojuí dos Campos, e, com 60% e 78% respectivamente dos indivíduos identificados erroneamente pelos produtores.

Em 75% das pisciculturas que tinham o cultivo simultâneo de espécies puras e híbridas foram encontrados erros quanto à identificação dos indivíduos pelos piscicultores, e destes erros, 80% correspondiam a híbridos identificados como espécies puras, 13% eram espécies puras identificadas como híbridos e 7% eram híbridos diferentes dos reportados. Nas pisciculturas em que os produtores presumiam existir somente híbridos ou espécies puras foram encontrados erros de identificação em 22% delas, sendo todos os erros relacionados a híbridos identificados como espécies puras e comprados de forma indireta da Estação de Piscicultura de Santa Rosa.

Com relação à amostra do plantel de matrizes da Estação de Piscicultura de Santa Rosa (SEPAq), todos foram geneticamente identificados como Tambaqui de acordo com o tamanho dos fragmentos amplificados que foi de 200 pares de bases (Figura 3).

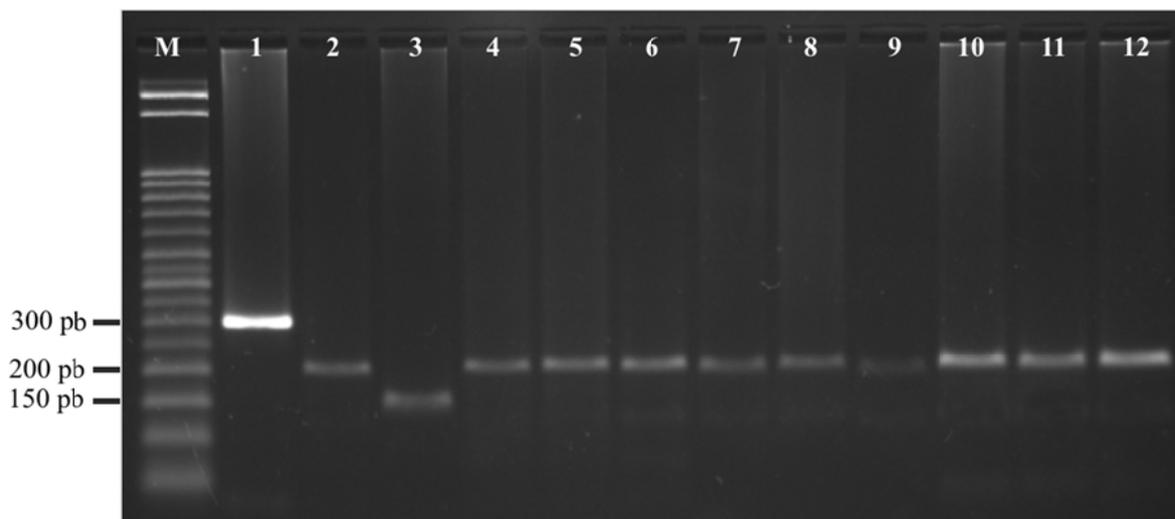


Figura 3: Gel de agarose (2%) corado com GelRed mostrando o resultado da PCR do gene α - tropomiosina de espécimes puros de Pacu (1), Tambaqui (2, 4 a 12) e Pirapitinga (3). Os espécimes de 4 a 12 são matrizes da SEPAq – STM e (M) a esquerda mostra-se o Ladder de 1 Kb.

3.2. Região D-loop do DNA mitocondrial

Quando comparadas com as sequências depositadas no GenBank, todas as sequências da Região D-loop do DNA mitocondrial foram identificadas geneticamente como sendo de Tambaqui, com similaridade superior a 99% com as de *C. macropomum*, e portanto, confirmando o padrão de hibridização usado na região, em que são usadas apenas fêmeas de Tambaqui para a produção dos híbridos Tambatinga e Tambacu. Isto foi também observado em estudo anterior com amostras do leste do Pará, do Amapá, de Rondônia, e do Piauí (Gomes et al., 2012 in press).

Tabela 1: Origem e identificação morfológica e molecular dos espécimes analisados

Local da Piscicultura	Data da coleta	Numero de indivíduos	Origem dos Alevinos	Identificação pelos piscicultores	Identificação genética Multiplex+mtDNA	Tipo de erro de identificação
Alenquer	Jul/2010	10	SEPAq	5 tambaqui/5 tambatinga	8 tambaqui/2 tambatinga	3*
Itaituba	Fev/2011	10	SEPAq	4 tambaqui/3 tambatinga 3 tambacu	5 tambaqui/3 tambatinga 2 tambacu	1*
Juruti1	Nov/2010	7	SEPAq	7 tambatinga	7 tambatinga	
Juruti2	Nov/2010	9	SEPAq	9 tambaqui	8 tambaqui/1 tambatinga	1**
Mojui dos Campos1	Set/2010	9	SEPAq / Sergipe	2 tambaqui/5 tambatinga 2 pirapitinga	6 tambaqui/2 tambatinga 1 Tambacu	4*, 2**, 1***
Mojui dos Campos		10		6 tambaqui/4 tambatinga	6 tambaqui/4 tambatinga	
Monte Alegre1	Dez/2010	10	SEPAq / Nativo	10 tambaqui	10 tambaqui	
Monte Alegre2	Dez/2010	7	SEPAq	5 tambaqui/ 2 tambatinga	6 tambaqui/1 tambatinga	1*
Óbidos1	Out/2010	7	SEPAq	2 tambaqui/5 tambatinga	3 tambaqui/4 tambatinga	1*
Óbidos2	Out/2010	10	SEPAq	10 tambaqui	10 tambaqui	
Óbidos3	Out/2010	10	SEPAq	10 tambaqui	10 tambaqui	
Oriximiná1	Jun/2010	10	SEPAq	10 tambaqui	10 tambaqui	
Oriximiná2	Jun/2010	10	SEPAq	10 tambaqui	10 tambaqui	
Oriximiná3	Jun/2010	10	SEPAq / Nativo	10 tambaqui	4 tambaqui/6 tambatinga	6**
Prainha	Jan/2011	4	SEPAq	4 tambaqui	4 tambaqui	
Santarém1	Mai/2010	10	SEPAq	5 tambaqui/5 tambatinga	3 tambaqui/7 tambatinga	2**
Santarém2	Mai/2010	11	SEPAq	6 tambaqui/5 tambatinga	6 tambaqui/5 tambatinga	
Estação SEPAq	Abr/2011	41	_____	41 tambaqui	41 tambaqui	
_____	_____	195	_____	149 tambaqui/41 tambatinga 3 tambacu/2 pirapitinga	150 Tambaqui/42 tambatinga 3 tambacu	10*, 11**, 1***

* Espécimes puros identificados erroneamente como híbridos; ** Híbridos identificados erroneamente como espécimes puros; *** Híbridos diferentes dos reportados pelo piscicultor.

4. Discussão

Os impactos dos programas de aquicultura sobre a biodiversidade, particularmente de híbridos interespecíficos, indivíduos poliplóides, e estoques geneticamente modificados, tem motivado a realização de diversos estudos, principalmente para se avaliar os riscos que esses organismos oferecem para as populações selvagens. Os resultados de pesquisas nesta área fornecem assim informações relevantes para tomadas decisões quanto ao manejo das espécies e a redução dos riscos envolvidos com o cultivo de organismos aquáticos (Dunham et al., 2002; Svasand et al., 2007).

A aquicultura brasileira acha-se em franca expansão, com destaque para a atividade em águas continentais, com volume de crescimento superior às demais atividades pesqueiras. Segundo dados do IBAMA (2007) a aquicultura continental produziu cerca de 211 mil toneladas em 2007, um acréscimo de 10.2% em relação ao ano anterior (191 mil ton), enquanto a pesca extrativista marinha, que é a atividade mais expressiva do país neste componente, apresentou um crescimento relativo de somente 2,3% no mesmo período.

O tambaqui (*Colossoma macropomum*), juntamente com os híbridos tambacu e tambatinga representam o segundo componente mais expressivo da produção de aquicultura continental, com um montante de 43 toneladas em 2007, enquanto a pesca extrativista do Tambaqui em sua área nativa nos estados da região norte foi de 4.3 toneladas no mesmo ano (IBAMA, 2007). Isto demonstra o papel relevante da aquicultura continental, e em particular chama a atenção para o tambaqui, que é a espécie nativa brasileira de maior expressão nesta atividade. Embora seja uma espécie originalmente amazônica (Golding & Carvalho, 1982), o Tambaqui e seus híbridos vem sendo cultivados hoje por todo o Brasil (Valenti et al., 2000), com exceção dos três estados da região sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul).

Paralelamente ao crescimento da aquicultura mundial ferramentas genéticas tem se mostrado cada vez mais de grande relevância, pois podem ser usadas com eficiência para identificação precisa de espécies, discriminação entre espécimes puros e híbridos, além de possibilitar estimativas de variabilidade genética de estoques nativos e cultivados. No caso do Tambaqui, os estudos genéticos realizados em populações naturais, tem demonstrado a existência de uma só espécie, *Colossoma macropomum*, ao longo de toda a bacia amazônica brasileira, peruana e boliviana (Santos et al 2007; Farias et al., 2010), da mesma forma em que conjuntos de marcadores de microssatélites tem sido padronizados para estudos com a espécie e seus híbridos (Santos et al., 2009; Hamoy, 2010).

Neste trabalho a técnica de PCR Multiplex combinada com sequências do DNA mitocondrial mostrou-se eficiente para identificar precisamente uma amostra de 195 indivíduos, oriundos de uma central de alevinagem e de diferentes cultivos da Amazônia central (oeste do Pará). Foi possível distinguir precisamente híbridos de espécimes puros, como esperado para o marcador nuclear de origem biparental (Rhymer and Simberloff, 1996; Anderson and Thompson, 2002), além de identificar as fêmeas usadas nos cruzamentos para a produção dos alevinos (DNA mitocondrial).

