

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



Tese

Análise do crescimento e identificação de *loci* potencialmente amplificáveis em peixe-rei

Rafael Aldrighi Tavares

Pelotas, 2014

RAFAEL ALDRIGHI TAVARES

Análise do crescimento e identificação de *loci* potencialmente amplificáveis em peixe-rei

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (Área de conhecimento: Melhoramento Genético Animal).

Orientador: Prof. Dr. Nelson José Laurino Dionello

Co-Orientador: Prof. Dr. Heden Luiz Marques Moreira

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

T231a Tavares, Rafael Aldrighi

Análise do crescimento e identificação de loci potencialmente amplificáveis em peixe-rei / Rafael Aldrighi Tavares ; Nelson José Laurino Dionello, orientador ; Heden Luiz Marques Moreira, coorientador. — Pelotas, 2014.

55 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Melhoramento genético. 2. Marcadores moleculares. 3. Peixes nativos. 4. Híbrido. I. Dionello, Nelson José Laurino, orient. II. Moreira, Heden Luiz Marques, coorient. III. Título.

CDD : 639.3

Banca Examinadora

- Dr. Nelson José Laurino Dionello
- Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras
- Dr. Cleber Bastos Rocha
- Dr. Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey
- Dr. Diones Bender Almeida

“A cada dia a natureza produz o suficiente para nossa carência. Se cada um tomasse o que lhe fosse necessário, não havia pobreza no mundo e ninguém morreria de fome”.

(Ghandi)

Dedico esse trabalho a minha esposa, minha filha, meus familiares, amigos e professores, que juntos proporcionaram esse momento de realização.

Agradecimentos

Ao meu orientador acadêmico e grande amigo, Dionello, onde aprendi com seus ensinamentos, sendo um grande exemplo profissional.

Aos amigos Sérgio e João Morato, que com humildade e amizade, reservaram seus preciosos tempos para me ajudar e ensinar durante todos esses anos de doutorado.

A equipe do LEGA e do Laboratório de Ictiologia, pelo carinho que me acolheram e disposição para me ajudar no que fosse preciso.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação pelo ensinamento, aprendizagem e amizade.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro, proporcionando a realização desta pesquisa.

Ao meu pai, Zezé, e minha mãe Marli, meus queridos e amados pais, pelo dom da vida, amor, carinho e apoio em todos os momentos. E ao meu irmão Zinho, com carinho compartilhou minhas angustias e alegrias.

Aos meus sogros, Domingos e Maria Helena, por todo carinho que fui recebido por esta família, servindo como fonte de inspiração para alcançar os meus objetivos.

E a minha amada família: esposa Lilian e filha Duda, que sempre ao meu lado e com muito amor me motivaram a ir frente e souberam compreender os momentos que estive ocupado em prol da pesquisa e ensinamento.

Sem nunca esquecer, agradeço a Deus por ter me concedido a vida proporcionando o dom pelo trabalho em pesquisa e desenvolvimento.

Resumo

TAVARES, Rafael Aldrighi. **Análise do crescimento e identificação de *loci* potencialmente amplificáveis em peixe-rei**. 2014. 55f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia - FAEM. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Com o objetivo de dar subsídio técnico e científico para a definição do melhor modelo animal de peixe-rei, a ser utilizada em um programa de melhoramento genético, foram realizados dois experimentos distintos em um único projeto. No primeiro experimento foi analisado o desempenho em crescimento de *Odontesthes bonariensis*, *Odontesthes humensis* e do híbrido (*O. bonariensis* e *O. humensis*) em sistema de criação intensivo, por um período de 180 dias, utilizando como indicadores o peso corporal (Pc), comprimento total (Ct), fator de condição (FC), coeficiente alométrico (b), taxa de crescimento específico (TCE) e estimativa de peso corporal e comprimento total máximo (Pc_{max}, Ct_{max}). Todos os grupos genéticos cresceram em peso corporal e comprimento total ao longo do período analisado, sendo influenciados pela genética de cada espécie. *O. bonariensis* apresentou o melhor desempenho em crescimento e os peixes híbridos apresentaram um crescimento intermediário e uma estimativa de peso corporal máximo que superou as espécies puras. No segundo experimento foram identificados 25.806 *loci* potencialmente amplificáveis de microssatélites, na espécie de peixe-rei *O. humensis*. Desse total de *loci*, 167 foram classificados de melhor qualidade, com capacidade de ser altamente variável na população e com grande potencial para análise de variabilidade genética desta espécie. De forma geral, seria útil a seleção de reprodutores, com o auxílio de marcadores microssatélites e formação de linhagens domesticadas.

