

Parentesco genético em reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) baseado em marcadores de DNA: perspectivas de manejo genético na ausência de pedigree



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pesca e Aquicultura
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 8

**Parentesco genético em
reprodutores de tambaqui
(*Colossoma macropomum*)
baseado em marcadores
de DNA: perspectivas
de manejo genético na
ausência de pedigree**

*Eduardo Sousa Varela
Anderson Luis Alves
Aurisan da Silva Barroso
Thiago Fontolan Tardivo*

*Embrapa Pesca e Aquicultura
Palmas, TO
2015*

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pesca e Aquicultura

Quadra 104 Sul, Av. LO 1, N. 34, Conj. 4, 1º e 2º pavimentos
CEP: 77020-020, Palmas, Tocantins, Brasil
Fone: (63) 3229.7800/ 3229.7850
www.embrapa.br/pesca-e-aquicultura

Comitê Local de Publicações

Presidente: *Eric Arthur Bastos Routledge*
Secretário-Executivo: *Renata Melon Barroso*

Membros: *Alisson Moura Santos, Andrea Elena Pizarro Munoz, Milena Santos de Pinho, Giovanni Vitti Moro Hellen Kato, Jefferson Cristiano Christofolletti, Marcelo Könsgen Cunha e Marta Eichemberger Ummus.*

Diagramação: *Juliano Daudt Fontoura*

Foto(s): *Jefferson Christofolletti*

1ª edição

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Embrapa Pesca e Aquicultura

Varela, Eduardo Sousa

Parentesco genético em reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) baseado em marcadores de DNA: perspectivas de manejo genético na ausência de pedigree
/ Eduardo Sousa Varela – Palmas : Embrapa Pesca e Aquicultura, 2014.

28 p. : il. color. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2358-6273; 8).

1. Marcadores moleculares. 2. Microssatélites. 3. Manejo genético. 4. Tambaqui. I. Varela, Eduardo Sousa. II. Alves, Anderson Luis. III. Barroso, Aurisan da Silva. IV. Tardivo, Thiago Fontolan. V.Série.

CDD 664.94

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	8
Material e Métodos	11
Amostragem e histórico do plantel	11
Procedimentos laboratoriais	12
Análises estatísticas	14
Resultados	16
Discussão	20
Agradecimentos	22
Referências bibliográficas	23

Parentesco genético em reprodutores de tambaqui (*Colossoma macropomum*) baseado em marcadores de DNA: perspectivas de manejo genético na ausência de pedigree

*Eduardo Sousa Varela*¹

*Anderson Luis Alves*²

*Aurisan da Silva Barroso*³

*Thiago Fontolan Tardivo*⁴

Resumo

O controle das relações de parentesco de peixes nativos em fase inicial de domesticação é uma atividade fundamental para sustentabilidade dos recursos genéticos e fortalecimento das cadeias produtivas emergentes. O objetivo deste trabalho foi estimar o parentesco genético em reprodutores de tambaqui de uma piscicultura comercial, sem as informações de procedência e pedigree, utilizando marcadores moleculares. Quarenta e oito animais foram avaliados com seis marcadores microssatélites. O polimorfismo encontrado nessa piscicultura foi considerado moderado, com número médio de alelos de 6,5. O parentesco médio estimado foi de -0,015 a -0,02, e a curva dos genótipos reais similar à distribuição simulada de animais não aparentados. A taxa de erro foi de 7,8% a 5,5% para meios-irmãos

¹ Biólogo, doutor em Genética e Biologia Molecular, Pesquisador em Genética de Peixes, Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas/TO. eduardo.varela@embrapa.br

² Biólogo, doutor em Genética, Pesquisador em Genética de Peixes, Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas/TO. anderson.alves@embrapa.br

³ Bolsista PIBIC Faculdade Católica do Tocantins, Palmas/TO. aurisan93@hotmail.com

⁴ Zootecnista, mestre em Produção Animal. Instituto de Desenvolvimento Rural do Estado do Tocantins – Ruraltins, Palmas/TO. thi_tardivo@hotmail.com

e irmãos-completos, respectivamente. De modo geral os animais do plantel de tambaqui investigado não exibiram vínculo genético entre si o que lhes assegura amplas possibilidades de acasalamento de reprodutores. Essa condição melhora as perspectivas de manejo na seleção de reprodutores e o descarte de acasalamento machos e fêmeas altamente consanguíneos.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, microssatélites, manejo genético, tambaqui, consanguinidade, *Colossoma macropomum*.

Relatedness inferred from DNA marker as a tool for broodstock management of tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the absence of pedigree information

Abstract

Relatedness determination of native fish in early stages of domestication is a fundamental activity for sustainability of genetic resources and strengthening of emerging supply chains. Here, we estimate the genetic relatedness in tambaqui broodstock from commercial fish farm, without the pedigree and lineage information, inferred from microsatellite genetic markers. Forty-eight animals were evaluated and the polymorphism found in broodstock was considered moderate, with an average number of 6.5 alleles. The average estimated relatedness was -0.015 to -0.02, and the relatedness coefficient was similar to the simulated distribution of unrelated animals. The error rate was 7.8% to 5.5% for half-sib and full-sibs categories, respectively. In general, this commercial tambaqui broodstock has considered unrelated which increase better opportunities for broodstock management. This improves the prospects for management in sire selection and avoid of mating between males and females highly inbred.