O uso de PCR Multiplex para identificação de híbridos se mostrou bastante vantajosa quando comparada com outras ferramentas utilizadas tradicionalmente como a citogenética, isoproteínas e RFLP, pois é rápida, podendo ser executada em até quatro horas a partir da coleta da amostra; pode ser feita a partir de uma pequena parte de tecido de animal vivo (da nadadeira caudal); é de baixo custo e sem a necessidade da utilização adicional de enzimas de restrição, como em outros procedimentos similares (Hashimoto et al., 2010; Magnussen et al., 2007). De forma complementar, as sequências parciais da região D-loop do DNA

mitocondrial, de herança materna, fornecem informações valiosas para identificação do tipo de cruzamento realizado para obtenção dos híbridos.

Os resultados obtidos no presente estudo com a utilização simultânea do marcador nuclear e do mitocondrial evidenciou a problemática do cultivo de híbridos de *Colossoma macropomum* com *Piaractus brachypomus* e com *Piaractus mesopotamicus*, principalmente, concomitantemente com o cultivo das espécies puras, em especial com o *C. macropomum* (Tambaqui) que é a espécie mais produzida na Bacia Amazônica (Ostrensky et al., 2004; Suplicy, 2007; MPA, 2010).

No plantel de matrizes de Santa Rosa, onde é produzido a maior parte dos alevinos utilizados nas pisciculturas da Região Oeste do Pará, ficou confirmado que todas as matrizes de *Colossoma macropomum* eram puras, apresentando uma banda única de 200 pares de bases na PCR multiplex, e uma sequência de DNA 100% similar à desta espécie.

As análises genéticas do presente estudo revelaram erros de identificação em cerca de 15% dos indivíduos analisados, em 47% das pisciculturas. Em algumas pisciculturas as inconsistências chegaram a 60% do total analisado. Resultados similares foram observados por Gomes et al (2012, in press) em cultivos do Pará (7 pisciculturas), Amapá (1), Piauí (1) e Rondônia (1), mostrando que em virtude da alta similaridade entre os híbridos e seus parentais puros, erros de identificações são comuns. Isto comprova que a aquicultura na região ainda é uma atividade ainda em fase inicial de organização.

Do ponto de vista ambiental, a preocupação com o cultivo de híbridos da região amazônica são os escapes, que já foram registrados em trabalhos realizados em outras regiões (Orsi e Agostinho, 1999; Castellani e Barrella, 2006) e, por isso, merecem uma atenção especial na região em razão dos riscos potenciais que eles apresentam, em especial na região

amazônica onde duas das três espécies utilizadas são nativas (Goulding e Carvalho, 1982). Tais riscos dependem principalmente do grau de fertilidade dos indivíduos híbridos (Toledo – Filho et al., 1994), que no caso do Tambacu e da Tambatinga ainda são pouco estudados (Toledo – Filho et al., 1994; Kubtiza, 2004;). Segundo a literatura, híbridos férteis podem cruzar com espécies parentais resultando em introgressão gênica, e em casos extremos contribuir para a extinção da espécie (Allendorf et al., 2001).

Pelos riscos que os híbridos oferecem para as populações selvagens e as prováveis implicações comerciais e econômicas de uma identificação errônea de indivíduos, é preocupante o cenário atual do cultivo de híbridos na Bacia Amazônica. Desta forma, a utilização de ferramentas genéticas de baixo custo e a colocação de chips nas matrizes, deverá no futuro ser um procedimento de rotina para as centrais de produção de alevinos. Outra medida importante seria a proibição do cultivo de híbridos em locais onde existe grandes probabilidade de escapes para a natureza, como em tanques redes em rios amazônicos, e pisciculturas nas proximidades de rios sem a segurança apropriada. Tais medidas devem ser incorporadas na legislação que regula este tipo de atividade econômica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Pará (UFPA) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro disponibilizado ao Jonas Paz Aguiar. Gostaríamos de agradecer a Dra. Lenise Vargas Flôres da Silva e o Sr. Zacarias Marques de Oliveira pelo apoio às coletas na Estação Santa Rosa, e a Jeferson Carneiro, do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do IECOS, pelo apoio na otimização das técnicas laboratoriais. As coletas foram feitas com autorização do IBAMA, sob a licença n°. 24297.

5. Referencias Bibliográficas

- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* 16(11), 613-622.
- Alves, C., Vieira, F., Magalhaes, A., Brito, M., 2007. Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. *In: Bert TM (Ed.). Ecological and genetic implications of aquaculture activities, reviews: Methods and technologies in fish biology and fisheries.* Dordrecht: Springer, p.291-314.
- Anderson E.C., Thompson E.A., 2002. A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160, 1217–1229.
- Bartley, D.M., Rana, K., Immink, A.J., 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 10, 325-337.
- Calcagnotto, D., Almeida-Toledo, L.F., Bernardino, G., Toledo-Filho, S.A., 1999. Biochemical genetic characterization of F1 reciprocal hybrids between neotropical pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and tambaqui (*Colossoma macropomum*) reared in Brazil. *Aquaculture* 174, 51–57.
- Carvalho, D.C., Seerig, A., Melo, D.C., Sousa, A. B., Pimenta, D., Oliveira., D.A.A., 2008. Identificação molecular de peixes: o caso Surubim (*Pseudoplastystoma* spp.). *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 32 (4), 215-219.
- Dunham, J. B., Adms, S.B., Schoeter, R. E., 2002. Alien invasions in aquatic ecosystems: Toward an understanding of brook trout invasions and potential impacts on inland cutthroat trout in western North America. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12, 343-391.

- Farias, I. P., J. P. Torrico, C. García-Dávila, M. C. F. Santos, T. Hrbek, and J.-F. Renno. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 1129-1135.
- Gomes F., Schneider H., Barros C., Sampaio D., Hashimoto D., Porto – Foresti F., Sampaio I., 2012. Innovative molecular approach to the identification of the tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its hybrids. *An Acad Bras Cien* 84(2), 5-8.
- Goulding, M., Carvalho, M.L., 1982. Live history and management of the tambaqui, (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1, 107-133.
- Hall T.A., 1999. BIOEDIT: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Ac Symp Ser* 41, 95-98.
- Hamoy, I.G., Cidade, F.W., Barbosa M.S, Gonçalves E.C., Santos D., 2010. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes). *Conserv Genet Resour* 3: 33-36.
- Hashimoto, D.T., Mendonça, F.F., Senhorini, J.A., Bortolozzi, J., Oliveira, C., Foresti, F., Porto-Foresti, F., 2010. Identification of hybrids between Neotropical fish *Leporinus macrocephalus* and *Leporinus elongatus* by PCR-RFLP and multiplex-PCR: tools for genetic monitoring in aquaculture. *Aquaculture* 298, 346-349.
- Kubtiza, F., 2004. Coletânea de informações aplicadas ao cultivo do tambaqui, do pacu e de outros peixes redondos. *Panorama da Aquicultura* 14: 82, 26-39.
- Magnussen, J.E., Pikitch, E.K., Clarke, S.C., Nicholson, C., Hoelzel, A.R., Shivji, M.S., 2007. Genetic tracking of basking shark products in international trade. *Anim. Conserv.* 10, 199–207.

- Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M., 2002. Multiplex Polymerase Chain Reaction: A Practical Approach. *J. Clinical Lab. Analysis* 16, 47–51.
- McAndrew, B., Napier, J., 2010. Foresight Project on global food and farming futures. Application of genetics and genomics to aquaculture development: current and future directions. *Journal of Agricultural Science*, 1-9.
- Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA, 2010. Boletim Estatístico da Pesca Aquicultura, 2008 – 2009, p. 99.
- Ostrensky, A., Borghetti, Jr., Soto, D., 2008. Aquicultura no Brasil: O Desafio é Crescer / Editores : Antonio Ostrensky, José Roberto Borghetti e Doris Soto. – Brasília, p. 276.
- Puigcerver, M., Vinyoles, D., Rodríguez-Teijeiro, J. D., 2007. Does restocking with japanese quail or hybrids affect native populations of common quail *Coturnix coturnix*? *Biological Conservation* 36, 628-635.
- Rhymer, J., Simberloff, D., 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 27, 83–109.
- Santa-Brígida E.L., Cunha D.B., Rego O.S., Sampaio I., Schneider, H., Vallinoto, M., 2007. Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. *J Braz Biol* 67: 919-924.
- Santos, M.C.F., Hrbek, T., Farias, I.P., 2009. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. *Molecular Ecology Resources*, 9: 874-876.
- Senhorini, J.A., Figueiredo, G.M., Fontes, N.A., Carosfeld, J., 1988. Larvicultura e alevinagem do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) e seus respectivos híbridos. *Boletim Técnico do CEPTA*. V. 1. p. 19-30.

- Suplicy, F.M., 2007. Freshwater fish seed resources in Brazil, in: Bondad-Reantaso, M.G. (Ed.), Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper, No. 501, FAO, Rome, pp. 129-143.
- Svasand, T., Crossetti, D., García-Vásquez, E., Verspoor, E., 2007. Genetic impact of aquaculture activities on native populations, pp 174.
- Toledo-Filho, S.A., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F., Bernardino, G., Calcagnotto, D., 1994. Monitoramento e conservação genética em projeto de hibridação entre pacu e tambaqui. Cadernos de Ictiogenética 2, CCS/USP, São Paulo.
- Valenti, W.C., Poli, C.R., Pereira, J.A., Borghetti, J.R. 2000. Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável. CNPq/Ministério da Ciência e Tecnologia, Brasília. 399p.
- Ward, R. D., 2000. Genetics in fisheries management. *Hydrobiologia* 420, 191–201.

CAPITULO II

**Varição genética em populações nativas e cultivadas de
tambaqui (*Colossoma macropomum*) na Amazônia:
discrepâncias regionais entre sistemas de cultivo**

**Variação genética em populações nativas e cultivadas de
tambaqui (*Colossoma macropomum*) na Amazônia:
discrepâncias regionais entre sistemas de cultivo**

Autores:

*Laboratório de Genética e Biologia Molecular, Instituto de Estudos Costeiros
Universidade Federal do Pará – Campus Bragança, PA, Brasil*

Correspondência do Autor: Telefone: (093) 9115-4408; E-mail:
jonasdapaz@hotmail.com (Jonas da Paz Aguiar).

