

Capítulo 8

Genética aplicada à piscicultura

*Anderson Luis Alves
Eduardo Sousa Varela
Diogo Teruo Hashimoto*

1. Introdução

A genética aplicada à piscicultura não é uma atividade recente. Romanos e chineses, ainda que sem fundamentação científica, iniciaram há mais de 2.000 anos atividades de domesticação de espécies de peixes selvagens, por meio do conhecimento do seu ciclo reprodutivo e da seleção de reprodutores. Com isso, os estudos com a espécie *Cyprinus carpio* (carpa comum) representam os primeiros experimentos de melhoramento genético em peixes, mesmo que de modo empírico. Com o domínio da reprodução da carpa, chineses e europeus passaram a observar variações em características fenotípicas, tanto de coloração quanto da forma do corpo, e iniciaram o processo de seleção para essas características. Mal sabiam eles que seriam os precursores da seleção genética em peixes com base em polimorfismos de DNA. Essa atividade de melhoramento genético sem base científica se difundiu para outras espécies de peixes muito lentamente e apenas foi reconhecida a partir do século 18, quando os japoneses e chineses começaram a produzir outras linhagens por meio de seleção. Vale lembrar que, até essa época, a própria estrutura e função do DNA ainda não eram conhecidas. Após as descobertas de Watson e Crick (1953) sobre a estrutura do DNA, a genética revolucionou a ciência e, recentemente, também refletiu na aquicultura.

Atualmente, as pesquisas em genética são intensas e buscam o avanço do conhecimento nas áreas de seleção reprodutiva, genética molecular e biotecnologia de organismos aquáticos. Em especial para peixes, ostras e camarões, programas de melhoramento genético estão sendo desenvolvidos para várias espécies de interesse comercial, como salmão-do-Pacífico, bacalhau, linguado, tilápia-do-Nilo e camarão. As características zootécnicas que são comumente incorporadas nas seleções tradicionais

compreendem taxa de crescimento, eficiência de conversão alimentar, resistência a doenças, tolerância a temperaturas, forma e coloração corporal, rendimento de filé, fertilidade, dentre outras. Porém, essa é uma realidade que ainda não pertence ao Brasil com relação às suas espécies de peixes nativos. Comparativamente, ainda estamos como os chineses de 2.000 anos atrás, iniciando o processo de domesticação das nossas espécies e, por isso, ainda somos dependentes de pacotes tecnológicos das espécies exóticas melhoradas em outros países.

Diante dessa realidade, a genética surge como uma das principais áreas da aquicultura, capaz de alavancar os programas de melhoramento genético das espécies de peixes do Brasil. Hoje, a biotecnologia oferece diversas possibilidades para a produtividade das pisciculturas, sendo capaz de produzir peixes monosssexos, animais triploides (choque térmico ou de pressão) e híbridos intraespecíficos (linhagens dentro da mesma espécie) e interespecíficos (entre espécies diferentes). O objetivo central dessas técnicas de manipulação cromossômica é de aumentar a produção, mesmo que à custa de riscos ecológicos e comerciais, com a contaminação de estoques naturais de peixes ou de estoques de reprodutores.

2. Melhoramento genético de peixes

2.1. Princípios de genética quantitativa

A maioria das características de importância para a piscicultura é controlada por muitos genes e fortemente influenciada pelo ambiente, como a fecundidade do tambaqui (*Colossoma macropomum*), o peso da cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), a eficiência de conversão alimentar da tilápia (*Oreochromis niloticus*), dentre outras. O estudo dessas características hereditárias e de variação quantitativa, ou seja, que passam de pai para os filhos, é chamado de genética quantitativa. Entendê-la é importante para que o produtor compreenda porque muitos animais de mesma idade no mesmo sistema de produção podem exibir diferentes desempenhos zootécnicos.

O que faz um lote de peixes exibir diferenças fenotípicas (formas alternativas de expressão de uma característica)? Basicamente, esses animais possuem diferentes genes atuando para produzir aquela característica. Os genes são a unidade básica da informação que controla a atividade e o desenvolvimento das células dos peixes. Na reprodução, os pais passarão um dos genes para os filhos (progênie), os quais terão uma combinação de genes atuando na característica quantitativa. O conjunto de genes que influenciam no fenótipo é chamado de genótipo. O segundo fator que influencia no fenótipo é o ambiente. Diferentes ambientes de cultivo influenciam diretamente no

fenótipo. Por exemplo, o fenótipo de uma espécie de peixe em tanque-rede e em viveiro escavado certamente pode variar para a maioria das características de importância zootécnica. Outro fator importante que frequentemente influencia no fenótipo de espécies piscícolas é o efeito materno. Como o nome já diz, este efeito é passado das fêmeas a toda progênie e influencia diretamente na quantidade, tamanho e vigor dos gametas.

Como se pode verificar, os fenótipos são observados, mas não são herdados. Somente os genes são transmitidos dos pais às progênies para formar os genótipos, e a interação deles com o ambiente resulta no conjunto de fenótipos observados na geração seguinte. O produtor de alevinos está, na verdade, interessado nos melhores genótipos porque estes terão mais chances de produzir os melhores fenótipos na geração seguinte. Para facilitar a vida do produtor de peixes, os melhoristas atribuíram um valor para cada genótipo, sendo que aqueles peixes com maiores valores genotípicos possuem mais chances de gerar os melhores fenótipos. É possível prevê-los, por meio da fórmula matemática $P=G+E$, em que P é o fenótipo observado, G é o valor genotípico e E é o efeito do ambiente.

Difícilmente o efeito ambiental pode ser isolado, de modo que a correspondência do valor fenotípico observado com o genotípico nunca é perfeita. Entretanto, o grau de correspondência pode ser medido e é possível prever, por meio da seleção dos indivíduos superiores, a quantidade de variação que será transmitida à progênie. Essa propriedade é chamada de herdabilidade. Em outras palavras, se um casal de reprodutores de um plantel de peixe tem herdabilidade de 90% para desovar quatro vezes ao ano, significa que, de cada 10 alevinos desse casal, em média, nove desovarão quatro vezes por ano quando na idade reprodutiva.

2.2. Seleção genética de reprodutores

Quando uma dada característica possui alta herdabilidade, como, por exemplo, taxa de crescimento por rendimento da carcaça, o melhorista pode utilizar essa propriedade para estimular os ganhos genéticos em produtividade. A seleção dos animais com genótipos superiores para reprodução da próxima geração constitui a base da maioria dos programas de melhoramento de espécies aquícolas. Por outro lado, esse ganho só é mantido se a variabilidade genética for controlada ao longo das gerações. Ou seja, o cruzamento contínuo entre irmãos deve ser evitado.

O princípio básico da seleção genética de caracteres quantitativos é selecionar os indivíduos que possuem alto valor genético para uma dada característica fenotípica, de modo que estes indivíduos sejam capazes de transmitir essa característica à sua progênie por meio dos seus genes superiores. Desse modo, o valor médio do

fenótipo tende a aumentar nos lotes de peixes a cada geração. É importante que as características selecionadas tenham alta herdabilidade para que a resposta do lote à seleção seja positiva e reflita em ganhos econômicos. O primeiro passo que é vital nesse programa é o estabelecimento de uma população fundadora ou base. Esta população fundadora deve ser constituída de animais de diferentes origens geográficas conhecidas, preferencialmente de populações distintas (naturais ou domesticadas). Dessa forma, as chances dos lotes de peixes terem muitos genes de interesse produtivo são maiores, e a diversidade genética poderá ser mantida a longo prazo. Em seguida, o programa de melhoramento genético deve ser planejado. Um desenho experimental do programa deve exibir uma série de compromissos com as características que serão selecionadas. Existem alguns importantes métodos de seleção genética que são utilizados conforme as características a serem melhoradas, sistema de cruzamento dos animais, herdabilidade e manutenção da variabilidade genética (Tabela 1). Na prática, é importante que o *pedigree* das famílias de peixes seja conhecido e que um grande número de animais seja identificado e marcado para que possam ser avaliados. O custo de cada etapa deve ser contabilizado para que o ganho genético do melhoramento compense economicamente os gastos gerados.

Tabela 1. Descrição básica dos métodos de seleção genética em peixes.