Index terms: Molecular markers, microsatellites, broodstock management, tambaqui, inbreeding, *Colossoma macropomum*.

Introdução

O controle das relações de parentesco de reprodutores na pecuária são elementos fundamentais na predição de ganhos genéticos de animais superiores, adaptados ao setor produtivo, bem como para conservação dos recursos genéticos de alto valor econômico (ROLF et al., 2010). Nas espécies em fase inicial de domesticação, especialmente em peixes nativos tropicais, o controle do vínculo genético no sistema de produção é certamente um passo importante na manutenção dos recursos genéticos e fortalecimento das cadeias produtivas emergentes (LIND et al., 2012).

O tambaqui *Colossoma macropomum* Cuvier, 1818 é uma espécie Neotropical de peixe de água doce pertencente à classe Osteichthyes, subclasse Actinopterygii, ordem Characiformes, família Serrasalminidae. Distribuído nos rios das bacias do Amazonas e Orinoco (GOULDING; CARVALHO, 1982), o tambaqui é considerado rústico, de grande porte e rápido crescimento, representando o segundo maior peixe de escamas da ictiofauna Neotropical (ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998).

O tambaqui compõe o grupo de peixes chamados de redondos, que juntamente com o pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e a caranha (*P. brachyomus*) representam a base da produção de peixes nativos na piscicultura nacional, tanto como animais puros e especialmente na produção de híbridos entre tambaqui e pacu (tambacu) ou tambaqui e caranha (tambatinga) (BALDISSEROTTO; GOMES, 2010; MPA, 2011). De acordo com o último senso aquícola do MPA (2011), a produção de tambaqui foi de 111 mil toneladas frente ao total de 544 mil toneladas da produção aquícola nacional, com destaque para a tilápia com 253 mil toneladas. No entanto, existe uma tendência de que nos próximos anos a produção de redondos seja maior que da tilápia, de acordo com a evolução da produção das estatísticas oficiais. A produção de tambaqui tem grandes possibilidades de expansão com o desenvolvimento de parque aquícolas nacionais, pois atualmente ele é produzido especialmente em barragens viveiros escavados nas

regiões Norte, Centro-Oeste e Nordeste, devido a questões climáticas favoráveis de pluviosidade e de temperatura da água (KUBITZA; ONO, 2007). Dentre as principais razões que justificam o cultivo crescente da espécie, destacam-se a facilidade de obtenção de juvenis, bom potencial de crescimento, alta produtividade, rusticidade e grande aceitação pelo mercado consumidor (SILVA et al., 2007; BALDISSEROTTO; GOMES, 2010). Adicionalmente, a redução nos estoques naturais de tambaqui transforma a aquicultura a principal alternativa sustentável para abastecer as demandas de mercado, que atualmente tem superado em 12 vezes a produção da pesca extrativa (MPA, 2011).

Apesar do crescente avanço produtivo do tambaqui no Brasil, a ausência de programas de registro e avaliação zootécnica em plantéis comerciais dificulta o seu processo de domesticação e melhoramento genético (RESENDE, 2007). Em consequência, não existe uma base de dados que permitam identificar diferenças regionais de desempenho produtivo nos plantéis de tambaqui ou se há diferenças significativas de características zootécnicas relevantes para o setor produtivo. Assim como, não existem programas de manejo genético de plantéis de reprodutores que avaliem a presença de híbridos, bem como a diversidade genética do estoque e o nível de parentesco dos animais.

Em geral, as estações de alevinos de tambaqui formam um plantel negligenciando as informações de procedência e parentesco genético dos indivíduos, ou seja, os animais são utilizados sem a informação da aptidão genética, idade e relação familiar. Ocorre também que os plantéis são formados em número reduzido de reprodutores, com grandes chances de formação de acasalamentos consanguíneos. Os efeitos da consanguinidade (endogamia) em peixes com domesticação recente têm sido mundialmente investigados, demonstrando declínios de desempenho produtivo e que esse efeito negativo se acumula conforme o maior parentesco genético, a cada geração (KINCAID, 1983; TAVE et al., 1995; PANTE et al., 2001; WANG et al., 2002; BENTSEN; OLESEN, 2002; LUO et al., 2014).

Nesse sentido, é fundamental que no processo de formação, manutenção e multiplicação de reprodutores em estações de alevinos, o manejo genético seja planejado e cuidadosamente avaliado para que o acúmulo desses efeitos genéticos não prejudique o potencial produtivo dos estoques de reprodutores (DOYLE, 1983; DOYLE; TALBOT, 1986; EKNATH et al., 1993). Tendo em vista que as pisciculturas de espécies nativas em geral exibem pouca informação de manejo genético, com muitas limitações que possibilitem a construção de genealogias de pedigree, recentes tecnologias de reconstrução do parentesco e paternidade genética estão se desenvolvendo para espécies de peixes comerciais e demonstrando eficiência e acurácia frente aos métodos tradicionais, permitindo assim apresentar uma nova janela tecnológica a cadeia produtiva de espécies nativas (NORRIS et al., 2000; SHIKANO; TANIGUCHI, 2003; SILVERSTEIN et al., 2004; MCDONALD et al., 2004; SEKINO, 2004; SRIPHAIROJ et al., 2007).