Resumo

O tambaqui, *Collossoma macropomum*, é a espécie mais usada na aquicultura na região Amazônica. Apesar do cultivo desta espécie ser importante como alternativa para a exploração dos recursos pesqueiros, esta atividade precisa ser estrategicamente planejada para que seja rentável, sustentável, e não venha a trazer prejuízos para as populações naturais, que já encontram em estado claro de sobreexploração. No presente trabalho utilizamos sequências de DNA da Região Controle do DNA mitocondrial para avaliara diversidade genética entre duas populações naturais, um plantel de matrizes produtoras de alevinos, e estoques cultivados do tambaqui, todos da região Oeste do Pará. Foram observados níveis similares (ao redor de 1.5%) de diversidade nucleotídica entre todos os conjuntos analisados, e uma diversidade haplotípica de 0.99 (nativos), 0.93 (plantel de matrizes) e 0.83 (cultivo). A AMOVA e o F_{ST} mostraram que não existem diferenças genéticas entre as duas populações naturais, mas existem diferenças discretas entre estas e o plantel de matrizes, e um pouco mais acentuadas em relação aos estoques cultivados, embora se verifique claramente uma grande representatividade genética do estoque nativo nas matrizes produtoras de alevinos e nos espécimes cultivados na região. Isto é importante, pois estes dados contrastam fortemente com um estudo anterior que encontrou somente dois haplótipos mitocondriais em uma grande amostra de cultivo de outra região do estado do Pará, de Rondônia, Piauí e Amapá, que, apontava para uma situação de endogamia histórica em matrizes produtoras de alevinos de tambaqui. Os resultados desses dois estudos apontam para diferentes cenários de cultivo do tambaqui na Amazônia, que devem ser melhor avaliados para incremento

desta atividade na região norte e no Brasil como um todo, uma vez que o tambaqui e seus híbridos são hoje amplamente cultivados no país.

Palavras – Chave: Tambaqui, mtDNA, Variabilidade genética, Aquicultura

1. Introdução

Colossoma macropomum (Cuvier, 1818), conhecida popularmente como tambaqui, pode ser encontrado naturalmente no Rio Orinoco e nos Rios da Bacia Amazônica (Goulding e Carvalho, 1982; Araújo-Lima e Goulding, 1998). Esta espécie representa um dos recursos pesqueiros mais importantes da Bacia Amazônica, perfazendo grande parte da composição da pesca ribeirinha, e sendo boa parte desse pescado utilizado na alimentação das populações tradicionais (Batista et al., 1998; Batista e Petrere Jr, 2003; Batista et al., 2004).

O cenário atual é de grande pressão sobre o estoque pesqueiro desta espécie, resultando em diminuição significativa do volume de captura, e do tamanho dos indivíduos capturados (Batista e Petrere Jr, 2003; Isaac e Ruffino, 2003). Atualmente, segundo a instrução normativa nº 5, de 21 de maio 2004 do Ministério do Meio Ambiente, esta espécie encontra-se sobreexplorada ou ameaçada de sobreexploração.

Ao contrario da pesca extrativista, a produção de tambaqui resultante da aquicultura continental vem aumentando, sendo atualmente a espécie mais importante da produção aquícola da região Norte do Brasil, correspondendo a mais de 70% da

produção de organismos cultivados em água continentais desta região (MPA, 2010; IBAMA, 2007; Ostrensky, 2008).

Apesar do cultivo do tambaqui como de outros organismos serem considerados essencialmente importantes para oferecer fontes alternativas à exploração dos recursos pesqueiros, está prática precisa ser estrategicamente pensada para que seja rentável e não venha trazer prejuízos para as populações selvagens desta espécie, principalmente, no que diz respeito à interação entre os indivíduos cultivados e a população nativa em razão dos escapes ou das liberações intencionais dos indivíduos dos programas de aquicultura (Arbeláez – Rojas et al., 2002; FAO, 2009).

Embora não existam dados concretos sobre estes escapes na região Norte do Brasil, bem como, seja difícil o monitoramento desses indivíduos no ambiente natural, são comuns os relatos de populares a respeito dos escapes através do rompimento ou transbordamento de barragens, fugas de tanques redes e ainda liberações intencionais de indivíduos. Os principais problemas ocasionados pela interação entre os indivíduos cultivados e nativos são à hibridação intraespecífica e a contribuição desigual de descendentes para a próxima geração resultando na diminuição do pool gênico (Allendorf et al., 2001; Utter et al., 2001; Araki et al., 2007; Araki e Schmid, 2010).

A hibridação intraespecífica pode ser definida como o cruzamento entre indivíduos da mesma espécie, porém de linhagens diferentes, isso pode ter importantes efeitos sobre a adaptação dos mesmos (Bartley et al., 2001). Alelos especialmente importantes no complexo adaptativo das populações locais, principalmente em episódios periódicos de condições ambientais extremas, como por exemplo, chuva e seca podem ser perdidos. Assim as liberações e os escapes de programas de aquicultura podem ser uma ameaça significativa para a integridade genética e a capacidade

evolutiva em longo prazo das populações selvagens (Allendorf et al., 2001; Glover et al., 2011).

O conhecimento da variabilidade genética dos indivíduos cultivados e selvagens pode ajudar no planejamento de ações para mitigar os impactos causados pelos escapes de indivíduos cultivados sobre as populações selvagens. Além disso, podem fornecer informações relevantes para a conservação da espécie e para a gestão dos estoques de programas de aquicultura (Newton, 1999; Marteinsdottir et al., 2007).

Alguns avanços têm sido feitos para ampliar o conhecimento sobre a variabilidade genética das populações nativas e de cativeiro de *Colossoma macropomum*. Utilizando principalmente a região controle do DNA mitocondrial, os estudos têm indicado que os indivíduos nativos constituem uma população panmítica com alta diversidade haplotípica e baixa diversidade nucleotídica e com altas taxas de migração entre as localidades (Santos et al., 2007; Farias et al., 2010), e para os indivíduos de pisciculturas os estudos têm indicado baixa diversidade genética (Calcagnotto e Toledo-Filho, 2000; Gomes et al., 2012 in press).

Uma questão importante na piscicultura é o perfil genético do plantel produtor de alevinos, visando evitar níveis elevados de endogamia e consequente perda de produtividade. No caso do tambaqui nenhum estudo foi feito até o momento para verificar a variação genética em matrizes utilizadas para a produção de alevinos e comparar tais níveis com os de populações nativas da espécie. Portanto, o presente estudo tem como objetivo preencher esta importante lacuna, ou seja, a comparar a variação genética entre populações naturais de tambaqui e entre estas com um plantel de matrizes e com estoques de pisciculturas da Amazônia brasileira.

2. Materiais e Métodos

2.1. Amostras

Esta análise foi realizada com 153 indivíduos, sendo 27 nativos do Rio Amazonas (Santarém, Para), 24 do Rio Curuá – Una (Prainha, Para), 39 de um plantel de matrizes da Estação de Aquicultura Santa Rosa, e 63 espécimes de cultivo (21 puros, 39 híbridos do tipo tambatinga e 3 híbridos do tipo tambacu) de 15 pisciculturas de municípios próximos a Santarém. Os 63 espécimes de piscicultura foram selecionados a partir de uma amostra de 153 animais de cultivo previamente genotipada por multiplex do gene nuclear da Alfa-Tropomiosina (Aguiar et al. em preparação – Capítulo anterior), e todos apresentam a linhagem materna mitocondrial de tambaqui. Da mesma forma, todos os indivíduos das duas populações nativas e do plantel também foram analisados e são tambaquis puros (homozigotos para α – Tropomiosina).

Os espécimes do plantel foram obtidos na Estação de Aquicultura Santa Rosa fazem parte do plantel total de matrizes de *C. macropomum*. Esta Estação pertence à Secretaria de Pesca e Aquicultura do Estado do Pará (SEPAq), é sediada na cidade de Santarém, Pará, e é a principal distribuidora de alevinos de tambaqui e outras espécies para esta região do Estado.

As coletas foram feitas em animais vivos em sua grande maioria, sendo retirado apenas um pequeno fragmento (cerca de 1 cm²) da nadadeira caudal.

2.2. Extração de DNA

A extração do DNA total foi feita utilizando-se o Kit de extração *Wizard® Genomic DNA Purification Kit* da Promega, EUA, cujo protocolo envolve a lise do

tecido com *Nuclei Lysis Solution*, digestão das proteínas com Proteinase K, degradação do RNA com *RNase*, separação das proteínas com *Protein Precipitation Solution*, precipitação e purificação do DNA com Isopropanol, lavagem com Etanol, e hidratação do DNA com *Rehydration Solution*.

2.3. Amplificação da Região controle e sequenciamento

Para a amplificação da Região Controle do DNA mitocondrial utilizou-se os primers L1 (5'-CCTAACTCCCAAAGCTAGGTA TTC-3') e H2 (5'-TGTTTATCACTGCTGRRTTCCCT-3'), segundo Santa Brígida et al., (2007). As reações de PCR foram preparadas para um volume total de 25µl contendo: 2,5 Buffer (20mM Tris-HCl); 4µl dNTPs (1.25 mM); 1µl MgCl₂ (50 mM); 1 de 1,5µl de DNA; 0,25µl de cada primer (L1 e H2, 200ng/µl); 0,2 de *Taq* polimerase (Invitrogen, 5U/µl), e água pura para completar volume de 25µl.

As condições da PCR foram: desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, hibridização a 57° C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, finalizando com extensão final a 72°C por 10 minutes. Os produtos resultantes foram submetidos à reação de seqüenciamento de DNA com o Kit *ABI Prism TM Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction* (*Applied Biosystems*), seguindo-se de eletroforese no sequenciador ABI 3500XL (*Applied Biosystems Inc.*).

2.4. Estimativas de Diversidade genética

As sequências de DNA foram editadas e alinhadas no programa BIOEDIT 5.0.6 (Hall, 1999) e uma rede de haplótipos foi feita utilizando-se o programa HaploViewer (Salzburger et al. 2011).

A variabilidade genética da população foi estimada a partir do número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (Nei, 1987), diversidade nucleotídica (Nei & Tajima, 1981). Também foi aplicado o teste de neutralidade F_S de Fu (Fu, 1997). A distribuição da variabilidade genética dentro e entre as populações foi inferida por meio da Análise de Variância Molecular (AMOVA) e complementada com análise de F_{ST} par a par, com a significância configurada para 10000 permutações randômicas. Todas essas medidas de variabilidades e estrutura populacional foram feitas utilizando-se os programas Arlequin versão 3.5. (Excoffier et al. 2005) e DnaSP versão 5.10 (Rozas et al. 2003).