Tipo de seleção	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Seleção massal ou individual	O fenótipo de todos os animais é registrado. A seleção é baseada apenas no valor do fenótipo de uma característica específica.	<ul style="list-style-type: none"> - Não há necessidade de identificar as famílias; - Baixo custo; - Produz satisfatórios ganhos genéticos em características de alta herdabilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil controlar endogamia; - É restrito a características de alta herdabilidade; - Apenas os candidatos a reprodutores podem ser utilizados.
Seleção dentro das famílias	Os melhores animais de cada família são mantidos. A seleção dos indivíduos é baseada na média familiar da característica.	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil manejo; - A endogamia pode ser controlada pelo cruzamento rotativo; - É possível aumentar a intensidade de seleção. 	<ul style="list-style-type: none"> - Apenas os candidatos a reprodutores podem ser utilizados; - As famílias devem ser mantidas em viveiros separados; - Não leva em consideração a variação entre as famílias.

Seleção entre famílias	As famílias são divididas em grupos (cortes). As melhores famílias são selecionadas com base na média familiar. São feitos cruzamentos rotativos entre reprodutores das melhores famílias.	- A endogamia pode ser controlada pelos cruzamentos rotativos.	<ul style="list-style-type: none"> - Apresenta melhores resultados apenas em caracteres de alta herdabilidade; - Somente os candidatos a reprodutores podem ser utilizados.
------------------------	--	--	---

Seleção integrada	A seleção é baseada no valor fenotípico individual, na média familiar e na informação de parentesco.	<ul style="list-style-type: none"> - A endogamia é controlada; - Os efeitos do ambiente comum são minimizados; - É útil na seleção de caracteres de baixa herdabilidade e de difícil mensuração, como rendimento do filé, precocidade reprodutiva etc. 	<ul style="list-style-type: none"> - Os animais devem ser fisicamente marcados; - Elevado custo.
-------------------	--	---	--

Seleção assistida por marcador genético	Adiciona mais informação à seleção integrada. Os marcadores genéticos identificam os melhores genótipos nos juvenis.	- É útil na seleção de caracteres de baixa herdabilidade e de aparecimento tardio, como fecundidade, precocidade reprodutiva, fator de condição etc.	<ul style="list-style-type: none"> - Há necessidade de muitos marcadores genéticos ligados a características quantitativas; - Elevado custo.
---	--	--	--

2.3. Produção de animais consanguíneos

A endogamia ou consanguinidade é uma prática muito utilizada nos programas de melhoramento genético. O cruzamento de animais aparentados (endogamia) é utilizado para produzir linhagens geneticamente homogêneas e assim reduzir os efeitos ambientais no valor fenotípico. É possível, também, cruzar duas linhagens consanguíneas diferentes e produzir um lote de peixes com alto desempenho zootécnico, o que é usualmente chamado de vigor do híbrido ou heterose. Por outro lado, a produção de linhagens endogâmicas deve ser criteriosamente planejada e controlada. As progênes geradas por pais de “aparentados” têm mais chances

de herdarem genes deletérios. As chances aumentam quando, ao longo de cada reprodução, os irmãos endogâmicos são utilizados na reprodução, produzindo, em geral, lotes com baixo desempenho, alta taxa de mortalidade, deformidades corporais (Figura 1) e, sobretudo, maior vulnerabilidade a doenças.

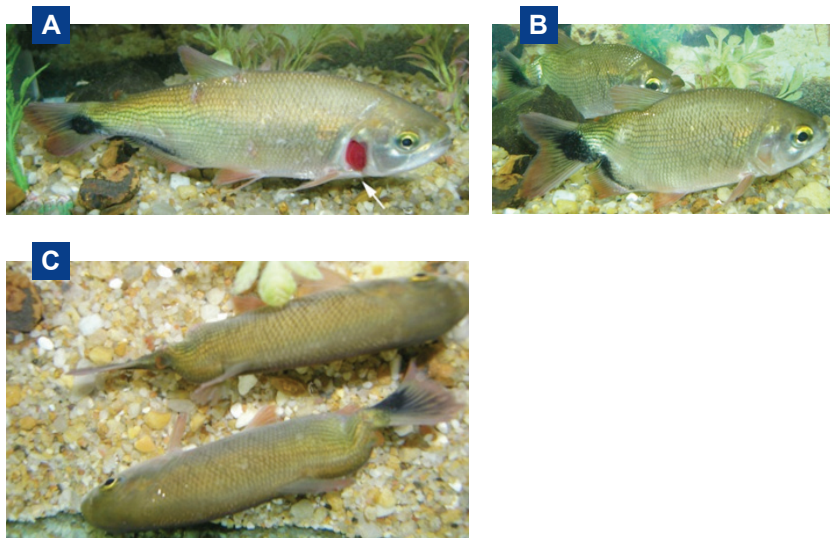


Figura 1. Peixes com deformidades devido aos altos níveis de endogamia. (A) malformação dos opérculos, evidenciada pela seta. (B) e (C) deformidades da coluna vertebral, com vistas lateral e superior, respectivamente. Fonte: Hashimoto et al., 2012.

A utilização de animais consanguíneos é uma prática importante e inevitável. Existem algumas práticas simples de controlar e prevenir os efeitos nocivos que o excesso de endogamia pode causar. A metodologia mais simples é marcar fisicamente os animais com etiquetas únicas. As mais eficientes são cápsulas magnéticas (*chip*, *tag*) que são implantadas no músculo dos peixes (Figura 2). Estas cápsulas possuem um código identificador que pode ser visualizado em um aparelho leitor de códigos. Com os animais marcados, é possível organizar informações de todo o plantel de reprodutores, como grau de parentesco e sexo. Em geral, os cruzamentos mais próximos permitidos são os de casais com parentesco de segundo grau. Desse modo, é possível evitar cruzamentos do tipo pais-progênie e irmão-irmã. Adicionalmente, uma metodologia importante e simples é a do número efetivo de reprodutores do plantel, que se baseia no número de machos e fêmeas do plantel que se reproduzem e deixam uma progênie viável. Existe uma relação muito interessante entre a endogamia nociva

e o número de reprodutores do plantel, conforme pode ser observado na Figura 3. Segundo essa representação gráfica, um tamanho efetivo de reprodutores abaixo de 50 indivíduos já traz altos níveis de endogamia, sendo necessário manter o maior número de reprodutores possível, na mesma proporção de machos e fêmeas.



Figura 2. Processo de implante do *tag* no peixe. (A) material usado para marcação dos peixes com *tags*, e em destaque o *tag*. (B) local aonde deve ser inserido o *tag*. (C) inserção da agulha até o final. (D) leitura pelo equipamento leitor. Fonte: Hashimoto et al., 2012.

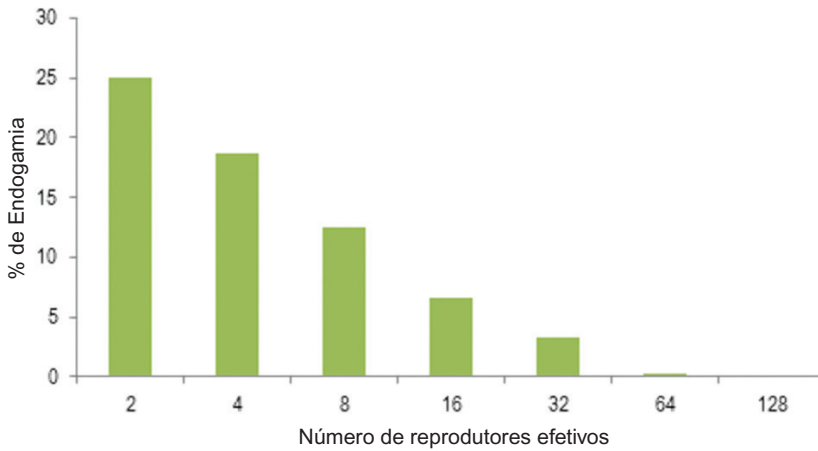


Figura 3. Relação entre a consanguinidade e os reprodutores efetivos utilizados em uma geração de reprodução de peixes. Note que quanto menos reprodutores são utilizados, maiores são as chances de endogamia e, conseqüentemente, dos alevinos nascerem com problemas genéticos.