Dentre as metodologias, a reconstrução das relações de parentesco genético com base na informação do DNA têm sido amplamente desenvolvidas e avaliadas para muitas espécies aquícolas de importância para aquicultura, com a grande vantagem da independência de qualquer informação tradicional do pedigree (BLOUIN et al., 1996; LYNCH; RITLAND, 1999; NORRIS et al., 2000; WANG, 2002, 2014; WEIR et al., 2006; PINO-QUERIDO et al., 2010; VANDEPUTTE et al., 2011). Os estimadores de parentesco utilizam as frequências alélicas e os genótipos de marcadores de DNA dos reprodutores, especialmente marcadores moleculares microssatélites (SSR) e recentemente marcadores de polimorfismo de base única (SNP). Ambos exibem uma medida precisa e acurada de parentesco, variando entre valores negativos, de importante significado para o manejo reprodutivo, ou seja, animais sem vínculo genético em contraste aos índices positivos que refletem em evidências de estreito relacionamento familiar (MCDONALD et al., 2004; WANG, 2014). Em linhas gerais, as distribuições esperadas de parentesco em diferentes composições familiares (e.g. irmãos-completos, meio-irmãos e não aparentado) são

comparadas com aquelas baseadas nos genótipos parentais conhecidos. Sendo assim, objetivo do presente estudo foi avaliar a utilização de estimadores de parentesco genético com base em marcadores moleculares microssatélites dentro de um plantel de reprodutores de tambaqui, sem informações de procedência e pedigree, tendo em vista futuras ações de manejo genético e redução da produção de animais consanguíneos.

Material e Métodos

Amostragem e histórico do plantel

Para a realização do manejo genético a partir da determinação de parentesco de animais sem pedigree foram utilizados tambaquês (*Colossoma macropomum*) adultos (Figura 01) de uma estação de produção de alevinos, coletados fora do período reprodutivo, entre os meses de Abril a Julho de 2012. Vinte fêmeas e vinte e oito machos foram amostrados do estoque de reprodutores, num total de quarenta e oito animais. Todos os animais foram chipados e o código do PIT-tag foi registrado para futuros direcionamentos de manejo genético. A composição desse plantel comercial foi constituída em pelo menos duas décadas de atividade, a partir de progênies oriundas da própria piscicultura (F1 ou F2), de introduções de animais silvestres e de outras pisciculturas. Por outro lado, não há registro preciso da procedência dos adultos, assim como do registro zootécnico individual, tais como: idade, pedigree e desempenho zootécnico. Com isso, é muito provável que haja sobreposição de gerações conduzindo os acasalamentos, bem como o cruzamento aleatório entre animais geneticamente relacionados. Atualmente, esta piscicultura comercial produz alevinos de tambaqui, em nove meses do ano, em média escala, formando progênies de irmãos-completos e de meio-irmãos, onde se utiliza em geral sêmen de dois machos para ovócitos de uma fêmea na reprodução artificial. Em geral, o elevado número de reprodutores no plantel faz com que a

produção seja regular, entretanto, não há o controle dos cruzamentos bem sucedidos pela falta de medidas das taxas de fertilidade e sobrevivência e o estabelecimento relações destes dados com os reprodutores utilizados.



Foto : Jefferson Christofolletti.

Figura 01. Exemplar adulto de tambaqui (*Colossoma macropomum*).

Procedimentos laboratoriais

Extração de DNA Genômico

O DNA genômico total foi extraído de nadadeira caudal, de acordo com o kit comercial *Purelink DNA extraction*[®] e protocolo descrito pelo fabricante (Invitrogen™ | Life Technologies), com pequenas modificações. A concentração de DNA de cada indivíduo foi estimada por eletroforese em gel de agarose a 1%, comparando-se as intensidades de fluorescência de cada amostra com o corante SYBR[®] Safe, em diferentes padrões de DNA Lambda.

Amplificações dos microssatélites

As amplificações foram realizadas em seis locus de microssatélites do tambaqui denominados de: Cmacr μ 01, Cmacr μ 02, Cmacr μ 03, Cmacr μ 04, Cmacr μ 06 e Cmacr μ 07 (Acesso GeneBank, HM579948-HM579954), conforme descrito por HAMOY e SANTOS (2012).

As reações de PCR foram realizadas com o Kit Platinum[®]PCR SuperMix (Invitrogen[™]), em volumes de 10 μ L, contendo 5,0 μ L de Master Mix (Taq DNA Polimerase, MgCl₂, tampão de PCR e dNTPs), 2 μ L de água destilada ultrapura; 1 μ L de cada primer (a 10 μ M); e 1 μ L de DNA genômico (a 10 ng/ μ L). As amplificações foram realizadas em termocicladores T100[™](BIORAD), nas seguintes condições: um ciclo de 95°C por 5 min; 6 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto; seguido de 25 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 30 min.