3. Resultados

Ao total 703 pares de bases da Região Controle do DNA mitocondrial foram obtidos para 153 indivíduos, sendo observados 64 sítios polimórficos. Foram recuperados 67 haplótipos ao todo, sendo 51 haplótipos únicos e 16 compartilhados, e destes sete foram compartilhados entre as populações nativas e cultivadas. O haplótipo H3 foi o único encontrado em todos os locais amostrados (Tabela 1). A lista completa dos haplótipos pode ser vista no Anexo 1.

Tabela 1: Lista dos 16 haplótipos compartilhados entre os indivíduos nativos e de cativeiros de *Colossoma macropomum*.

Haplótipo	Rio Amazonas	Rio Curuá – Una	Plantel	Piscicultura
H1	2	2		2
H2	1	1		
H3	2	2	2	2
H4	1	1	1	
H8	1	1		
H9	1		1	
H13	2			
H19	1		7	1
H28		1	1	
H37		1	6	4
H42			5	20
H44			3	
H47			2	4
H56				15
H60				3
H61				3

Na Tabela 2 são apresentados, por local de coleta, o número de haplótipos, a diversidade haplotípica, a diversidade nucleotídica e os parâmetros do teste de neutralidade F_s de Fu. As populações nativas apresentaram valores mais elevados tanto

de diversidade haplotípica quanto de nucleotídica em relação ao plantel e amostras de piscicultura. A diversidade haplotípica do plantel também foi superior à da piscicultura, mas a nucleotídica é ligeiramente maior na piscicultura do que no plantel.

Quanto ao teste F_s de neutralidade genética, que estima a diferença entre o número observado de haplótipos e o esperado, as duas populações nativas apresentaram valores negativos e significantes ao nível de 5% (-10,226 e -9,792 para Amazonas e Curuá-Una, respectivamente). Esta medida não se aplica às duas populações artificiais (plantel e piscicultura).

Tabela 2: Índices de diversidade da região controle do mtDNA nos indivíduos nativos e de cativeiro.

Local	N	Numero de haplótipos	Diversidade haplotípica (h)	Diversidade nucleotídica (π)	F_s de Fu
Amazonas	27	24	0,9915±0,0125	0,0168±0,0087	-10,226*
Curuá-Una	24	22	0,9928±0,0144	0,0162±0,0085	-9,792*
Plantel	39	20	0,9312±0,0224	0,0139±0,0072	NA
Pisciculturas	63	18	0,8387±0,0326	0,0155±0,0079	NA

* Significante para 0,05; NA – Não se aplica.

A rede com todos os 67 haplótipos é mostrada na Figura 1. Os indivíduos nativos, do plantel e de pisciculturas, aparecem aleatoriamente distribuídos, sem qualquer estruturação geográfica aparente ou relacionada a um local específico de

coleta. Como a diversidade haplotípica das populações nativa é muito elevada (0.9915 e 0.9928) os indivíduos destas duas populações são encontrados geralmente em haplótipos isolados, enquanto que os espécimes do plantel e das pisciculturas mostram mais haplótipos compartilhados.

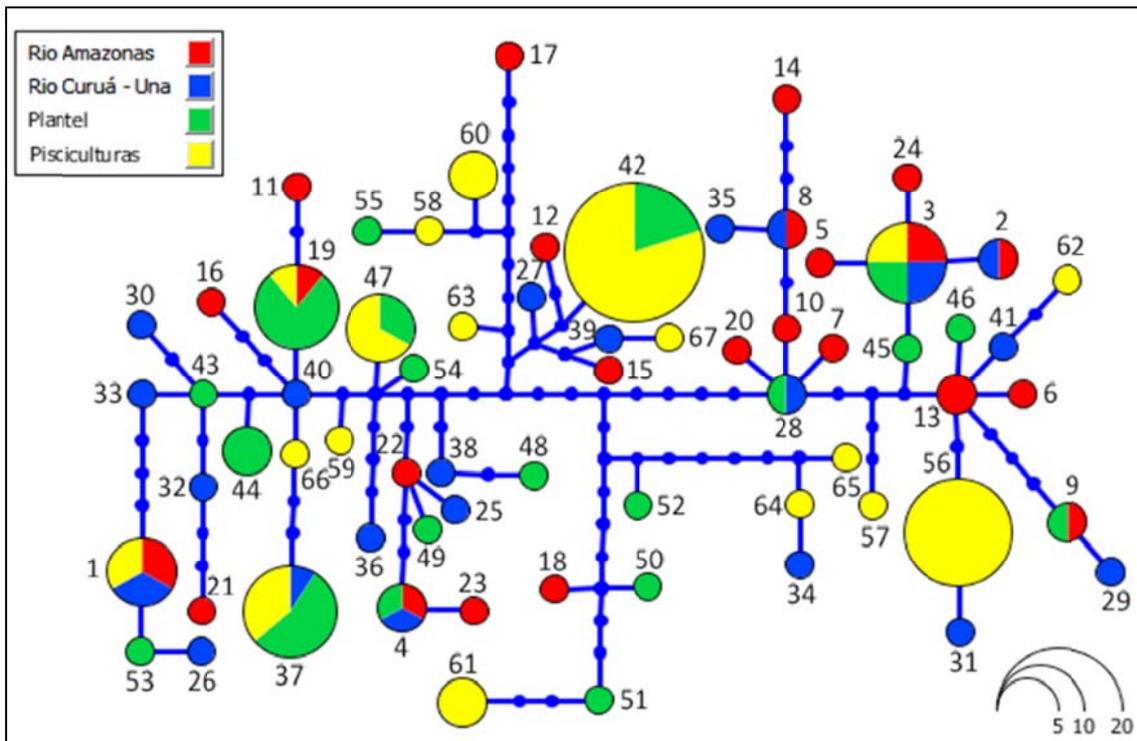


Figura 1: Rede de haplótipos, construída no software HaploViewer com base em sequências da Região Controle do DNA mitocondrial, de populações nativas e cultivadas de tambaqui na Bacia Amazônica.

Os resultados da AMOVA (Tabela 3) indicaram que existem diferenças genéticas na composição haplotípica das quatro populações. Apesar da maior porção da

variância genética ser observada dentro das populações (93,13%) e não entre as populações (6,85%), estas diferença resultam em um valor de F_{st} significativa ($P < 0,01$).

Tabela 3: Análise de variância molecular nas quatro populações de *Colossoma macropomum* analisadas (Amazonas, Curuá-Una, Plantel e Piscicultura).

Fonte da variação	Componentes da variância	Porcentagem da variação	F_{st}
Todas as populações			
Entre as populações	0,401	6,87	
Dentro das população	5,44	93,13	0,06868**

** Significante para 0,01

Na análise de F_{st} par-a-par (Tabela 4) verifica-se que as principais diferenças são em sua maioria entre as populações nativas e as artificiais (plantel e piscicultura), assim como entre plantel e piscicultura. As duas populações naturais (Amazonas e Curuá-Una) são geneticamente idênticas ($F_{st} = 0,00$; $P = 0,63$, não significativa), e o plantel apresenta discreta diferença tanto em relação às populações nativas ($F_{st} = 0,0954$ para o Amazonas, $P = 0,00391$), quanto em relação à de piscicultura ($F_{st} = 0,08938$, $P = 0,00$). Por outro lado, a comparação entre a piscicultura e a populações nativas mostrou – se um significativo F_{st} significativa para ambos.

Tabela 4: Matriz com os valores de *Fst* par-a-par entre as populações nativas, o plantel e a piscicultura de *C. macropomum*.

	Rio Amazonas	Rio Curuá-Una	Plantel	Pisciculturas
Rio Amazonas		0,63184	0,00391*	0,00391*
Rio Curuá-Una	-0,01140		0,05371	0,00586*
Plantel	0,09540	0,03334		0,0000*
Pisciculturas	0,07041	0,06982	0,08938	

* Significante para 0,05

4. Discussão

O cultivo de organismos aquáticos vem crescendo no mundo em função da demanda por alimentos (FAO, 2009). Similarmente, os impactos da produção vida da aquicultura sobre a integridade genética das populações selvagens e dos riscos de depressão endogâmica nos indivíduos cultivados também tem sido uma preocupação, principalmente em razão da necessidade de uma aquicultura mais rentável e com mínimos impactos sobre as populações nativas (Svasand *et al.* 2007).

O tambaqui da Amazônia (*Colossoma macropomum*) é a espécie mais utilizada pela aquicultura continental brasileira, e estudos relacionados à variação genética de estoques cultivados e de populações nativas já fragilizadas em razão do histórico de exploração são prioritários para prevenir impactos genéticos na população selvagem e

diminuir os riscos de depressão endogâmica nos indivíduos de cativeiro (MPA, 2010; Batista & Petrere Júnior, 2003; Isaac e Ruffino, 2003; Gomes et al., 2012 in press).

Usando sequências da região controle de DNA mitocondrial, o presente estudo encontrou elevada diversidade haplotípica (h) em duas populações nativas, e valores acima do esperado para em um plantel de matrizes produtoras de alevinos e em uma amostra de várias pisciculturas da região oeste do Pará. Os valores de h das duas populações naturais (0,99) são idênticos aos encontrados por Santos et al., (2007) para nativos de *Colossoma macropomum* da Amazônia brasileira usando a mesma região do genoma mitocondrial. A amostra do plantel de matrizes apresentou diversidade haplotípica ligeiramente menor ($h= 0.93$), mas pela quantidade de haplótipos compartilhados com das duas populações nativas (ver Tabela 2) verifica-se que este plantel tem uma alta representatividade da variabilidade genética das populações nativas, o que de certa forma não surpreende, pois esta central de alevinagem localiza-se em Santarém, às margens do rio Amazonas, com todas as facilidades para reposição de matrizes com exemplares da natureza.

A diversidade nucleotídica (π) das duas populações naturais, como esperado, foram ligeiramente mais elevada (0.0162 no Rio Amazonas e 0.0168 no Rio Curuá-Una) do que das artificiais (0.0155 de piscicultura e 0.0139 do plantel Santa Rosa). Estes valores são muito similares entre si e também aos 0.012 registrados anteriormente por Santos et al.(2007) e posteriormente por Farias et al. (2010) em uma análise mais abrangente com 127 tambaquis do Brasil (incluindo as amostras de Santos et al., 2007), 33 do Peru e 75 da Bolívia.