Entretanto, sabe-se que a maioria das pisciculturas brasileiras produtoras de alevinos não consegue manter essa estrutura de plantel. Nesse caso, é importante programar a reprodução com base nas informações de *pedigree*, em vez de utilizar cruzamentos aleatórios. É relevante considerar que o número de reprodutores que efetivamente se reproduzem depende da relação de machos e fêmeas utilizada. Se a proporção for igual, o número total será equivalente ao número efetivo. Entretanto, se o piscicultor utilizar diferentes proporções de macho e fêmea, por exemplo, uma fêmea para cada três machos, o número efetivo de reprodutores será menor que o total, como se observa na Tabela 2. Caso o piscicultor deseje saber qual é o número de reprodutores efetivos de sua propriedade, é só utilizar a fórmula: $N_E = \frac{4 \times (n^\circ \text{ machos} \times n^\circ \text{ fêmeas})}{n^\circ \text{ machos} + n^\circ \text{ fêmeas}}$, onde N_E é o número de reprodutores efetivos.

As estações de alevinagem também praticam rotineiramente uma mistura de espermatozoides de vários machos com os ovócitos de uma fêmea. Esse procedimento pode resultar em competição entre os espermatozoides e apenas um macho poderá fertilizar a maioria dos ovócitos, o que estimula a endogamia na progênie. Se a mistura de sêmen dos machos for inevitável, é importante que o volume de cada peixe aplicado sobre os ovócitos seja o mesmo.

Observando-se todos os cuidados aqui mencionados, a endogamia dificilmente causará problemas na produção aquícola. É importante considerar que incluir animais silvestres de “sangue novo”, sem um planejamento genético, não é a estratégia mais recomendada! Isso de fato é um grande mito. Animais de pisciculturas já foram

indiretamente domesticados e selecionados para as condições do sistema de cultivo. Incluir animais silvestres é como retornar à estaca zero do duradouro processo de domesticação. Apesar dos animais silvestres possuírem alta diversidade genética e facilmente “quebrar” a endogamia, serão necessários muitos ciclos reprodutivos para selecionar os animais com as aptidões genéticas ao sistema de cultivo.

Tabela 2. Número de reprodutores efetivos (N_E) relacionados com a proporção de machos e fêmeas de peixes utilizados. Observe que o número efetivo só é igual ao total quando o mesmo número de machos e fêmeas é utilizado. Quanto maior a diferença na proporção de machos e fêmeas, menor será o número efetivo.

Número de reprodutores			Número de reprodutores efetivos
Fêmeas	Machos	Total	
5	5	10	10
5	10	15	13,33
5	25	30	16,33
5	50	55	18,18
10	20	30	26,67
10	40	50	32
50	100	150	133,33
67	67	134	134

2.4. Interação genótipo-ambiente

As pesquisas em melhoramento genético têm sido amplamente levantadas como principal solução tecnológica para o desenvolvimento da indústria nacional aquícola. Entretanto, para a disseminação de genótipos superiores, o estudo da interação genótipo-ambiente é crítico, uma vez que um melhor genótipo para um ambiente pode não necessariamente ser o melhor para outro. Por exemplo, tambaquis melhorados para taxa de crescimento em viveiros escavados não necessariamente serão os melhores genótipos para cultivo em ambientes de tanques-rede. É importante que os genótipos de melhor desempenho sejam sempre avaliados em condições aproximadas aos ambientes de cultivo. A interação genótipo-ambiente tem mais chances de ocorrer em ambientes muito distintos ou entre grupos geneticamente distantes. Dois tipos de interação genótipo-ambiente podem acontecer: quando o valor genotípico de dois ou mais genótipos invertem a posição no *rank* quando comparados

em dois ou mais ambientes (Figura 4A) ou quando o valor genotípico não muda o *rank*, mas a magnitude das diferenças entre os dois genótipos são alteradas entre os dois ambientes (Figura 4B). É importante considerar que essas diferenças entre os valores genéticos têm grandes implicações econômicas.

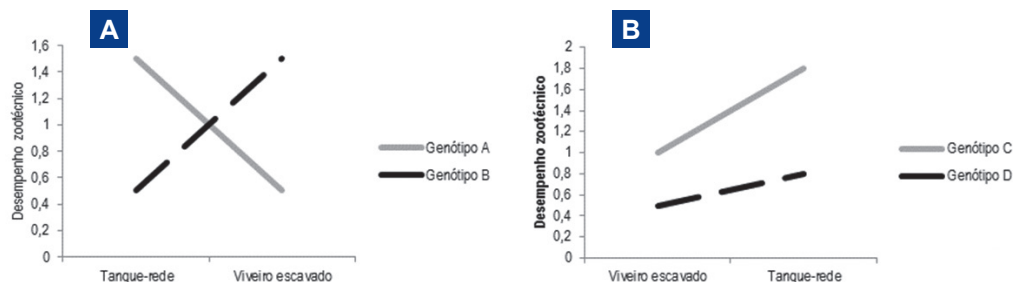


Figura 4. Exemplos de interação genótipo-ambiente em tanque-rede e viveiro escavado: (A) quando os valores genéticos de cada linhagem invertem de posição no desempenho zootécnico; (B) um dos genótipos sempre será superior ao outro, independente da mudança de ambiente.

2.5. Manipulação cromossômica

Sabe-se que o potencial genético dos peixes de piscicultura fica armazenado no conjunto de genes organizado nos cromossomos. Metade deles é de origem materna e a outra, paterna. Todas as células sexuais possuem cromossomos, sendo a manipulação deles na reprodução uma importante ferramenta para o aumento da produtividade aquícola. As principais técnicas de manipulação cromossômica utilizadas na indústria aquícola são a obtenção de linhagens monossexo e a poliploidia. A produção de linhagens monossexo pode ser obtida por meio de ginogênese, quando a prole tem apenas material genético da fêmea, ou androgênese, quando a prole apresenta somente com o material genético do macho. Em relação aos poliploides, há dois tipos de tecnologias de alteração no número de conjuntos de cromossomos: por choques de temperatura (térmicos) ou por choques de pressão (hiperbáricos). Esses choques de temperatura e pressão são aplicados aos ovos durante 5 a 10 minutos (logo após a fertilização), dependendo da espécie. Por meio dessas técnicas, é possível produzir animais com três ou quatro conjuntos cromossômicos, chamados de triploides e tetraploides, respectivamente. A produção de animais tetraploides em escala comercial tem sido tecnicamente difícil, entretanto o cultivo de animais triploides pode ser vantajoso por existir a possibilidade de aumento do crescimento e rendimento de carcaça. Uma vez que animais triploides são estéreis, a energia que normalmente seria gasta para formação de ovócitos e espermatozóides pode ser realocada (utilizada) para crescimento muscular. Adicionalmente, a produção de animais estéreis poderia prevenir o estabelecimento de espécies exóticas e o cruzamento de híbridos com as espécies parentais.

O desempenho de animais triploides, por outro lado, depende da espécie de peixe, da idade dos reprodutores e, sobretudo, das condições ambientais experimentais. Teoricamente, o processo é simples: emprega-se um choque de temperatura ou de pressão logo após a fertilização dos ovos para reter os cromossomos do 2º corpúsculo polar (Figura 5). Desse modo, são produzidos animais estéreis triploides. Tradicionalmente, para confirmar se o peixe é mesmo triploide, é feita uma coleta do seu sangue ou são sacrificados um número estatisticamente significativo de animais do tratamento para verificação do número de cromossomos. A produção de triploides tem grande potencial de aumento da produtividade nas pisciculturas, entretanto podem ocorrer alguns problemas. Dependendo da técnica e da espécie em questão, a eficiência da indução à triploidia pode ser baixa, alguns indivíduos triploides podem ser férteis