Genotipagem

As reações de PCR de cada indivíduo foram diluídas em solução tampão Tris-EDTA nos corantes azul de bromofenol e submetidas a gel de poliacrilamida a 12%, contendo TEMED e APS a 10%, na voltagem de 600 V, em 45 a 90 mA, por 1h e 30 min. O tamanho dos alelos e a presença de genótipos homozigotos e heterozigotos foram comparadas com padrão de tamanho molecular, ladders 10 pb e 25 pb (Invitrogen[™]). Os genótipos foram visualizados após imersão do gel em tampão TE com o corante SYBR[®] Safe, em transiluminador de UV (Figura 02).



Figura 02. Genotipagem do locus $Cmacr\mu 02$ em gel de poliacrilamida a 12% corado com SyberSafe. De 21 a 40 são as canaletas com os genótipos de tambaqui. 10L e 25L são os padrões de tamanho molecular de 10 pb e 25 pb, respectivamente.

Análises estatísticas

Análise do polimorfismo

Inicialmente os alelos amplificados e genotipados foram comparados com aqueles previamente caracterizados por HAMOY e SANTOS (2012). A amplitude alélica, o tamanho e o número de alelos foram obtidos na amostra populacional de 48 tambaquís bem como o número médio de alelos por locus o número de homocigotos e de heterocigotos. A frequência alélica foi obtida em $p = \frac{2N_{pp} + N_{pq}}{2N}$ onde N_{pp} é o número de homocigotos e N_{pq} corresponde ao número de heterocigotos e que pode ser qualquer outro alelo. A heterocigosidade observada foi calculada por $H_o = \frac{N^\circ \text{ Heteroz}}{N}$, onde N é o numero total de amostras.

A heterozigosidade segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foi calculada por $\hat{H} = \frac{n}{n-1} (1 - \sum_{i=1}^k P_i^2)$, onde n é o número de cópias gênicas. Todas as análises de polimorfismo foram executadas pelo programa GENEPOP versão 4.4 (ROUSSET, 2008) e CERVUS versão 3.03 (SLATE et al., 2000). Os desvios do equilíbrio de HW foram obtidos com teste exato de probabilidade pelo método do algoritmo da cadeia de Markov no programa GENEPOP. Por essa abordagem, foram realizados testes globais e por locus sobre o plantel de tambaqui para identificação de deficiências de heterozigotos em relação ao esperado refletidas na estatística F_{IS} . Apenas os loci multialélicos foram utilizados em função das limitações de alguns estimadores de parentesco (QUELLER; GOODNIGHT, 1989), seguindo a equação $\hat{R}_{xy}(L) = \frac{\sum_{m=a,b} (P_{ym} \cdot P_{xm})}{\sum_{m=a,b} (P_{xm} \cdot P_{ym})}$, onde x e y são os indivíduos comparados e m e n são os alelos por locus. p_{ym} representa a frequência alélica a posição m do indivíduo y e p_{xm} a frequência alélica na posição m do indivíduo x . Por último, p_m reflete na frequência alélica da população amostrada.

Análise da distribuição de genótipos simulados

As frequências alélicas observadas na população amostrada foram utilizadas para simular 6000 genótipos multilocus ao acaso e produzir 3000 pares de acasalamento igualmente distribuídos em três classes de parentesco: irmãos completos, meio-irmãos e sem parentesco. Em uma população teórica de acasalamento ao acaso o parentesco médio esperado é de 0, 0,25 e 0,5 para não geneticamente relacionados, meio-irmãos e irmãos completos, respectivamente. Foram utilizados três estimadores de parentesco r_{xy} : QG de Queller e Goodnight (1989), R de Ritland (1996), e LR de Lynch e Ritland (1999). Foi considerado como critério de escolha que esses estimadores podem ser interpretados como coeficiente de correlação e que entre os valores variando de 1,0 a -1,0, os índices negativos indicam acasalamentos sem vínculo genético. Todos os estimadores foram calculados utilizando o programa COANCESTRY versão 1.0.1.2 (WANG, 2011). As distribuições de r simuladas foram utilizadas para calcular a taxa de erro, ou seja, a probabilidade (tipo II) de acusar tambaquis sem vínculo genético quando

na verdade são consanguíneos, assumindo a hipótese nula de que os animais não têm relacionamento genético. Tal procedimento têm sido útil para diminuir as chances de selecionar animais aparentados para o manejo reprodutivo (BLOUIN et al., 1996; MCDONALD et al., 2004).

Análise da distribuição de genótipos parentais conhecidos

Os genótipos de 48 animais foram utilizados para o cálculo dos coeficientes de r_{xy} (QG, R e LR) considerando que as frequências alélicas utilizadas foram as mesmas da abordagem anterior. A distribuição do parentesco dos genótipos reais foi então comparada com as distribuições simuladas. As correlações entre os estimadores foram estabelecidas e a significância das comparações foi obtida pelos intervalos de confiança (IC = 95%) a partir das amostragens de 10 mil réplicas de Bootstrapping.