A comparação da variação genética entre populações, feita por AMOVA e *Fst* par-a-par, mostrou um padrão coerente e já esperado para populações nativas de *C.*

macropomum: uma diversidade haplotípica alta entre as duas populações naturais (Amazonas e Curuá-Una) e similar às nativas previamente estudadas por Santos et al. (2007) e Farias et al. (2010). Tanto a AMOVA quanto o *Fst* mostraram que não existem diferenças significativas entre Amazonas e Curuá-Una, e o teste *Fs* de Fu (Fu, 1997) aponta para uma expansão populacional histórica, ou seja, recuperação de variabilidade genética após um “gargalo-de-garrafa” antigo, possivelmente não relacionado com a pesca da espécie.

Ainda em relação à distribuição da variação genética, no caso do plantel e da amostra das pisciculturas, as diferenças, apesar de não muito acentuadas, foram estatisticamente significante para algumas comparações, como demonstrado pela AMOVA e pelo *Fst* par-a-par, mostrando perda de haplótipos ao se constituir o plantel produtor de alevinos da estação Santa Rosa, e no caso das pisciculturas a esperada perda haplotípica durante a produção de alevinos, em virtude da manipulação de somente poucas matrizes neste processo. É interessante destacar que o “pool” das pisciculturas com o plantel foi mais diferente que com as populações nativas, e isso aponta para uma prática curiosa na região em que alguns piscicultores coletam juvenis na natureza e misturam aos seus juvenis da central de alevinagem, o que pode introduzir novos haplótipos da natureza no estoque cultivado.

A elevada variação genética tanto no plantel como nos estoques cultivados na região oeste do Pará foi altamente surpreendente quando comparada a um estudo recente em pisciculturas de tambaqui do extremo leste do Estado do Pará. Ao contrário da presente análise, que encontrou uma diversidade haplotípica de 0.84 (18 haplótipos) em 63 exemplares de 15 pisciculturas, Gomes et al. (2012, in press) encontraram para a mesma região de DNA somente dois haplótipos em 93 espécimes de 10 pisciculturas (7

do leste do Pará, uma do Amapá, uma de Rondônia, e uma do Piauí), obtidos em coletas aleatórias ao longo de dois anos. Com base nos resultados, Gomes et al. (2012) deduziram que a principal fornecedora dos alevinos dos 10 cultivos analisados, localizada nas proximidades de Castanhal (leste do Pará), possivelmente apresentava alto grau de endogamia histórica entre suas matrizes, mas isto não pode ser comprovado uma vez que o referido plantel não foi analisado no estudo citado.

Estes dois estudos independentes para a mesma espécie, e ambos na região amazônica, mostram que existem cenários muito diferentes para o cultivo de tambaqui e seus híbridos na região norte do Brasil, com algumas pisciculturas cultivando alevinos de matrizes com baixa variabilidade genética, e outras com alevinos com boa representatividade genética das populações nativas de tambaqui. Estes constituem, sem dúvida, dois modelos para futuros estudos de desempenho zootécnico correlacionado com a estrutura genética nos estoques cultivados na região.

Os dados genéticos de DNA mitocondrial de populações nativas acumulados até o momento apoiam a tese preliminar de Santos et al. (2007) e Farias et al. (2010) de que *Colossoma macropomum* constitui uma grande população panmítica ao longo de sua distribuição na Amazônia brasileira, peruana e boliviana. Isto é um dado importante e vantajoso para a aquicultura desta espécie, pois garante que a introdução de matrizes da natureza para os plantéis produtores de alevinos pode ser feita de qualquer região da Amazônia sem riscos de comprometer a viabilidade genética dos plantéis.

Finalmente é importante destacar as práticas diferentes usadas na aquicultura de uma mesma região, a do leste do Pará, com o cultivo de alevinos com baixa variabilidade genética (Gomes et al., 2012, in press), e a da região oeste do Estado usando matrizes da natureza, como alta variabilidade genética, para a produção dos

alevinos (presente estudo). Os dois processos apresentam vantagens e desvantagens, e um equilíbrio deve ser encontrado para o estabelecimento de uma aquicultura economicamente rentável e sustentável, e com o menor impacto possível sobre as populações nativas, principalmente com escapes de híbridos, amplamente cultivados tanto em áreas distantes da distribuição nativa de *C. macropomum*, como no “coração” de sua área de distribuição, a bacia amazônica.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Pará (UFPA) pelo financiamento do projeto e a Fundação de Amparo à Pesquisa do estado do Pará (FAPESPA) pelo suporte financeiro disponibilizado ao Jonas Paz Aguiar. Gostaríamos de agradecer a Dra. Lenise Vargas Flôres da Silva e o Sr. Zacarias Marques de Oliveira pelo apoio às coletas na Estação Santa Rosa, e a Jeferson Carneiro, do Laboratório de Genética e Biologia Molecular do IECOS, pelo apoio na otimização das técnicas laboratoriais. As coletas foram feitas com autorização do IBAMA, sob a licença n^o. 24297.

5. Referencias Bibliográficas

- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P., Wenburg, J.K., 2001. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* 16, 613-622.
- Araki, H., Cooper, B., Blouin, M.S., 2007. Genetic effects of captive breeding cause a rapid, cumulative fitness decline in the wild. *Science* 318, 100–103.
- Araki, H., Schmid, C., 2010. Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, Limitations

- and future directions in ecological and genetic surveys. *Aquaculture* 308, 2 – 11.
- Araújo-Lima, C. A. R. M., Goulding, M., 1998. Os Frutos do Tambaqui. *Ecologia, Conservação e Cultivo na Amazônia*. Belém: Sociedade Civil Mamirauá – MCT CNPq.
- Arbeláez - Rojas, G. A., Fracalossi, D. M., Fim, J. D. I., 2002. Composição Corporal de Tambaqui, *Colossoma macropomum*, e Matrinxã, *Brycon cephalus*, em Sistemas de Cultivo Intensivo, em Igarapé, e Semi – Intensivo, em Viveiros. *R. Bras. Zootec.* 31, pp. 1059 – 1069.
- Bartley, D.M., Rana, K., Immink, A.J., 2001. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 325-337.
- Batista, V. S. and Petrere Jr. M., (2003) Characterization of the commercial fish production landed at Manaus, Amazonas State, Brazil. *Acta Amazonica* 33, 53-66.
- Batista, V. S., Inhamus, A. J., Freitas, C. E. C., 1998. Characterization of the fishery in river communities in the low-Solimões/high-Amazon region. *Fisheries Management and Ecology* 5, 419 – 435.
- Batista, V. S., Isaac, V. J., Viana, J. P., 2004. Exploração e manejo dos recursos pesqueiros, in: Ruffino, M. L., *A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira*. ProVárzea, pp. 63-151.
- Calcagnotto, D., Toledo-Filho, S.A., 2000. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). *Genetics and Molecular Biology* 23, 127-130.
- Excoffier, L., Laval, G. and Schneider, S., 2005. Arlequin ver. 3.11: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47 – 50.

- FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture – 2008 (SOFIA), 2009. Food and Agriculture Organization of the United Nations - FAO Fisheries and Aquaculture Department, Roma. pp. 176.
- Farias, I.P., Torrico, J.P., Garcia-Davila, C., Santos, M. C. F., Hrbek T., Renno J.F., 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56, 1129-1135.
- Fu, Y., -X., 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics* 147, 915 – 925.
- Glover, K. A., Dahle, G. and Jørstad, K. E., 2011. Genetic identification of farmed and wild Atlantic cod, *Gadus morhua*, in coastal Norway. *ICES Journal of Marine Science* 68, 901 – 910.
- Gomes F., Schneider H., Barros C., Sampaio D., Hashimoto D., Porto – Foresti F., Sampaio I., 2012. Innovative molecular approach to the identification of the tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its hybrids. *An Acad Bras Cien* 84(2), 5-8.
- Goulding M., Carvalho M.L., 1982. Live history and management of the tambaqui, *Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. *Revista Brasileira de Zoologia* 1, 107-133.
- Hall, T., (1999) BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95 – 98.
- Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA,

2007. Estatística da pesca 2007 Brasil: Grandes Regiões e Unidades da Federação/ Brasília: IBAMA. p.113.
- Isaac, V. J., Ruffino, M. L., 2003. Informe estatístico do desembarque pesqueiro na cidade de Santarém, PA: 1992-1993. In: Fischer, C. F. (Ed.). Recursos Pesqueiros do Médio Amazonas: biologia e estatística pesqueira. IBAMA/GTZ/GOPA, Brasília. p. 225-280.
- Marteinsdottir, G., Cross, T., Juanes, F., McGinnity, P., Moran, P., Primmer, C., Rise, M. L., Skaala, Ø., Triantafyllides, A., (2007) Tools for monitoring fitness of aquaculture individuals in the wild. In: Svasand, T., Crosetti, D., García – Vazquez, E., Verspoor, Eric., Genetic impact of aquaculture activities on native populations. pp. 135 – 140.
- Ministério da Pesca e da Aquicultura - MPA, 2010. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura, Brasil 2008 – 2009. Brasília: MPA. p. 99.
- Nei, M., 1987. Molecular Evolutionary Genetics. New York: Columbia University Press.
- Nei, M., Tajima, F., 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genetics* 97, 145 – 163.
- Newton, A. C. Allnutt, T. R., Gillies, A. C. M., Lowe, A. J. and Ennos R. A., 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Tree* 14, 1 – 6.
- Ostrensky A., Borghetti Jr., Soto D., 2008. Aquicultura no Brasil: O Desafio é Crescer / Editores : Antonio Ostrensky, José Roberto Borghetti e Doris Soto. – Brasília, p. 276.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messenguer, X., and Rozas, R., 2003. DnaSP DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19,

2496 – 2497.

Santa-Brígida, E.L., Cunha, D.B, Rego, O.S., Sampaio, I., Schneider, H., Vallinoto M., 2007. Population analysis of *Scomberomorus cavalla* (Perciformes, Scombridae) from the Northern and Northeastern coast of Brazil. *Journal Brazilian Biology* 67: 919-924.