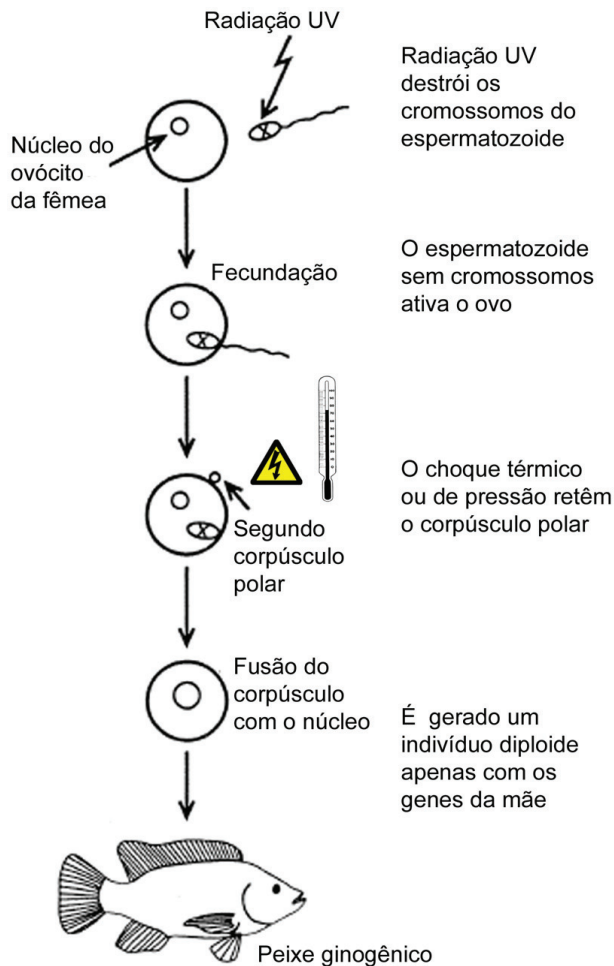


Figura 5. Exemplo geral das etapas de produção de linhagem monossexo por manipulação cromossômica. As etapas indicam a formação de linhagem constituída apenas de cromossomos maternos (Ginogênese). Adaptado de Tave (1999).

e a triploidia pode diminuir o desempenho de certas características zootécnicas; de forma que, para algumas espécies, a triploidia pode não ser economicamente lucrativa. Existem tecnologias para produção de triploides em muitas espécies mundialmente cultivadas, por outro lado, para as espécies nativas brasileiras, as tecnologias de indução à triploidia ainda estão em fase de desenvolvimento.

2.5.1. Controle do sexo dos peixes

A obtenção de linhagens de peixes de apenas um dos sexos, sem a manipulação direta dos cromossomos, também pode ser obtida, sendo economicamente atrativa. Em algumas espécies, como a tilápia e os bagres africanos, a taxa de crescimento dos machos é consideravelmente maior que a das fêmeas, ao passo que, em carpa-capim, truta arco-íris e outros salmonídeos, as fêmeas crescem mais rápido.

Dentre as técnicas de produção de linhagens monossexo, destaca-se a inversão ou reversão sexual. Esta técnica consiste em alterar o sexo fisiológico dos peixes não diferenciados sexualmente, por meio de hormônios esteroides. O sexo dos animais é determinado logo após a fertilização pela formação do genótipo. Entretanto, o sexo fenotípico, ou seja, aquele observado na aparência é determinado durante o desenvolvimento da larva, mesmo que o genótipo seja do sexo oposto. Essa tecnologia consiste em aplicar hormônios sintéticos na ração para produzir animais de um sexo. Aplicam-se hormônios estrógenos para produzir linhagens monossexo de fêmeas e hormônios andrógenos para linhagens de macho. A condição determinante do sucesso da inversão sexual é o tratamento com o hormônio apropriado, administrado em dosagem e duração adequadas durante a fase em que a gônada encontra-se indiferenciada.

Recentemente, vários tipos de hormônios naturais e sintéticos têm sido usados nas pisciculturas. O andrógeno mais utilizado é a 17- α -metil-testosterona e, entre os estrógenos, cita-se o 17-estradiol. A inversão do sexo nem sempre é 100% efetiva, sendo difícil ser conseguida em certas espécies. Maior detalhamento sobre o processo de reversão sexual de tilápia pode ser encontrado no capítulo Reprodução, larvicultura e alevinagem de peixes.

Outra técnica de produção de linhagens monossexo é a produção de linhagens supermacho, reprodução realizada em peixes que apresentam sistema de determinação do sexo tipo XX/XY, como a tilápia nilótica. A obtenção de linhagens monossexo de machos é feita por meio da produção de matrizes de supermachos (machos que são YY em vez de XY). Em espécies com sistema de determinação sexual do tipo ZW/ZZ, tal como o piaçu (*Leporinus macrocephalus*), as matrizes de superfêmeas (WW) dão condições à produção de linhagens monossexo.

2.6. Transgenia

A engenharia genética é uma tecnologia amplamente utilizada na agropecuária há pelo menos 40 anos. A partir dessa técnica, é possível transferir genes de interesse de uma espécie para os cromossomos de outra espécie, no intuito de melhorá-la. Esses genes irão influenciar ou produzir uma nova característica qualitativa ou quantitativa de interesse que não existia na espécie hospedeira. Em geral, as pesquisas com peixes transgênicos têm focado grupos de características associadas à produção, como taxa de crescimento, reprodução, resistência a doenças e tolerância às variações das condições ambientais adversas ao cultivo. Peixes transgênicos que produzem proteínas resistentes ao frio são alvos de pesquisas e atrativos para pisciculturas em regiões frias. Nos EUA, uma empresa vem produzindo salmão-do-Atlântico com taxa de crescimento cinco vezes maior que o salmão de cultivo tradicional. Grande parte dos EUA já comercializa o peixe zebra transgênico com diferentes padrões de coloração e fluorescência provenientes de um gene de água-viva. A produção de peixes transgênicos estéreis é uma opção que pode apresentar valor econômico considerável na indústria aquícola.

A transgenia em peixes envolve primeiramente a caracterização do gene conhecido a ser introduzido na espécie hospedeira. Esse gene normalmente vem acompanhado de um gene promotor que sinaliza o quanto aquele gene deve ser ativado, ou seja, se vai produzir pouca ou muita proteína. Em seguida, essa construção gênica é introduzida dentro do núcleo de ovos de peixes fertilizados. Em geral, os genes são introduzidos por meio de microagulhas ou choque elétrico. Posteriormente, é feito um teste genético de confirmação da transgenia. Por último, são feitos experimentos que determinam o efeito do gene exógeno na característica zootécnica de interesse, comparando-se com peixes não transgênicos. Esta tecnologia fornece grandes possibilidades de aplicação na piscicultura. Entretanto, a discussão a respeito de sua aplicação atravessa as esferas científicas abrangendo questões sobre o seu impacto nos ambientes naturais e na segurança alimentar. Apesar disso, muitas pesquisas com peixes transgênicos têm sido realizadas e aplicadas em pisciculturas de diversos países.

Recomendações técnicas

1. Registrar os animais do plantel da piscicultura através de marcação física do tipo *tags* magnéticos;
2. Organizar o plantel de reprodutores identificando o número de animais, sexo, peso, procedência, etc.;
3. A cada ciclo reprodutivo, registrar o número de reprodutores para o controle da endogamia.

3. Conservação genética em projetos de piscicultura

A conservação genética é um termo que começou a ser utilizado na década de 1980 e corresponde ao uso de ferramentas genéticas na conservação ambiental. De uma forma geral, a conservação genética é aplicada tanto para plantas quanto para animais e apresenta diversas finalidades que variam desde a caracterização genética de espécies ameaçadas de extinção até a identificação molecular de novas espécies. Conservação genética em projetos de pisciculturas pode ser compreendida principalmente por duas práticas: utilizar os sistemas de cultivos e métodos genéticos para repovoar estoques naturais de peixes que sofreram depleção por ações humanas e evitar, por meio de monitoramento genético, a introdução de linhagens geneticamente manipuladas (linhagens melhoradas por seleção ou manipulação cromossômica) no meio ambiente.

3.1. Bancos genéticos para programas de repovoamento

As principais atribuições dos bancos genéticos em pisciculturas são manejo e monitoramento de bancos cultivados (formados *ex situ*, ou seja, fora do ambiente de origem), visando contribuir para a conservação e uso do potencial genético (variabilidade genética) das populações selvagens de espécies nativas. Outra forma de se organizar um banco genético é através da criopreservação de sêmen (formados *in vitro*), em nitrogênio líquido a -196°C , que já é possível de se realizar para algumas espécies nativas. Em geral, a principal aplicação dos bancos cultivados para conservação genética é no uso em programas de repovoamento, que são necessários em rios impactados e prejudicados pela ação antrópica, tais como a construção de usinas hidrelétricas e pesca predatória. Essas ações podem levar à diminuição dos estoques naturais e até mesmo à extinção de algumas populações ou espécies.