Resultados

A partir da análise dos dados obtidos o número médio de alelos/locus observados foi de 6,5 variando de 3 a 12 entre os locus Cmacr μ 06 e Cmacr μ 07 (Tabela 01). O índice de conteúdo polimórfico médio foi de 0,631, sendo que os locus mais polimórficos foram os Cmacr μ 02 e Cmacr μ 07, enquanto que o mais homogêneo foi o locus Cmacr μ 06. A heterozigosidade observada variou de 0,11 a 0,56 entre os locus Cmacr μ 04 e Cmacr μ 02, respectivamente. A exceção do locus Cmacr μ 06, os genótipos observados apresentaram desvios da heterozigosidade esperada, especialmente com déficit de heterozigotos, refletido nos valores positivos e significativos do coeficiente de endogamia (Fis) sobre o plantel (Tabela 01).

Tabela 1. Índices de polimorfismo genético em 6 Loci de microsatélites em um plantel comercial de tambaqui.

Locus	k	H _o	H _e	PIC	Fis
Cmacr_01	6	0,38	0,708	0,66	0,3258**
Cmacr_02	9	0,56	0,821	0,79	0,3582**
Cmacr_03	5	0,33	0,588	0,55	0,1962**
Cmacr_04	4	0,11	0,633	0,56	0,5858**
Cmacr_06	3	0,47	0,468	0,37	0,0052
Cmacr_07	12	0,54	0,892	0,87	0,2993**
Total	6,5	0,397**	0,6851	0,63	-

k = número de alelos;

H_o = Heterozigosidade observada;

H_e = Heterozigosidade esperada; PIC = índice de conteúdo polimórfico; Fis = coeficiente de endogamia intrapopulacional; Os números totais são os valores médios. ** Significativo para p < 0,01

Os genótipos simulados apresentaram maior variância na amostragem para estimar o parentesco pelo coeficiente de Ritland. Por outro lado, os outros coeficientes apresentaram maior homogeneidade na estimativa do parentesco médio (Tabela 02).

Tabela 2. Estimativas de parentesco médio em diferentes composições familiares simuladas e sobre os genótipos reais de tambaqui com base nos marcadores moleculares microsatélites. Para cada categoria foi calculado o valor médio do estimador e em parêntese sua variância.

Coeficientes de parentesco r _{xy}			
Tipos de amostras familiares	Lynch e Ritland (1999)	Ritland (1999)	Queller e Goodnight (1989)
Sem parentesco	0,0022	0,00418	0,00763
	(-0,03491)	(0,04503)	(0,06095)
Meio Irmão	0,25578	0,2611	0,2395
	(0,06122)	(0,17424)	(0,05899)
Irmão completo	0,49765	0,50323	0,48927
	(0,0663)	(0,030094)	(0,05478)
Genótipos observados	-0,01988	-0,02823	-0,01531
	(0,05676)	(0,07266)	(0,09611)

Os três tipos de curvas de coeficiente de parentesco simulada em categorias de famílias não aparentadas, meio-irmão e irmãos completos apresentaram padrões de distribuição diferenciados (Figura 03a), sendo que o parentesco médio dos não aparentados exibiu uma tendência de distribuição r_{xy} próximo de zero, enquanto que as distribuições r_{xy} dos meio-irmãos e irmãos completo sem torno de 0,25 e 0,50, respectivamente (Tabela 02). O parentesco médio das três classes exibiram diferenças significativas, conforme os intervalos de confiança, a distribuição do parentesco médio dos genótipos contemporâneos foi negativa, por outro lado o comportamento da curva foi semelhante daquela simulada, para os acasalamentos não aparentados (Figura 03b). A probabilidade de erro tipo II, ou seja, as chances em identificar, erroneamente, acasalamentos sem vínculo genético quando na verdade são consanguíneos foi de 7,8% a 5,5% para meios irmãos e irmãos completos, respectivamente.