Santos, M. C. F., Ruffino, M. L., Farias., 2007. High levels of genetic variability and panmixia of tambaqui *Colossomamacropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71, 33 – 44.

Salzburger, W., Ewing, G., Haeseler, A. V., 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology* 20, 1952 – 1963.

Svasand, T., Crosetti, D., García – Vazquez, E., Verspoor, Eric., 2007. Genetic impact of aquaculture activities on native populations. pp. 174.

Utter, F., 2001. Patterns of subspecific anthropogenic introgression in two salmonid genera. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 10, 265 – 279.

Anexo 1:

Tabela complementar1. Relação completa dos haplótipos da Região Controle em tabaquis nativos e de cultivo da região oeste do Pará. HAP – Haplotipo; AMA – Rio Amazonas; CUR – Rio Curuá-Una; PL – Plantel Santa Rosa; PISC – Pisciculturas; COD/SIM – Códigos do Genbank e similaridade pelo BLAST; LOC – Localidade de origem do haplótipo depositado no Genbank; REF – Referência bibliográfica.

HAP	AMA	CUR	PL	PISC	COD/SIM	LOC	REF
H1	2	2		2	GQ375628 - 100%	Tabatinga – Bra	Farias et al, 2010
H2	1	1			GQ375668 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H3	2	2	2	2	GQ375668 - 100%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H4	1	1	1		GQ375659 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H5	1				GQ375732 - 100%	Humaitá – Bra	Farias et al, 2010
H6	1				GQ375658 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H7	1				GQ375660 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H8	1	1			GQ375739 - 100%	Mamoré – Bol	Farias et al, 2010
					GQ375662 - 100%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
					GQ375645 - 100%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
					DQ480027 - 100%	Coari – Bra	Santos et al, 2007
H9	1		1		GQ375708 - 100%	Iquitos – Per	Farias et al, 2010
H10	1				GQ375660 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H11	1				GQ375733 - 99%	Humaitá – Bra	Farias et al, 2010
H12	1				GQ375702 - 99%	Santarém – Bra	Farias et al, 2010
H13	2				GQ375737 - 99%	Guaporé – Bol	Farias et al, 2010
H14	1				GQ375649 - 99%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
H15	1				GQ375635 - 99%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H16	1				GQ375731 - 99%	Humaitá – Bra	Farias et al, 2010
H17	1				GQ375699 - 99%	Santarém – Bra	Farias et al, 2010
H18	1				GQ375681 - 99%	Oriximiná – Bra	Farias et al, 2010
H19	1		7	1	GQ375733 - 100%	Humaitá – Bra	Farias et al, 2010
					GQ375618 - 100%	Tabatinga – Bra	Santos et al, 2007
					DQ480071 - 100%	Tabatinga – Bra	Santos et al, 2007
					DQ480038 - 100%	Parintins – Bra	Santos et al, 2007
H20	1				GQ375660 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H21	1				GQ375741 - 99%	Mamoré – Bol	Farias et al, 2010
H22	1				GQ375659 - 100%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010

				GQ375647 - 100%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
				DQ480033 - 100%	Coari – Bra	Santos et al, 2007
				DQ480029 - 100%	Coari – Bra	Santos et al, 2007
H23	1			GQ375659 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H24	1			GQ375668 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H25		1		GQ375659 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H26		1		GQ375657 - 99%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
H27		1		GQ375621 - 99%	Tabatinga – Bra	Farias et al, 2010
H28		1	1	GQ375660 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H29		1		GQ375708 - 99%	Iquitos – Per	Farias et al, 2010
H30		1		GQ375745 - 99%	Yata – Bol	Farias et al, 2010
H31		1		GQ375737 - 99%	Guaporé – Bol	Farias et al, 2010
H32		1		GQ375745 - 99%	Yata – Bol	Farias et al, 2010
H33		1		GQ375676 - 100%	Parintins – Bra	Farias et al, 2010
				DQ480046 - 100%	Parintins – Bra	Santos et al, 2007
H34		1		GQ375638 - 99%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H35		1		GQ375739 - 99%	Mamoré – Bol	Farias et al, 2010
H36		1		GQ375626 - 99%	Tabatinga – Bra	Farias et al, 2010
H37		1	6	GQ375653 - 99%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
H38		1		GQ375741 - 99%	Mamoré – Bol	Farias et al, 2010
H39		1		GQ375640 - 99%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H40		1		GQ375642 - 100%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
				AF283963 - 100%	Rio Solimões – Bra	Orti et al, 2008
H41		1		GQ375719 - 100%	Pucallpa – Per	Farias et al, 2010
H42			5	GQ375627 - 100%	Tabatinga – Bra	Farias et al, 2010
H43			1	GQ375745 - 100%	Yata – Bol	Farias et al, 2010
H44			3	GQ375745 - 99%	Yata – Bol	Farias et al, 2010
H45			1	GQ375718 - 100%	Pucallpa – Per	Farias et al, 2010
H46			1	GQ375632 - 100%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H47			2	GQ375670 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H48			1	GQ375741 - 99%	Mamoré – Bol	Farias et al, 2010
H49			1	GQ375659 - 99%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H50			1	GQ375704 - 99%	Iquitos – Per	Farias et al, 2010
H51			1	GQ375681 - 99%	Oriximiná – Bra	Farias et al, 2010
H52			1	GQ375704 - 100%	Iquitos – Per	Farias et al, 2010
H53			1	GQ375657 - 99%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
H54			1	GQ375670 - 100%	Manaus – Bra	Farias et al, 2010
H55			1	GQ375722 - 99%	Pucallpa – Per	Farias et al, 2010
H56			15	GQ375737 - 99%	Guaporé – Bol	Farias et al, 2010
H57			1	GQ375671 - 99%	Parintins – Bra	Farias et al, 2010
H58			1	GQ375717 - 99%	Pucallpa – Per	Farias et al, 2010
H59			1	GQ375652 - 99%	Coari – Bra	Farias et al, 2010
H60			3	GQ375620 - 100%	Tabatinga – Bra	Farias et al, 2010
				DQ480073 - 100%	Tabatinga – Bra	Santos et al, 2007
H61			3	GQ375681 - 99%	Oriximiná – Bra	Farias et al, 2010
H62			1	GQ375719 - 99%	Pucallpa – Per	Farias et al, 2010
H63			1	GQ375621 - 99%	Tabatinga – Bra	Farias et al, 2010
H64			1	GQ375638 - 100%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H65			1	GQ375638 - 99%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H66			1	GQ375642 - 99%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010
H67			1	GQ375640 - 99%	Fonte Boa – Bra	Farias et al, 2010

4. CONCLUSÕES INTEGRADORAS

O presente trabalho analisou representantes de duas populações naturais de Tambaqui (Rio Amazonas e Rio Curuá-Una), de um plantel produtor de alevinos (Estação Santa Rosa, SEPAQ) e de 17 pisciculturas de vários municípios da região oeste do Pará. Utilizando sequências de DNA da região controle do DNA mitocondrial e PCR Multiplex de um segmento do genoma nuclear (α - Tropomiosina), o estudo chegou às seguintes conclusões:

As pisciculturas da região oeste do Pará analisadas neste estudo cultivam Tambaquis puros e os híbridos Tambacu e Tambatinga;

O cultivo de indivíduos puros e híbridos de tambaqui na região Oeste do Pará é bastante problemático, devido principalmente aos erros quanto a identificação desses indivíduos, sendo recomendado maiores cuidados quanto ao cultivo dos híbridos de tambaqui;

O sequenciamento de DNA mitocondrial comprovou que 100% das fêmeas produtoras de alevinos do plantel Santa Rosa eram *Colossoma macropomum* e a PCR multiplex comprovou que eram tambaquis puros (homozigotas);

Os níveis de diversidade genética das duas populações nativas são similares aos relatados na literatura;

A diversidade genética do plantel Santa Rosa é bastante similar à das populações nativas analisadas;

A diversidade genética das pisciculturas analisadas é menor do que a das nativas e a do plantel, mas muito superior à de estoques de pisciculturas do leste do Pará e de outros estados;

Os dados genéticos do presente estudo mostram cenários de cultivo de Tambaqui bastante diferentes entre a região leste e o oeste do Pará;

ANEXO



AQUACULTURE

An International Journal

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.1
●	Editorial Board	p.1
●	Guide for Authors	p.3



ISSN: 0044-8486

DESCRIPTION

Aquaculture is an international journal for **freshwater and marine researchers** interested in the exploration, improvement and management of all **aquatic food resources**. It publishes original research on **farming of aquatic animals** and plant organisms including finfish, mollusks, crustaceans and aquatic plants for human consumption.

AUDIENCE

Aquaculturists, Fisheries Scientists, Marine Biologists.

IMPACT FACTOR

2010: 2.044 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2011

ABSTRACTING AND INDEXING

Aquatic Sciences and Fisheries Abstracts
BIOSIS
Current Contents/Agriculture, Biology & Environmental Sciences
EMBiology
Elsevier BIOBASE
Freshwater and Aquaculture Contents Tables
GEOBASE
Marine Science Contents Tables
Scopus

EDITORIAL BOARD

Section Editors:

B. Austin, Inst. of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, FK9 4LA, UK, **Email:** brian.austin@stir.ac.uk
(Diseases)

B.A. Costa-Pierce, Rhode Island Sea Grant College Program, Graduate School of Oceanography, University of Rhode Island, 129 Coastal Institute, Narragansett, RI 02882-1197, USA, **Email:** aquaculture@gso.uri.edu

(Aquaculture Production Science)

E.M. Donaldson, 5492 Greenleaf Road, West Vancouver, BC V7W 1N6, Canada, **Email:** Ed.Donaldson@dfo-mpo.gc.ca

(Physiology and Endocrinology)

D.M. Gatlin, Dept. of Wildlife and Fisheries Sciences, Texas A&M University, 210 Nagle Hall, 2258 TAMUS, College Station, TX 77843-2258, USA, **Email:** dgatlin@nature.tamu.edu

(Nutrition)

G. Hulata, Dept. of Poultry and Aquaculture Sciences, The Volcani Center, Agricultural Research Organization (ARO), P.O. Box 6, 50250 Bet Dagan, Israel, **Email:** vlaqua@volcani.agri.gov.il

(Genetics)