Com o objetivo de formar bancos genéticos para programas de repovoamento, devemos levar em consideração alguns aspectos: as espécies e estoques de peixes que serão cultivados na forma de bancos genéticos, a escolha dos tipos de bancos (*ex situ* e/ou *in vitro*), coleta apropriada das matrizes na natureza para evitar a redução do potencial genético, cruzamentos direcionados para gerar uma prole viável para o repovoamento, formas de monitoramento do processo de repovoamento e, principalmente, a variabilidade genética dos peixes utilizados para repovoamento.

A definição de variabilidade genética em peixes é facilmente compreendida quando os comparamos com os seres humanos. Ao observarmos os povos de diferentes continentes (por exemplo, asiáticos em relação aos europeus), percebemos uma nítida diferença de aparências externas, tais como cabelo, altura e cor de olhos.

Todas essas diferenças de características são expressas pelos genes, ou seja, pequenos fragmentos do material genético (DNA) que são transmitidos de pais para filhos. Basicamente, a variação de composição do material genético é a variabilidade genética, o que faz com que sejamos diferentes uns dos outros.

Como ocorre a variação do material genético? O surgimento de novas variações genéticas é um processo aleatório e que ocorre durante a divisão celular meiótica, ou seja, na formação dos gametas (ovócito ou espermatozoide). Basicamente, uma das principais formas de ocorrer a variabilidade genética é através das mutações, que de fato são erros de cópia do DNA ocorridos durante a duplicação do DNA na divisão celular. Outra possibilidade é a recombinação genética, ou seja, um processo de troca de material genético entre cromossomos homólogos que aumentam a variabilidade.

Nesse contexto, é possível entender o porquê de irmãos serem semelhantes. Pessoas aparentadas apresentam características similares devido ao fato de terem as mesmas variações dos genes ou pouca diferença genética, uma vez que herdaram o DNA dos mesmos progenitores. No caso de irmãos, a baixa variabilidade genética é porque a maioria das variações dos genes que foram herdadas dos pais é compartilhada. Por isso, quando há acasalamentos entre irmãos (ou aparentados), os descendentes apresentam pouca variabilidade genética e há um risco maior de nascerem filhos com problemas biológicos, que é um processo denominado de depressão por consanguinidade ou endogamia. Em outros animais, tais como em peixes, a situação é a mesma.

A depressão por consanguinidade resulta do fato de indivíduos biologicamente aparentados terem maior chance de possuírem genes recessivos deletérios. A probabilidade de anomalias biológicas aumenta quando os pais são mais aparentados, ou seja, quanto maior for o nível de consanguinidade dos parentais. Os processos de domesticação e a maioria dos sistemas de cultivo de animais levam à perda natural de variabilidade genética dos estoques. Entretanto, especialmente na piscicultura brasileira, há uma tendência dos plantéis de matrizes serem formados por peixes que possuem alto grau de parentesco.

Vários são os problemas relacionados à endogamia (vide tópico 3.3), que, em geral, resultam em baixa capacidade reprodutiva, que são características indesejáveis para programas de repovoamento.

A alta variabilidade genética é essencial na formação de bancos genéticos utilizados para programas de repovoamento, principalmente porque permite que os indivíduos tenham diferentes capacidades de suportar as variações e pressões impostas pelo ambiente. Com conjuntos de variações gênicas distintas, cada animal pode “responder” às variações ambientais diferentemente, ou seja, enquanto alguns peixes podem ser afetados por alguma doença ou variações de temperatura, outros podem ser mais resistentes.

Por fim, como recomendações práticas, para formar bancos genéticos cultivados com finalidades de repovoamento, devem-se atender algumas práticas e características genéticas:

Recomendações técnicas

- 1.** O estoque do plantel de reprodutores deve ser formado a partir de peixes selvagens, de preferência do mesmo local ou rio onde será realizado o repovoamento;
- 2.** Considerar níveis nulos ou mínimos de consanguinidade, evitando cruzamentos entre indivíduos aparentados (irmãos);
- 3.** Evitar perda do potencial genético, por meio da formação de um número mínimo absoluto de casais de reprodutores selvagens (25 casais, no mínimo);
- 4.** Ausência de seleção artificial para as condições de cultivo, ou seja, o estoque de reprodutores selvagens deve ser constituído por peixes pequenos, médios e grandes, coletados ao acaso na natureza, sem que haja uma preferência por peixes com determinadas características como, por exemplo, os peixes maiores;
- 5.** Realizar a caracterização da variabilidade genética do lote de reprodutores selvagens por meio dos marcadores moleculares, descritos no início deste capítulo;
- 6.** Os peixes reprodutores devem ser marcados com etiquetas magnéticas (*chip* ou *tag*), para que seja possível identificá-los individualmente;
- 7.** É necessário direcionar e organizar os cruzamentos, com base nas informações de caracterização genética;
- 8.** É aconselhável evitar que sejam introduzidos peixes de diferentes bacias ou origens biogeográficas, mesmo que sejam da mesma espécie, pois, caso correspondam a populações diferentes, possivelmente terão características genéticas distintas. Isto implica que novas variações dos genes poderão ser introduzidas no ambiente afetado, o que modificará o perfil genético da população original por meio de contaminação genética.

3.2. Impactos de linhagens geneticamente manipuladas

Devido à falta de monitoramento e boas práticas de manejo, as linhagens de peixes manipuladas geneticamente podem ser introduzidas de forma intencional ou acidental nos rios, o que poderá ocasionar problemas para as populações nativas. Isto porque as linhagens manipuladas podem acabar interagindo negativamente com

as espécies e populações selvagens e, em maior grau, podem se reproduzir e gerar contaminação genética. Nesse caso, ocorrerá uma diluição do *pool* genético original, que poderá ocasionar em maior grau a extinção de populações locais, uma vez que as características genéticas nativas serão perdidas.

Portanto, é importante o conhecimento dos potenciais riscos de animais manipulados geneticamente, o que permitirá uma maior conscientização para o uso sustentável e possibilitará que planos de conservação genética sejam propostos para preservar estoques selvagens e cultivados de peixes.

Dentre as linhagens manipuladas que apresentam riscos às populações nativas e necessitam receber atenção especial para conservação genética, podemos citar:

- a) linhagens melhoradas por seleção, pois as características originais já foram perdidas devido à domesticação, além disso, muitos genes de interesse foram selecionados para uma determinada qualidade. Caso ocorram cruzamentos com estoques naturais, certamente as características genéticas originais das populações selvagens serão modificadas e também ocorrerá uma redução da variabilidade genética, pois correspondem a linhagens altamente consanguíneas;
- b) poliploides, especialmente os tetraploides, pois, como são potencialmente férteis, podem se acasalar com diploides normais, o que resultará na produção desenfreada de indivíduos triploides estéreis e consequente redução dos diploides normais;
- c) gino e androgenéticos, pois são linhagens que resultam em um alto grau de consanguinidade. Assim, a ocorrência de escapes e cruzamentos com populações selvagens acarretará em indivíduos com reduzida variabilidade genética, o que não é desejável para populações naturais;
- d) linhagens monossexo, que podem causar um desequilíbrio populacional dos estoques selvagens, alterando a razão sexual de machos e fêmeas;
- e) híbridos interespecíficos, pois muitos peixes híbridos cultivados no Brasil são férteis. Caso ocorram introduções no meio ambiente, estes animais podem retrocruzar com as espécies nativas puras e contaminar os estoques naturais;
- f) transgênicos, que são amplamente discutidos em todos os grupos de organismos que se utilizam dessa técnica. A transgenia pode causar riscos para a natureza por dois motivos: proliferação descontrolada de organismos transgênicos, cujas consequências são, ainda, imprevisíveis e transferência de transgenes para populações nativas, que modificarão o *pool* genético original e poderão causar a consequente extinção de populações.

Por fim, é necessário colocar em prática projetos consistentes para contenção de escapes e confinamento físico de linhagens manipuladas geneticamente. Além disso, é necessária uma constante forma de monitoramento genético através dos métodos e marcadores moleculares descritos no início do capítulo. Somente com a utilização dessas ferramentas será possível identificar os estoques que são manipulados e fiscalizar o uso correto e sustentável dessas linhagens.