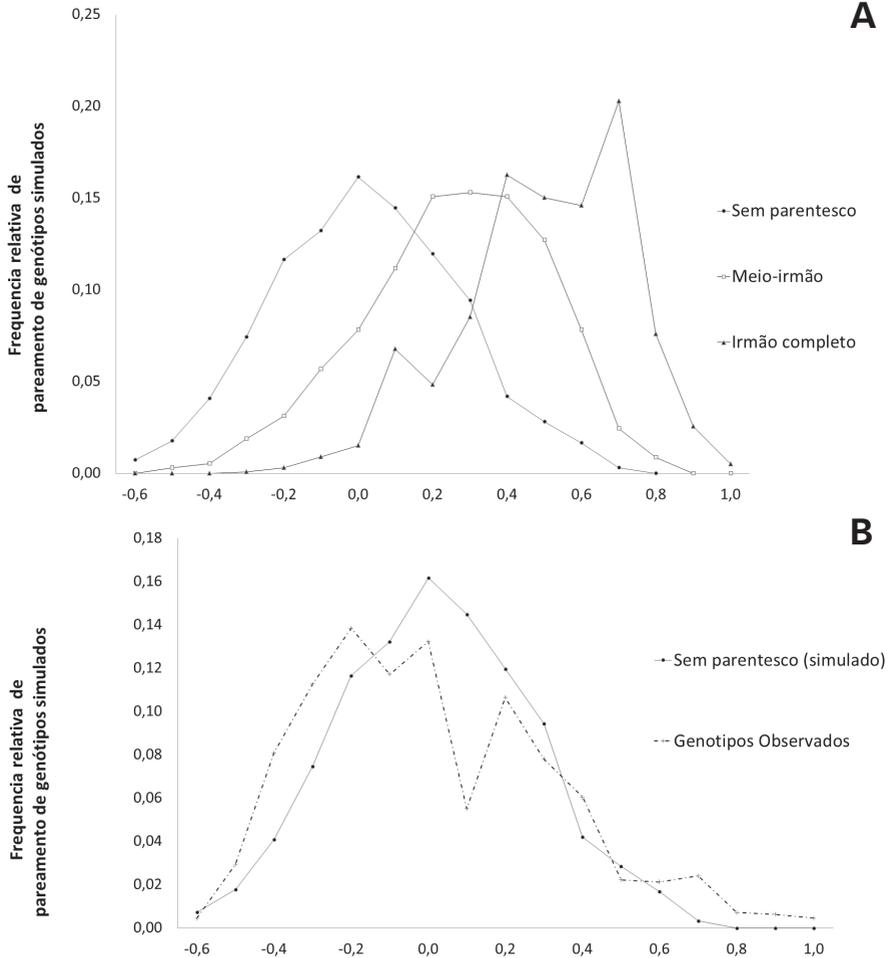


Figura 03 A. Distribuição de parentesco de Queller e Goodnight (1989) simulada em três composições familiares. Bola = sem parentesco; Quadrado = Meio-irmão; Triângulo = Irmão-completo. **Figura 03B.** Distribuição de genótipos reais e simulada sem parentesco genético. Nota-se que o comportamento da curva observada é similar da distribuição sem parentesco.

Discussão

A consanguinidade ou acasalamento de peixes aparentados pode provocar redução da aptidão genética dos animais de cativeiro, resultando em diminuição da capacidade reprodutiva e eficiência fisiológica (FALCONER; MACKAY, 1996). Esse fenômeno, também chamado de depressão por endogamia pode ser evitado pela manutenção do número efetivo moderado de reprodutores por geração e pelo controle do acasalamento de animais com vínculo genético (PANTE et al., 2001). Um dos grandes avanços da aquicultura moderna é a possibilidade de uso de ferramentas genômicas para estimar com grande acurácia e precisão as relações de parentesco de reprodutores de peixes, mesmo na ausência de informação de procedência e pedigree (WEIR et al., 2006; WANG, 2014; SENANAN et al., 2014).

O presente estudo investigou as relações de parentesco sem informação de pedigree de um plantel de reprodutores de tambaqui, baseado em coeficientes de correlação de parentesco, a partir de locus de marcadores microsatélites. Com base nas frequências alélicas observadas, algumas simulações de genótipos em várias composições familiares foram geradas e os valores observados comparados entre si. Em seguida, o parentesco médio dos genótipos reais foi comparado com as distribuições simuladas.

A utilização de marcadores genéticos para obter informações de vínculo genético de populações sem pedigree, frequentemente exibem grande variância de amostragem em função da heterogeneidade no genoma, entre locus com alelos idênticos por descendência e pela variância de alelos idênticos por estado, que na verdade não são idênticos por descendência (LYNCH; RITLAND, 1999; WEIR et al., 2006). Deste modo, a dependência dos estimadores de parentesco pelo número mínimo de marcadores genéticos informativos é um fator importante a ser considerado. O polimorfismo médio de 6,5 alelos por loci nesse plantel de tambaqui revelou desempenho favorável em discriminar o

parentesco entre os genótipos simulados (Figura 3), tendo em vista que os coeficientes de parentesco médio e as variâncias dos três estimadores avaliados não divergiram entre si (Tabela 2). Conforme proposto por CSILLERY et al. (2006), o desempenho dos estimadores de parentesco deve aumentar na medida em que mais marcadores polimórficos são adicionados, caso a variância do parentesco seja relativamente alta. No caso do plantel do tambaqui investigado aqui, as variâncias do parentesco obtidas foram consideradas pequenas entre os três estimadores, comparado com as distribuições esperadas. Nesse sentido, o desempenho dos marcadores microssatélites utilizados só devem ser mais bem avaliados com a inclusão de novas populações de tambaqui, com diferentes histórias de domesticação.

As distribuições de parentesco simulados nas três composições familiares avaliadas de tambaqui foram significativamente distintas e conforme a metodologia de BLOUIN (1996) foi possível obter as taxas de erro nas atribuições de vínculo genético, pelos pontos de interseção entre as curvas. A distribuição do parentesco dos genótipos reais variou conforme a distribuição da composição familiar sem parentesco genético, com parentesco médio de -0,019. Além disso, as chances de erro foram de 7,8% a 5,5% para meios irmãos e irmãos completos, respectivamente. A distribuição de parentesco médio negativa revelou que de modo geral os animais do plantel de tambaqui investigado não tem vínculo genético entre si. Além disso, com base na taxa de erro do parentesco, a capacidade discriminatória dos acasalamentos aparentados daqueles não aparentados foi considerada satisfatória, similarmente obtida em outras espécies (MCDONALD et al., 2004; RUSSELLO; AMATO, 2004; DANANCHER et al., 2008; MIÑO et al., 2009).