D.C. Little, Inst. of Aquaculture, University of Stirling, Stirling, FK9 4LA, UK, **Email:** dcl1@stir.ac.uk
(Sustainability and Society)

Editorial Advisory Board:

W.K. Hershberger, Snohomish, WA, USA

D. Angel, Haifa, Israel

B. Argue, Al Lith, Saudi Arabia

R. Ballestrazzi, Pagnacco (UD), Italy

T.J. Benfey, Saint John, NB, Canada

J.A.H. Benzie, Edinburgh, UK

M.R. Brown, Hobart, TAS, Australia

D. Bruno, Aberdeen, UK

A. Canario, Faro, Portugal

C. Crawford, Taroona, TAS, Australia

W.S. Davidson, Burnaby, BC, Canada

J. Duston, Truro, NS, Canada

F.J. Gatesoupe, Plouzane, France

B. Gjerde, Ås, Norway

E.P. Glenn, Tucson, AZ, USA

X. Guo, Port Norris, NJ, USA

E.M. Hallerman, Blacksburg, VA, USA

R.W. Hardy, Hagerman, ID, USA

D. Hedgecock, Los Angeles, CA, USA

P.M. Hine, Upper Hutt, New Zealand

S.S.O. Hung, Davis, CA, USA

M. Jobling, Tromsø, Norway

S.J. Kaushik, Saint-Pée-sur-Nivelle, France

S. Kolkovski, Northbeach, WA, Australia

F. Lahnsteiner, Salzburg, Austria

P.S. Leung, Honolulu, HI, USA

P. Li, Hong Kong, Hong Kong

Z. Liu, Auburn, AL, USA

R. Mann, Gloucester Point, VA, USA

S.D. McCormick, Turners Falls, MA, USA

C.C. Mylonas, Iraklion, Crete, Greece

A. Neori, Eilat, Israel

W.A. O'Connor, Taylors Beach, NSW, Australia

N. Okamoto, Minato, Tokyo, Japan

D.J. Penman, Stirling, UK

T.G. Pottinger, Ambleside, UK

J.G. Qin, Adelaide, SA, Australia

C.J. Rodgers, Tarragona, Spain

S.-S. Sheen, Keelung, Taiwan, ROC

B.C. Small, Carbondale, IL, USA

D. Teichert-Coddington, Boligee, AL, USA

D.R. Tocher, Stirling, UK

A.E. Toranzo, Santiago, Spain

A.A. van Dam, Delft, Netherlands

M.C.J. Verdegem, Wageningen, Netherlands

K.T. Wada, Yokohama-Shi, Japan

Z. Yaron, Tel Aviv, Israel

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Original Research Papers should report the results of original research. The material should not have been previously published elsewhere. Articles are expected to contribute new information (e.g. novel methods of analysis with added new insights and impacts) to the knowledge base in the field, not just to confirm previously published work.

Review Articles can cover either narrow disciplinary subjects or broad issues requiring interdisciplinary discussion. They should provide objective critical evaluation of a defined subject. Reviews should not consist solely of a summary of published data. Evaluation of the quality of existing data, the status of knowledge, and the research required to advance knowledge of the subject are essential.

Short Communications are used to communicate results which represent a major breakthrough or startling new discovery and which should therefore be published quickly. They should not be used for preliminary results. Papers must contain sufficient data to establish that the research has achieved reliable and significant results.

Technical Papers should present new methods and procedures for either research methodology or culture-related techniques.

The *Letters to the Editor* section is intended to provide a forum for discussion of aquacultural science emanating from material published in the journal.

Contact details for submission

Papers for consideration should be submitted via the electronic submission system mentioned below to the appropriate Section Editor:

Nutrition:

D.M. Gatlin

The Nutrition Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews on various aspects of aquatic animal nutrition relevant to aquaculture. Manuscripts addressing the following areas of investigation are encouraged:

- 1) determination of dietary and metabolic requirements for various nutrients by representative aquatic species. Studies may include environmental/stress effects on animal's physiological responses and requirements at different developmental stages;
- 2) evaluation of novel or established feedstuffs as well as feed processing and manufacturing procedures with digestibility and growth trials. Such studies should provide comprehensive specifications of the process or evaluated ingredients including nutrients, potential anti-nutrients, and contaminants;
- 3) comparison of nutrient bioavailability from various ingredients or product forms as well as metabolic kinetics of nutrients, food borne anti-nutrients or toxins;
- 4) identification of key components in natural diets that influence attractability, palatability, metabolism, growth reproduction and/or immunity of cultured organisms;
- 5) optimization of diet formulations and feeding practices;
- 6) characterization of the actions of hormones, cytokines and/or components in intracellular signaling pathway(s) that influence nutrient and/or energy utilization.
- 7) evaluation of diet supplementation strategies to influence animal performance, metabolism, health and/or flesh quality.

Manuscripts concerning other areas of nutrition using novel or advanced methods are also welcome. Please note that in regard to various diet additives such as probiotics, prebiotics, herbal extracts, etc., a very large number of papers have already been published. Therefore, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present initial and preliminary investigations of such additives. Manuscripts addressing these and other feed additives will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved in their metabolism. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

Aquaculture Production Science:

B.Costa-Pierce

AQUACULTURE PRODUCTION SCIENCE (PS) is one of 5 sections of the international journal AQUACULTURE dedicated to research on improvements and innovations in aquatic food production.

worldwide dissemination of the results of innovative, globally important, scientific research on production methods for aquatic foods from fish, crustaceans, mollusks, amphibians, and all types of aquatic plants. Improvement of production systems that results in greater efficiencies of resource usage in aquaculture. Effective applications of technologies and methods of aquaculture production for improved stocking regimes, the use of new species and species assemblages, and research on the efficient and sustainable usage of system space with the objective of minimizing resource usage in aquaculture. Investigations to minimize aquaculture wastes and improve water quality, technologies for nutrient recycling in aquaculture ecosystems, and the synergy of aquaculture and other food production systems using methods such as polyculture and integrated aquaculture.

Physiology and Endocrinology:

E.M. Donaldson

The Physiology and Endocrinology Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the physiology and endocrinology of cultured aquatic animals and plants, providing that their content is relevant to solving aquaculture problems.

Manuscripts submitted to the journal must have a valid hypothesis or objective, clearly state the relevance to aquaculture, have proper experimental design with appropriate controls and utilize appropriate statistical analysis. When a study involves the administration of a pharmaceutical or other commercial product, please use generic or scientific names rather than trade names especially in the Title. The trade name can be mentioned in the Materials and Methods together with an exact description of its composition.

Topics covered by this section include, but are not limited to, physiological and endocrine aspects of:

- Reproductive development including both endocrine and environmental control
- Induced ovulation and spermiation
- Gamete quality, storage and cryopreservation
- Control of sex differentiation
- Physiology and endocrinology of gynogenetic and triploid aquatic organisms
- Physiology and endocrinology of transgenic organisms
- Molecular genetic assessment of physiological processes
- Larval physiology and the ontogeny of endocrine systems
- Malpigmentation
- Metamorphosis, smolting (salmonids) and molting (crustacea)
- Nutritional physiology
- Osmoregulation
- Stress
- Anesthesia, transport, handling
- Physiology of harvest techniques, product quality, flesh quality and pigmentation
- Endocrine and environmental regulation of growth
- Rearing density
- Temperature tolerance
- Disease physiology
- Pollutant physiology and water quality (when directly relevant to aquaculture)
- Respiratory, muscle and exercise physiology of cultured organisms
- Immunology (manuscripts on the physiological effects of probiotics must be of high scientific quality with statistically valid conclusions)

Diseases:

B. Austin

The Diseases Section welcomes high quality research papers presenting novel data as well as original reviews, on various aspect of the diseases of aquatic animals and plants, so long as their content is relevant to solving aquaculture problems.

Please note, however, with respect to the probiotic potential of various bacteria and the antibacterial or immunostimulatory effects of herbal extracts a very large number of papers have already been published. As a result, Aquaculture will not continue to accept manuscripts that present further initial and preliminary investigations of these phenomena. Manuscripts addressing these topics will be accepted for review only if they are of the highest scientific quality and they represent a significant advance in our knowledge of the mechanisms involved. Manuscripts may also be considered if they present clinical efficacy data generated in large-scale trials and economic cost-benefit analysis of these applications.

Genetics:

G. Hulata

The Genetics Section welcomes high-quality research papers presenting novel data, as well as critical reviews, on various aspects of selective breeding, genetics and genomics, so long as the content is relevant to solving aquaculture problems. Please note, however, that Aquaculture will not accept manuscripts dealing with the application of well-described techniques to yet another species, unless the application solves a biological problem important to aquaculture production. Aquaculture will not accept manuscripts dealing with gene cloning, characterizing of microsatellites, species identification using molecular markers, EST papers with small collections, or mapping papers with a small number of markers, unless the papers also deal with solving a biological problem that is relevant to aquaculture production. Where appropriate, linkage maps should include co-dominant markers, such as microsatellite DNA and SNP markers, to enable application to other populations and facilitate comparative mapping. Aquaculture will not accept manuscripts focusing mainly on population genetics studies that are based on RAPD and AFLP markers, since the dominance and multilocus nature of the fingerprints are not suitable for making inferences about population genetic diversity and structure. There may be other journals that are more suitable for manuscripts not meeting these requirements.

Sustainability and Society:

D.C. Little

The Sustainability and Society section of the journal Aquaculture invites articles at the interface of natural and social sciences that address the broader roles of aquaculture in global food security and trade.

Aims and scope of the Sustainability and Society section are the: global dissemination of interdisciplinary knowledge regarding the management of aquatic resources and resulting impacts on people. Interconnections with other sectors of food production; resource management and implications for societal impact. Going beyond a narrow techno-centric focus, towards more holistic analyses of aquaculture within well-defined contexts. Enquiry based on understanding trajectories of change amid the global challenges of climate change and food security. Mixed methods and approaches that incorporate and integrate both social and natural sciences. Relevance for the diverse range of policy makers, practitioners and other stakeholders involved. Articles that take a value chain approach, rather than being wholly production orientated, are encouraged.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <http://www.elsevier.com/publishingethics> and <http://www.elsevier.com/ethicalguidelines>.