Recomendações técnicas

1. Para formação de bancos genéticos, é necessário realizar a caracterização dos peixes em laboratórios específicos;
2. Evitar cruzamentos entre indivíduos aparentados;
3. Na escolha dos animais para o banco genético, não realizar seleção dos peixes para qualquer característica que seja;
4. Evitar escapes e não realizar solturas (repovoamento) no ambiente natural de peixes geneticamente manipulados.

4. Marcadores genéticos em espécies de peixes

Desde o processo de domesticação de uma espécie nativa a sua incorporação a um programa de melhoramento genético, é fundamental o uso de informações genéticas, seja em nível de indivíduo, de populações ou de espécies. Para o controle das informações, é necessária a utilização de marcadores individuais que também possam fornecer informações de grupos, sendo os principais marcadores empregados os eletrônicos (*tags* magnéticos ou *transponders*), os morfológicos (como anéis, marcações com tinta, presilhas, etiquetas amarradas) e os marcadores genéticos ou de DNA (HASHIMOTO et al., 2012).

Mas o que é um marcador genético? Nada mais é do que uma característica do DNA que seja representativa do indivíduo, com frequência identificável na população ou até mesmo entre espécies. Atualmente, existem diversos marcadores genéticos disponíveis para estudos populacionais aplicados à piscicultura. Estes podem ser cromossômicos, bioquímicos ou moleculares, sendo que cada tipo de marcador possui uma característica peculiar na identificação de variações no DNA. Os diferentes marcadores também têm custos distintos e, muitas vezes, marcadores mais simples e baratos, como os cromossômicos, podem ser mais eficientes do que um marcador

molecular que possui custo mais elevado. Cabe, então, ao pesquisador definir o tipo de marcador mais adequado para o seu problema. Nesse sentido, iremos apresentar os principais marcadores genéticos aplicados à piscicultura.

4.1. Marcadores cromossômicos

A área da genética que estuda os cromossomos é chamada de citogenética e, ao longo dos últimos 30 anos, tem sido uma importante ferramenta de avaliação do potencial genético dos estoques de peixes nas pisciculturas. Os cromossomos são as unidades de armazenamento e transmissão do material genético dos indivíduos, de geração a geração. Com a compactação do DNA na fase de metáfase durante o ciclo celular, torna-se possível visualizar o DNA na forma de cromossomo através de microscopia óptica (Figura 6). As principais aplicações dos marcadores cromossômicos na piscicultura estão ligadas à identificação de características como: número diploide de cromossomos da espécie, ocorrência de triploidia ou tetraploidia, presença de cromossomos supranumerários, cromossomos sexuais, estrutura dos cromossomos localizando as regiões de heterocromatina e os genes responsáveis pela organização do nucléolo. Para isso, são empregadas metodologias de análise e bandamento

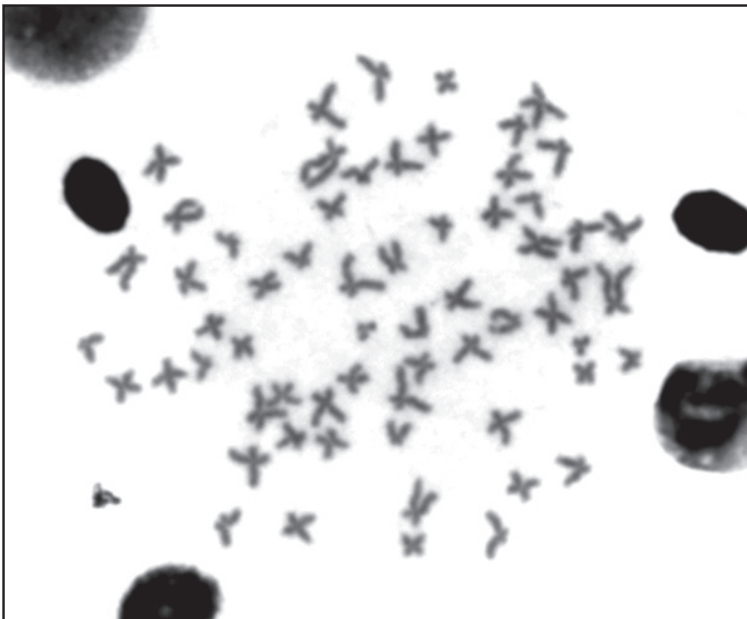


Figura 6. Metáfase somática do peixe ornamental *Corydoras aeneus*.
Imagem: Anderson L. Alves.

cromossômicos que permitem uma aplicação direta na produção. Entre as técnicas mais comumente utilizadas, estão a impregnação por prata ou Ag-NOR (detecção de regiões organizadoras do nucléolo), o bandamento C (detecta heterocromatina constitutiva), os fluorocromos base-específicos, como DAPI e Cromomicina (identifica regiões AT e GC ricas, respectivamente) e a hibridação *in situ* fluorescente ou FISH (identifica e mapeia o gene ou regiões do DNA de interesse). No entanto, a coloração simples com Giemsa é a mais rotineira, simples e barata e, como veremos a seguir, essa metodologia é suficiente para resolver ou auxiliar em problemas de diversas áreas na piscicultura. No entanto, a associação com os demais marcadores listados ocorre quando a coloração convencional não é resolutive.

A coloração convencional Giemsa permite identificar o número diploide e a fórmula cromossômica e, a partir daí, efetuar a montagem do cariótipo (organização dos cromossomos por pares de acordo com tamanho e morfologia) (Figura 7). Essa coloração se caracteriza como uma das mais utilizadas na piscicultura, particularmente para identificar híbridos interespecíficos quando as duas espécies progenitoras possuem números diploides distintos ($2n=50 \times 2n=48$, resultando em indivíduo $2n=49$), ou híbridos de espécies com mesmo número diploide, mas com fórmula cariotípica distinta (ex: Pintado $2n=56: 18m+18sm+10st+10a$ e a Cachara $2n=56: 18m+14sm+10st+14a$).



Figura 7. Cariótipo de acari (*Liposarcus anisitsi*) com destaque o par cromossômico 16 (portador da NOR). Fonte: Alves et al. 2006.

A coloração Giemsa possibilita ainda a identificação de cromossomos supranumerários ou Bs, que são cromossomos adicionais ao complemento padrão e ocorrem em algumas espécies com variação de número e tamanho. No caso do curimatá, os Bs ocorrem com variação de 0-7 e não são observadas alterações na produção tanto de desempenho como más formações morfológicas nos animais. Outra importante aplicação da coloração Giemsa é a identificação de indivíduos triploides, em que é possível confirmar que a manipulação cromossômica induzida por choque térmico ou pressão teve êxito, uma vez que animais normais ou não triploidizados possuem conjunto diploide de cromossomos, ex: $2n=50$, enquanto animais triploides possuem um conjunto adicional de cromossomos haploides, ex: $3n=75$ cromossomos, como em lambaris *Astyanax altiparanae* ou *A. bimaculatus*.

Finalmente, a coloração convencional possibilita a identificação de cromossomos sexuais. Em peixes, apenas cerca de 5% das espécies com cariótipo conhecidos apresentam sistemas de determinação sexual cromossômico. Em geral, se um animal do sexo masculino possui o cromossomo sexual diferenciado, o sistema de determinação de sexo é do tipo XY; já no caso da fêmea ser heterogamética, o sistema sexual é chamado de ZW. Diferente de outros grupos animais que possuem sistema sexual bem definido, como mamíferos e aves, que apresentam XX/XY e ZZ/ZW, respectivamente, os peixes possuem vários tipos de sistemas de determinação do sexo. Em peixes, quanto a detecção de sistemas de determinação de sexo cromossômica, o de maior frequência é o XY, e ainda ocorrem os sistemas múltiplos X1X2Y ou Z1Z2W, variantes dos sistemas normais. Porém, o mais comum é a ausência de cromossomos sexuais, sendo o sexo determinado por fatores multicromossômicos e não apenas por um par de cromossomos sexuais. Nas espécies nativas de interesse econômico descritas no capítulo “Espécies de peixes para a piscicultura”, é rara a presença de cromossomos sexuais, exceto nos peixes do gênero *Leporinus* (piaus, piaparas), que apresentam o sistema ZW.