O primeiro plantel fundador de tambaqui no Brasil foi concebido no Nordeste do Brasil, em 1972, pelo DNOCS (Instituição pública de pesquisa), a partir de 74 alevinos obtidos do alto do rio Amazonas, em Iquitos, Peru (CALCAGNOTTO; TOLEDO-FILHO, 2000). Desde

então, a maioria das estações de produção de tambaqui mantêm gerações posteriores remanescentes do plantel original. A piscicultura no presente estudo certamente têm remanescentes do plantel original. Por outro lado, houve ao longo de décadas a renovação de tambaquis adultos trazidos de ambiente silvestre e de criação. Além disso, parte do plantel foi resultado da reposição de animais F1 formados na própria piscicultura. Como resultado o polimorfismo encontrado nessa piscicultura pode ser considerada moderada levando-se como referência o número médio de alelos de uma população silvestre de tambaqui (HAMOY et al., 2010) e a diversidade genética de outras pisciculturas da região Norte do Brasil (LOPES et al., 2009; JACOMETO et al., 2010). Em conformidade com a mistura de reprodutores de diferentes procedências nesta piscicultura, a composição familiar média do parentesco obtido pelos marcadores microssatélites do presente estudo assegura amplas possibilidades de acasalamento de reprodutores não aparentados levando-se em consideração a taxa de erro do parentesco. Esta condição melhora as perspectivas de otimização de custos na seleção de reprodutores, novos arranjos de acasalamento e descarte de combinações de machos e fêmeas de tambaqui altamente consanguíneas, utilizando como base a curva de distribuição de parentesco desse plantel. Além disso, são ampliadas as possibilidades de avaliação das taxas de fertilização e sobrevivência dos cruzamentos não aparentados, bem como o desempenho zootécnico dos alevinos e lote de engorda visando definir os acasalamentos de maior potencial produtivo. Por outro lado o desempenho dos marcadores e a escolha dos melhores estimadores de parentesco devem ser investigados em outras pisciculturas com vistas a ampliar a utilização dessa ferramenta no setor produtivo.

Agradecimentos

Os autores agradecem o Ministério da Pesca e Aquicultura pelo apoio financeiro, a Fazenda São Paulo Criação de Peixes LTDA, representada pela Sra. Miyuki Hyashida, pelo apoio na coleta de material biológico de tambaqui. Por último, à Faculdade Católica do Tocantins, pela concessão de infraestrutura e bolsa de iniciação científica ao aluno Aurisan Barroso.

Referências

ARAÚJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **Os frutos do tambaqui: ecologia, conservação e cultivo na Amazônia**. Tefé-AM, Brasil, 1998.

BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. DE C. **Espécies nativas para piscicultura no Brasil**. 2o ed. Santa Maria: Editora UFSM, 2010.

BENTSEN, H.; OLESEN, I. Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates. **Aquaculture**, v. 204, n. 3-4, p. 349–359, 2002.

BLOUIN, M.; PARSONS, M.; LACAILLE, V.; LOTZ, S. Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. **Molecular Ecology**, 1996.

CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S. D. 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.

CSILLÉRY, K.; JOHNSON, T.; BERALDI, D.; et al. Performance of marker-based relatedness estimators in natural populations of outbred vertebrates. **Genetics**, v. 173, n. 4, p. 2091–101, 2006.

DANANCHER, D.; IZQUIERDO, J. I.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Microsatellite analysis of relatedness structure in young of the year of the endangered *Zingel asper* (Percidae) and implications for conservation. **Freshwater Biology**, v. 53, n. 3, p. 546–557, 2008.

DOYLE, R. W. An approach to the quantitative analysis of domestication selection in aquaculture. **Aquaculture**, v. 33, p. 167–185, 1983.

DOYLE, R. W.; TALBOT, A. J. Effective population size and selection in variable aquaculture stocks. **Aquaculture**, v. 57, n. 1-4, p. 27–35, 1986.

EKNATH, A. E.; TAYAMENB, M. M.; VERA, M. S. P.; et al. Genetic improvement of farmed tilapias : the growth performance of eight strains of *Oreochromis niloticus* tested in different farm environments. , v. 111, n. 709, p. 171–188, 1993.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. . **Introduction to quantitative genetics**. Introduction to quantitative genetics. Longman Gr ed. England, 1996.

GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107–133, 1982. Sociedade Brasileira de Zoologia.

HAMOY, I. G.; CIDADE, F. W.; BARBOSA, M. S.; GONÇALVES, E. C.; SANTOS, S. Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 1, p. 33–36, 2010.

HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 11, n. 1, p. 141–6, 2012.

JACOMETO, C. B.; MAURÍCIO, N.; BARRERO, L.; DEL, M.; RODRIGUEZ, P. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei : Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesq. agropec. bras.**, , n. 1, p. 481–487, 2010.

KINCAID, H. L. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. **Aquaculture**, v. 33, n. 1-4, p. 215–227, 1983.

KUBITZA, F.; ONO, E. A. Os caminhos da produção de peixes nativos no Brasil : Uma análise da produção e obstáculos da piscicultura. **Panorama da Aquicultura**, p. 14–23, 2007.

LIND, C. E.; PONZONI, R. W.; NGUYEN, N. H.; KHAW, H. L. Selective breeding in fish and conservation of genetic resources for aquaculture. **Reproduction in domestic animals**, v. 47 Suppl 4, p. 255–63, 2012.