Policy and ethics

The work described in your article must have been carried out in accordance with *The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans* <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/index.html>; *EU Directive 2010/63/EU for animal experiments* http://ec.europa.eu/environment/chemicals/lab_animals/legislation_en.htm; *Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals* <http://www.icmje.org>. This must be stated at an appropriate point in the article.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <http://www.elsevier.com/conflictsofinterest>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Changes to authorship

This policy concerns the addition, deletion, or rearrangement of author names in the authorship of accepted manuscripts:

Before the accepted manuscript is published in an online issue: Requests to add or remove an author, or to rearrange the author names, must be sent to the Journal Manager from the corresponding author of the accepted manuscript and must include: (a) the reason the name should be added or removed, or the author names rearranged and (b) written confirmation (e-mail, fax, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Requests that are not sent by the corresponding author will be forwarded by the Journal Manager to the corresponding author, who must follow the procedure as described above. Note that: (1) Journal Managers will inform the Journal Editors of any such requests and (2) publication of the accepted manuscript in an online issue is suspended until authorship has been agreed.

After the accepted manuscript is published in an online issue: Any requests to add, delete, or rearrange author names in an article published in an online issue will follow the same policies as noted above and result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors whose articles appear in journals published by Elsevier, to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers you the option of making your article freely available to all via the ScienceDirect platform. To prevent any conflict of interest, you can only make this choice after receiving notification that your article has been accepted for publication. The fee of \$3,000 excludes taxes and other potential author fees such as color charges. In some cases, institutions and funding bodies have entered into agreement with Elsevier to meet these fees on behalf of their authors. Details of these agreements are available at <http://www.elsevier.com/fundingbodies>. Authors of accepted articles, who wish to take advantage of this option, should complete and submit the order form (available at <http://www.elsevier.com/locate/openaccessform.pdf>). Whatever access option you choose, you retain many rights as an author, including the right to post a revised personal version of your article on your own website. More information can be found here: <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

Language and language services

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://webshop.elsevier.com/languageservices> or our customer support site at <http://support.elsevier.com> for more information.

Submission

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

Authors should avoid responding by messages received from the system using the 'Reply' button on their e-mail message; this will send the message to the system support and not to the editorial office, and will create unnecessary load of sorting out and forwarding

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/aqua/>

Referees

Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of three potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of wordprocessing software

It is important that the file be saved in the native format of the wordprocessor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the wordprocessor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <http://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your wordprocessor.

LaTeX

If the LaTeX file is suitable, proofs will be produced without rekeying the text. The article should preferably be written using Elsevier's document class 'elsarticle', or alternatively any of the other recognized classes and formats supported in Elsevier's electronic submissions system, for further information see <http://www.elsevier.com/wps/find/authorsview.authors/latex-ees-supported>.

The Elsevier 'elsarticle' LaTeX style file package (including detailed instructions for LaTeX preparation) can be obtained from the Quickguide: <http://www.elsevier.com/latex>. It consists of the file: elsarticle.cls, complete user documentation for the class file, bibliographic style files in various styles, and template files for a quick start.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

The abstract should be not longer than 400 words.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 4-6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other quantities are mentioned, give their equivalent in SI. You are urged to consult IUPAC: Nomenclature of Organic Chemistry: <http://www.iupac.org/> for further information.

1. Authors and editors are, by general agreement, obliged to accept the rules governing biological nomenclature, as laid down in the International Code of Botanical Nomenclature, the International Code of Nomenclature of Bacteria, and the International Code of Zoological Nomenclature.
2. All biota (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be identified by their scientific names when the English term is first used, with the exception of common domestic animals.
3. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.
4. For chemical nomenclature, the conventions of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the official recommendations of the IUPAC IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature should be followed.

Database linking and Accession numbers

Elsevier aims at connecting online articles with external databases which are useful in their respective research communities. If your article contains relevant unique identifiers or accession numbers (bioinformatics) linking to information on entities (genes, proteins, diseases, etc.) or structures deposited in public databases, then please indicate those entities according to the standard explained below.

Authors should explicitly mention the *database abbreviation (as mentioned below) together with the actual database number*, bearing in mind that an error in a letter or number can result in a dead link in the online version of the article.

Please use the following format: **Database ID: xxxx**

Links can be provided in your online article to the following databases (examples of citations are given in parentheses):

- **GenBank**: Genetic sequence database at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) (GenBank ID: BA123456)
- **PDB**: Worldwide Protein Data Bank (PDB ID: 1TUP)
- **CCDC**: Cambridge Crystallographic Data Centre (CCDC ID: AI631510)
- **TAIR**: The Arabidopsis Information Resource database (TAIR ID: AT1G01020)
- **NCT**: ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT00222573)
- **OMIM**: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM ID: 601240)
- **MINT**: Molecular INTERactions database (MINT ID: 6166710)
- **MI**: EMBL-EBI OLS Molecular Interaction Ontology (MI ID: 0218)
- **UniProt**: Universal Protein Resource Knowledgebase (UniProt ID: Q9H0H5)

DNA sequences and GenBank Accession numbers. Many Elsevier journals cite "gene accession numbers" in their running text and footnotes. Gene accession numbers refer to genes or DNA sequences about which further information can be found in the databases at the National Center for Biotechnical Information (NCBI) at the National Library of Medicine. Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. **An error in a letter or number can result in a dead**

link. Note that in the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article.

Example 1: "GenBank accession nos. **AI631510**, **AI631511**, **AI632198**, and **BF223228**, a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. **AA361117**)".

Authors are encouraged to check accession numbers used very carefully. An error in a letter or number can result in a dead link.

In the final version of the printed article, the accession number text will not appear bold or underlined (see Example 2 below).

Example 2: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

In the final version of the electronic copy, the accession number text will be linked to the appropriate source in the NCBI databases enabling readers to go directly to that source from the article (see Example 3 below).

Example 3: "GenBank accession nos. AI631510, AI631511, AI632198, and BF223228), a B-cell tumor from a chronic lymphatic leukemia (GenBank accession no. BE675048), and a T-cell lymphoma (GenBank accession no. AA361117)".

Math formulae

Present simple formulae in the line of normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. In chemical formulae, valence of ions should be given as, e.g. Ca²⁺ and not Ca⁺⁺. Isotope numbers should precede the symbols, e.g., ¹⁸O. The repeated writing of chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound should be given in full. Exceptions may be made in the case of a very long name occurring very frequently or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g., phosphate as P₂O₅).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article, using superscript Arabic numbers. Many wordprocessors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Save text in illustrations as 'graphics' or enclose the font.
- Only use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times, Symbol.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Produce images near to the desired size of the printed version.
- Submit each figure as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<http://www.elsevier.com/artworkinstructions>

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalised, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS: Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF: Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF: Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF: Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required. If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is'.

Please do not:

- Supply files that are optimised for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF, EPS or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to 'gray scale' (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. Further, high-resolution graphics files must be provided separately whether or not the graphics are embedded. See further under Electronic artwork.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

This journal has standard templates available in key reference management packages EndNote (<http://www.endnote.com/support/enstyles.asp>) and Reference Manager (<http://refman.com/support/rmstyles.asp>). Using plug-ins to wordprocessing packages, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article and the list of references and citations to these will be formatted according to the journal style which is described below.

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.

Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr, W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Journal Abbreviations Source

Define abbreviations that are not standard in this field at their first occurrence in the article: in the abstract but also in the main text after it. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 50 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary data

Elsevier accepts electronic supplementary material to support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Supplementary files supplied will be published online alongside the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. In order to ensure that your submitted material is directly usable, please provide the data in one of our recommended file formats. Authors should

submit the material in electronic format together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Linking to and depositing data at PANGAEA

Electronic archiving of supplementary data enables readers to replicate, verify and build upon the conclusions published in your paper. We recommend that data should be deposited in the data library PANGAEA (<http://www.pangaea.de>). Data are quality controlled and archived by an editor in standard machine-readable formats and are available via Open Access. After processing, the author receives an identifier (DOI) linking to the supplements for checking. As your data sets will be citable you might want to refer to them in your article. In any case, data supplements and the article will be automatically linked as in the following example: [doi:10.1016/0016-7037\(95\)00105-9](https://doi.org/10.1016/0016-7037(95)00105-9). Please use PANGAEA's web interface to submit your data (<http://www.pangaea.de/submit/>).

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- Telephone and fax numbers

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)
- Color figures are clearly marked as being intended for color reproduction on the Web (free of charge) and in print, or to be reproduced in color on the Web (free of charge) and in black-and-white in print
- If only color on the Web is required, black-and-white versions of the figures are also supplied for printing purposes

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. The correct format for citing a DOI is shown as follows (example taken from a document in the journal *Physics Letters B*):

[doi:10.1016/j.physletb.2010.09.059](https://doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059)

When you use the DOI to create URL hyperlinks to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Proofs

One set of page proofs (as PDF files) will be sent by e-mail to the corresponding author (if we do not have an e-mail address then paper proofs will be sent by post) or, a link will be provided in the e-mail so that authors can download the files themselves. Elsevier now provides authors with PDF proofs which can be annotated; for this you will need to download Adobe Reader version 7 (or higher) available free from <http://get.adobe.com/reader>. Instructions on how to annotate PDF files will accompany the proofs (also given online). The exact system requirements are given at the Adobe site: <http://www.adobe.com/products/reader/tech-specs.html>.

If you do not wish to use the PDF annotations function, you may list the corrections (including replies to the Query Form) and return them to Elsevier in an e-mail. Please list your corrections quoting line number. If, for any reason, this is not possible, then mark the corrections and any other comments (including replies to the Query Form) on a printout of your proof and return by fax, or scan

the pages and e-mail, or by post. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. We will do everything possible to get your article published quickly and accurately – please let us have all your corrections within 48 hours. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication: please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility. Note that Elsevier may proceed with the publication of your article if no response is received.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a PDF file of the article via e-mail. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. The PDF file is a watermarked version of the published article and includes a cover sheet with the journal cover image and a disclaimer outlining the terms and conditions of use.

AUTHOR INQUIRIES

For inquiries relating to the submission of articles (including electronic submission) please visit this journal's homepage. Contact details for questions arising after acceptance of an article, especially those relating to proofs, will be provided by the publisher. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle>. You can also check our Author FAQs (<http://www.elsevier.com/authorFAQ>) and/or contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

© Copyright 2012 Elsevier | <http://www.elsevier.com>