4.2. Marcadores moleculares

Os marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (isozimas) ou de um segmento específico de DNA, correspondente a regiões expressas ou não do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998). De modo geral, são marcadores genéticos mais resolutivos e informativos do que os marcadores cromossômicos, pois têm acesso direto a mutações, que são a base principal das diferenças genéticas (polimorfismo) encontradas entre indivíduos, populações e espécies.

De maneira prática, as aplicações dos marcadores moleculares em piscicultura são as mais variadas: (a) caracterização genética de populações naturais para formação de estoque de reprodutores; (b) avaliação genética dos estoques de reprodutores já formados para verificar ocorrência de consanguinidade ou endogamia, pureza do estoque (presença de híbridos ou introgressão gênica); (c) análise de estrutura de família com a confirmação de paternidade; (d) confirmação da eficiência de métodos de manipulação cromossômica como triploidia e tetraploidia, sem causar danos ao animal; (e) seleção de reprodutores; (f) acompanhamento do desempenho produtivo e seleção de características desejáveis em programas de melhoramento; (g) identificação sexual precoce; (h) seleção genômica; (i) estudos de associação (polimorfismo de DNA X característica fenotípica).

Para essas aplicações, existem vários marcadores moleculares disponíveis, que incluem desde os mais resolutivos e confiáveis até o que está cada vez mais em desuso devido a pouca reprodutibilidade dos resultados, diminuindo a confiança no marcador. Além disso, os custos são variados entre os diferentes tipos de marcadores. Por isso, é importante levar em consideração as seguintes informações quanto aos marcadores moleculares: (a) nem todas as regiões do genoma são usadas igualmente como marcadores moleculares; (b) algumas regiões podem ser codificantes (genes) ou não; (c) não é necessário conhecer a sequência do alelo para utilizá-lo como marcador molecular; (d) o polimorfismo do marcador molecular deve ser adequado ao estudo. Outras informações relevantes quanto às características dos marcadores moleculares são: (1) eles são geneticamente herdados; (2) estão presentes em todos os indivíduos de todas as espécies; (3) representa ilimitada fonte de variação (mutação); (5) oferecem relativa “*medida comum*” de divergência; (4) mais fácil distinguir “*Homologia*” de “*Convergência*” do que em outras análises.

No entanto, a escolha do marcador molecular mais adequado ao problema ou tipo de análise em aquicultura se torna uma das tarefas mais difíceis. Muitos fatores devem ser levados em consideração para esta escolha, sendo o custo um dos principais, uma vez que, em piscicultura, o número de animais analisados, de modo geral, é alto tanto para reprodutores como em experimentos de acompanhamento de engorda. Entre os principais marcadores moleculares estão as alozimas, o RAPD (amplificação ao acaso de fragmentos de DNA), o PCR-RFLP (PCR de polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição), os microssatélites e as sequências de genes do DNA mitocondrial. Detalhes dos métodos serão vistos a seguir:

4.2.1. Alozimas

Definição: Proteínas variantes codominantes que podem ser visualizadas por coloração específica em gel de eletroforese.

- Prós: Custo baixo; Relativamente fácil; Útil na separação de espécie, como no exemplo a seguir, em que foi possível identificar uma nova espécie do gênero *Neoplecostomus* (Figura 8).

- Contras: Baixa variabilidade em populações; Baixa qualidade dos dados.

- Uso de rotina: atualmente, é pouco utilizado devido à baixa resolução.

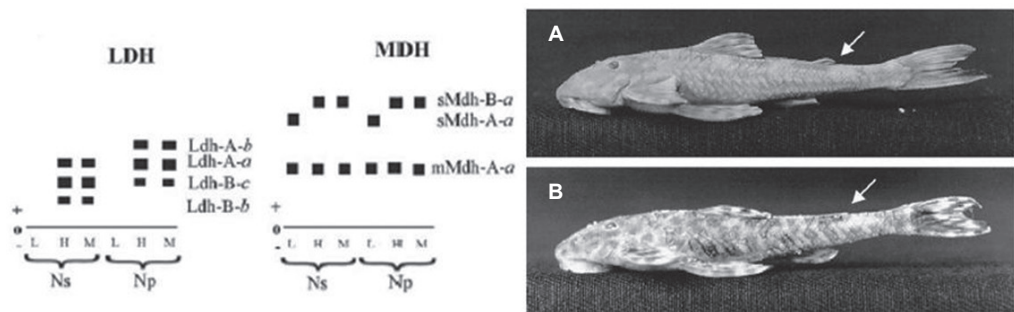


Figura 8. Identificação enzimática de *Neoplecostomus* sp. (A) e *N. paranensis* (B), em destaque exemplo dos resultados obtidos para duas alozimas, LDH (distingue as duas espécies) e MDH (não distingue as espécies). Fonte: Zawadzki et al., 2004.

4.2.2. RAPD (Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso)

Definição: Os princípios metodológicos do RAPD são os seguintes: (a) usa *primers* arbitrários com condições de PCR diferenciais (temperatura baixa, cerca de 40°C); (b) gera vários fragmentos de tamanhos diferentes (base do polimorfismo); (c) a análise é comparativa entre a presença e ausência de sítio (bandas) do *primer*; (d) usa eletroforese para gerar DNA *fingerprinting* (Figura 9).

- Prós: boa discriminação entre os indivíduos da mesma espécie; útil para identificar grupos clonais; muitos indivíduos podem ser analisados em pouco tempo; utilizado para seleção de indivíduos dentro de uma população.

- Contras: marcador dominante (alelos heterozigotos não aparecem); frequência alélica é raramente avaliada; comigração de bandas (quando de tamanho similares migram juntas, mas não garantem que sejam homólogas); dificuldade de reprodução do padrão de bandas.

- Uso de rotina: atualmente, não é utilizada e, de modo geral, é recomendada por diversas revistas científicas a não publicação de dados gerados por essa metodologia, devido à baixa resolução e confiança nos dados.

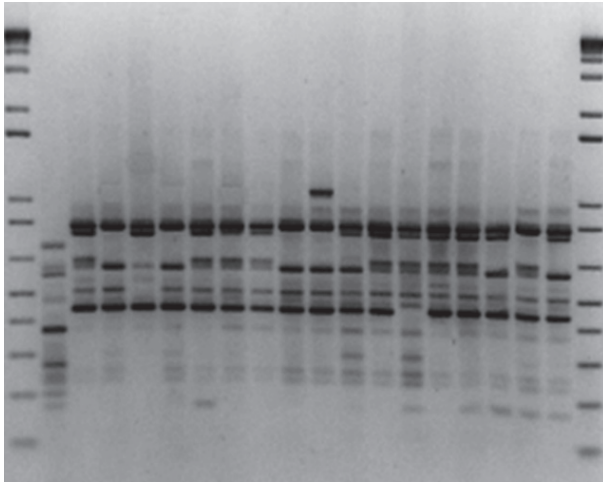


Figura 9. Gel de RAPD em estoque de reprodutor de curimatá (*Prochilodus lineatus*). Imagem: Anderson L. Alves e Claudio Oliveira.

4.2.3. PCR-RFLP (PCR de Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição)

Definição: A análise é baseada em cortar o DNA em fragmentos com enzimas de restrição e separar os fragmentos resultantes por peso molecular em eletroforese. Variação genética é detectada se uma enzima cortar em uma localização específica do DNA de um indivíduo e não cortar em outro indivíduo na mesma localização, nesse caso, a sequência de DNA entre eles deve ser diferente (Figura 10).

- Prós: obtidos em grande número; estão distribuídos aleatoriamente no genoma; técnica simples e de fácil utilização; identificação de espécies;

- Contras: baixo polimorfismo; custo moderado; regiões hipervariáveis é difícil de identificar; perda de muita informação genética.

- Uso de rotina: ainda é uma técnica utilizada, no entanto, sua robustez não se equipara a técnicas como microsatélite e sequências de DNA.