LOPES, T. S.; STREIT JR., D. P.; RIBEIRO, R. P.; et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 728–735, 2009.

LUO, K.; KONG, J.; LUAN, S.; et al. Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. **Aquaculture**, v. 420-421, p. 32–37, 2014. Elsevier B.V.

LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, n. 4, p. 1753–66, 1999.

MCDONALD, G. J.; DANZMANN, R. G.; FERGUSON, M. M. Relatedness determination in the absence of pedigree information in three cultured strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 65–78, 2004.

MÍÑO, C. I.; SAWYER, G. M.; BENJAMIN, R. C.; LAMA, S. N. DEL. Parentage and relatedness in captive and natural populations of the *Roseate spoonbill* (Aves: Ciconiiformes) based on microsatellite data. **Journal of experimental zoology. Part A, Ecological genetics and physiology**, v. 311, n. 6, p. 453–64, 2009.

MPA. **Boletim estatístico da pesca e aquicultura 2011**. DF, 2011.

NORRIS, A. T.; BRADLEY, D. G.; CUNNINGHAM, E. P. Parentage and relatedness determination in farmed Atlantic salmon *Salmo salar*, using microsatellite markers. **Aquaculture**, v. 182, p. 73–83, 2000.

PANTE, M. J. R.; GJERDE, B.; MCMILLAN, I. Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture**, v. 192, n. 2-4, p. 213–224, 2001.

PINO-QUERIDO, A.; HERMIDA, M.; VILARIÑO, M.; BOUZA, C.; MARTÍNEZ, P. Statistical properties and performance of pairwise relatedness estimators using turbot (*Scophthalmus maximus L.*) family data. **Aquaculture Research**, v. 41, n. 4, p. 528–534, 2010.

QUELLER, D.; GOODNIGHT, K. Estimating relatedness using molecular markers. **Evolution**, v. 43, p. 258–274, 1989.

RESENDE, E. K. DE. Melhoria Animal No Brasil: Uma Visão Crítica Espécies Aquáticas. **SBMA**, 2007.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetical Research**, v. 67, n. 02, p. 175–185, 1996. Cambridge University Press.

ROLF, M. M.; TAYLOR, J. F.; SCHNABEL, R. D.; et al. Impact of reduced marker set estimation of genomic relationship matrices on genomic selection for feed efficiency in *Angus cattle*. **BMC genetics**, v. 11, p. 24, 2010.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. **Mol. Ecol. Resources**, v. 8, 2008.

RUSSELLO, M. A.; AMATO, G. Ex situ population management in the absence of pedigree information. **Molecular ecology**, v. 13, n. 9, p. 2829–40, 2004.

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

SENANAN, W.; PECHSIRI, J.; SONKAEW, S.; et al. Genetic relatedness and differentiation of hatchery populations of Asian seabass (*Lates calcarifer*) (Bloch, 1790) broodstock in Thailand inferred from microsatellite genetic markers. **Aquaculture Research**, v. 1, p. 1–16, 2014.

SHIKANO, T.; TANIGUCHI, N. Review DNA markers for estimation of inbreeding depression and heterosis in the guppy *Poecilia reticulata*. **Aquaculture Research**, v. 34, p. 905–911, 2003.

SILVA, C. R.; GOMES, L. C.; BRANDÃO, F. R. Effect of feeding rate and frequency on tambaqui (*Colossoma macropomum*) growth, production and feeding costs during the first growth phase in cages. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 135–139, 2007.

SILVERSTEIN, J. T.; III, C. E. R.; KING, T. L. Genetic variation measured by microsatellites among three strains of domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). **Aquaculture Research**, v. 35, p. 40–48, 2004.

SLATE, J.; MARSHALL, T.; PEMBERTON, J. A retrospective assessment of the accuracy of the paternity inference program CERVUS. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 801–808, 2000.

SRIPHAIROJ, K.; KAMONRAT, W.; NA-NAKORN, U. Genetic aspect in broodstock management of the critically endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* in Thailand. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 36–46, 2007.

TAVE, D.; UNLIMITED, U.; BAY, C. Selective breeding programmes for medium-sized fish farms. **FAO**, 1995.

VANDEPUTTE, M.; ROSSIGNOL, M.; PINCENT, C. From theory to practice : Empirical evaluation of the assignment power of marker sets for pedigree analysis in fish breeding. **Aquaculture**, v. 314, p. 80–86, 2011.

WANG, J. An Estimator for Pairwise Relatedness Using Molecular Markers. **Genetics**, v. 1215, p. 1203–1215, 2002.

WANG, J. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 141–5, 2011.

WANG, J. Marker-based estimates of relatedness and inbreeding coefficients: an assessment of current methods. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 27, p. n/a–n/a, 2014.

WANG, S.; HARD, J. J.; UTTER, F. Salmonid inbreeding : a review. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 11, p. 301–319, 2002.

WEIR, B. S.; ANDERSON, A. D.; HEPLER, A. B. Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 10, p. 771–80, 2006.

Embrapa

Pesca e Aquicultura

Ministério da
**Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA EDUCADORA