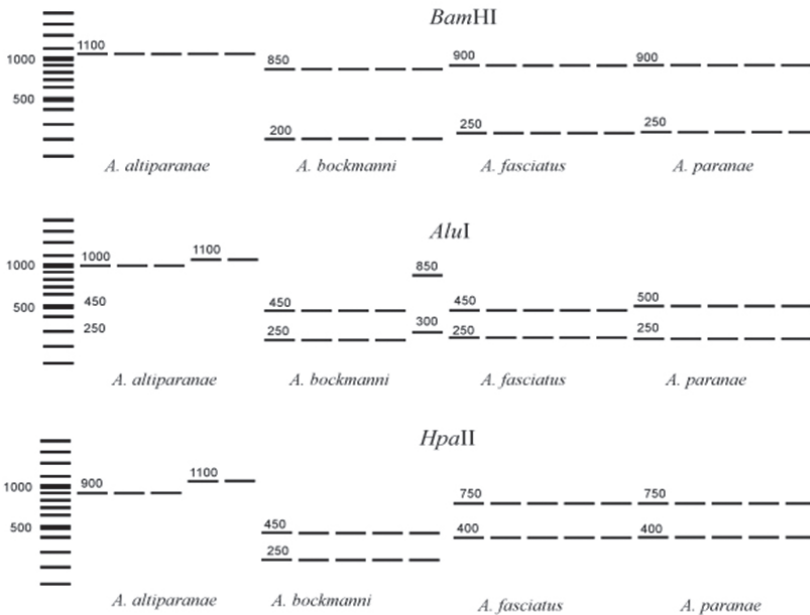


Figura 10. Esquema de PCR-RFLP para identificação de diferentes espécies de lambari *Astyanax* spp. Imagem: Anderson L. Alves.

4.2.4. Microssatélites

Definições: motivos curtos de DNA repetitivo (2 a 6 pb) em tandem, tipicamente dinucleotídeos (CA)_n, trinucleotídeos (ATC)_n ou tetranucleotídeos (GATA)_n (Figura 11). A base molecular do polimorfismo do marcador leva em consideração duas características: (a) as mutações ocorrem devido a erros no processo de replicação (adicionar ou remover pb); (b) o processo de replicação encontra dificuldades para copiar fielmente longos trechos de sequências repetidas. Além disso, é estimado que os microssatélites sofressem mutações entre 100 a 10.000 vezes mais rápido do que as substituições nucleotídicas.

- Prós: altamente informativo; fácil aplicação e reprodutibilidade; identificação de indivíduos; permite: estudos de paternidade, dispersão individual, fluxo gênico recente, estimar mudanças na estrutura demográfica e identificação de endogamia.

- Contras: Custo moderado se o marcador estiver disponível, porém, se necessitar desenvolver o marcador, o custo tornase elevado; a base evolutiva das mutações ainda não está estabelecida.

- Uso de rotina: é o marcador molecular mais utilizado em aquicultura atualmente.

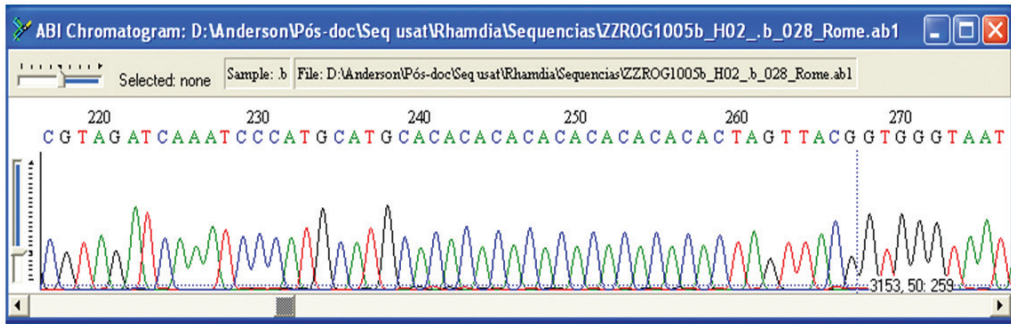


Figura 11. Sequência de DNA evidenciando 10 repetições de microssatélite do tipo CA (dinucleotídico) para um exemplar de jundiá *Rhamdia quelen*. Imagem: Anderson L. Alves.

4.2.5. Sequências de DNA mitocondrial (mtDNA)

Definição: O interesse no estudo do mtDNA está baseado no fato de que esse genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança exclusivamente materna (marcador matrilinear) e sua presença nos organismos em número haploide, o que impede (ou torna muito raros) os eventos de recombinação. Além disso, possui um genoma compacto com estrutura e organização simples, ausência de introns, pseudogenes e elementos transponíveis e alta taxa de evolução. Em razão disto, o mtDNA fornece informações relacionadas à estrutura populacional, sendo capaz de distinguir populações geográficas dentro da espécie com eficiência por meio da identificação dos haplótipos ou clones de mtDNA.

- Prós: alta taxa de evolução; baixa eficiência do sistema de reparo.

- Contras: obter frequência de dados de sequência para estudos populacionais, de estoques de reprodutores ou de plantel em fase de engorda pode ser muito caro e demorado.

- Uso de rotina: com as tecnologias de sequenciamento de nova geração, a tendência é reduzir cada vez mais o custo e, com isso, aumentar a utilização.

Recomendações técnicas

1. Identificar a sensibilidade do marcador molecular (MM) para estudos com estrutura de gene, identificação de genótipos, definição de genealogia, estudos filogenéticos, ou seja, definir o marcador molecular ideal para estudos no nível de espécies, populações ou gênero acima;
2. Definir se o marcador a ser utilizado corresponde a uma região codificante (gene) ou não codificante (DNA repetitivo, ex.) do genoma, uma vez que a taxa de evolução das duas regiões são diferentes;
3. Usar marcadores moleculares que apresentem conectividade com outros dados disponíveis na literatura;
4. Conhecer o tipo de polimorfismo do marcador (locus simples ou locus múltiplo);
5. Estabelecer o uso do marcador molecular com base na sua origem e taxa de mutação: organela (DNA mitocondrial) ou nuclear (DNA núcleo);
6. Identificar se há marcadores moleculares disponíveis para a sua espécie em questão ou se é possível a utilização de marcadores desenvolvidos para espécies próximas sem o comprometimento da qualidade dos dados gerados;
7. Definir previamente no projeto o custo das análises por indivíduo para o marcador molecular escolhido em comparação com os demais marcadores.

5. Bibliografia consultada

- ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; GRANADO, A.; NIRCHIO, M. Karyotypic relationships among tribes of Hypostominae (Siluriformes: Loricariidae) with description of XO sex chromosome system in a Neotropical fish species. **Genetica** (The Hague), v. 128, p. 1-9, 2006.
- BORBA, R.S.; ZAWAKSKI, C.H.; PARISE-MALTEMPI, P.P.; PERDICES, A.; ALVES, A.L. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Osteichthyes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the Upper Paraná River basin. **Neotropical Ichthyology**, In press.
- FAO. **Aquaculture Development: genetic resource management**. Roma, 2008. Suppl 3, 125p.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1998.
- GJEDREM, T. **Selection and breeding programs in aquaculture**. Noruega, AKVAFORSK: Institute of Aquaculture Research AS, 2005. 364p.

- HASHIMOTO, D.T.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Interspecific fish hybrids in Brazil: management of genetic resources for sustainable use. **Reviews in Aquaculture**, v. 4, p. 108-118, 2012.
- TAVE, D. Inbreeding and broodstock management. Rome: FAO, 1999. 122p. (FAO - Fisheries Technical Paper, n. 392).
- TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. **Cadernos de ictiogenética 1**: Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. São Paulo: CCS/USP, 1992.
- TOLEDO-FILHO, S.A.; CALCAGNOTTO, D.; BERNARDINO, G.; FERNANDES-MATIOLI, F.M.C.; MOYSÉS, C.B.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. **Cadernos de ictiogenética 5**: Projeto de bancos genéticos na piscicultura brasileira. São Paulo: CCS/USP, 1999.

6. Bibliografia recomendada

- HASHIMOTO, D.T.; ALVES, A.L.; VARELA, E.S.; MORO, G.V.; IWASHITA, M.K.P. **Genética na piscicultura**: importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 29p.
- ZAWADZKI, C.H.; ALVES, A.L.; RENESTO, E.; OLIVEIRA, C. Biochemical evidence of a possible new specie of the genus *Neoplecostomus* (Teleostei: Loricariidae) from the upper Rio Paraná basin, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, p. 573-582, 2004.