Palavras-chaves: Melhoramento Genético, Marcadores Moleculares, Peixes Nativos, Híbrido.

Abstract

TAVARES, Rafael Aldrighi. **Analysis of growth and identification of *loci* potentially amplifiable in pejerrey**. 2014. 55f. PhD (Thesis) – Department of Animal Science – FAEM. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brazil.

Aiming to provide technical and scientific allowance for defining the best animal model for pejerrey, to be used in a breeding program, two separate in a single project experiments were performed. In first experiment were examined the growth performance of *Odontesthes bonariensis*, *Odontesthes humensis* and hybrid (*O. bonariensis* X *O. humensis*) in intensive culture system for a period of 180 days, using the body weight (*W*), total length (*Lt*), condition factor (*CF*), allometric coefficient (*b*), specific growth rate (*SGR*) and estimates of body weight and maximum total length (W_{max} , Lt_{max}) as indicators. All genetic groups grew in weight and length over the period analyzed, being influenced by the genetics of each species. *O. bonariensis* showed the best performance in growth and hybrid fish showed intermediate growth and estimated maximum body weight exceeding the pure species. In second experiment 25,806 potentially amplifiable microsatellite *loci* were identified in the species of pejerrey *O. humensis*. Of total *loci*, 167 were classified as high quality, with the ability to be highly variable in the population and with great potential for the analysis of genetic variability of this species. In general, it would be useful selective breeding, the aid of microsatellite markers, and formation of domesticated strains.

Key words: Genetic Improvement, Molecular Markers, Native Fish, Hybrid.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
2	Projeto de pesquisa	12
2.1	Análise do crescimento e variabilidade genética de peixe-rei em sistema de criação intensivo.....	12
3	Relatório do trabalho de campo	25
3.1	Relatório referente à atividade I	25
3.1.1	Coleta de reprodutores, reprodução e incubação dos ovos.....	25
3.1.2	Desenho experimental	25
3.1.3	Dieta e alimentação	26
3.1.4	Condições de criação	26
3.1.5	Análise dos dados.....	27
3.2	Relatório referente à atividade II	28
3.2.1	Coleta de material e extração de DNA.....	28
3.2.2	Geração e sequenciamento da biblioteca genômica	29
3.2.3	Identificação <i>loci</i> potencialmente amplificáveis de microssatélites e desenhos de <i>primers</i>	29
4	Atividade I	31
4.1	Artigo aceito para publicação no periódico Semina: Ciências Agrárias	31
4.1.1	Growth performance of three pejerrey genetic groups in intensive culture system.....	31
5	Atividade II	46
5.1	Artigo a ser submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia	46
5.1.1	<i>Loci</i> potencialmente amplificáveis em <i>Odontesthes humensis</i>	46
6	Considerações Gerais	53
7	Referências Bibliográficas	54

1 Introdução

Aquicultura é considerada uma atividade multidisciplinar, relacionada ao cultivo de diversos organismos aquáticos, entre eles plantas, moluscos, crustáceos e peixes, sendo fundamental o manejo do processo de criação para o aumento da produção (OLIVEIRA, 2009).

O Brasil apresenta extensas áreas de reservatórios de água doce, equivalendo a 12% da água doce do planeta, clima favorável, terras disponíveis, crescente mercado interno e maior biodiversidade de espécies nativas de peixes, contudo sua produção aquícola é irrisória (IBAMA, 2008; RESENDE et al., 2008). Além disso, os últimos dados estatísticos do IBAMA mostram que a região Sul do Brasil contribui com a maior parcela na produção nacional, onde a carpa (*Cyprinus carpio*) e a tilápia (*Oreochromis niloticus*) são as espécies mais representativas (KUBITZA et al., 2012). Porém são espécies exóticas e através da piscicultura pode ocorrer à introdução destas no ambiente, mudando a ecologia local, competindo por espaço e alimento com as espécies nativas e introduzindo patógenos e parasitas.

A forma para superar este problema é através do desenvolvimento da piscicultura de espécies nativas (SANDRE, 2009). O Rio Grande do Sul apresenta uma situação privilegiada, com reservatórios naturais e artificiais de água doce, além de extensas áreas de terras de várzeas e espécies nativas que merecem destaques, como o jundiá (*Rhamdia quelen*) e o peixe-rei (*Odontesthes* spp.).

O peixe-rei é um representante da ordem atheriniformes que inclui peixes encontrados em águas doces, marinhas, tropicais e temperadas. Dentro dos atheriniformes é um exemplar da subfamília atherinopsinae, que são compostos por

seis gêneros em dois grupos antitropicais: Atherinopsini na América do Norte (*Atherinops*, *Atherinopsis*, *Colpichtys*, *Leuresthes*) e Sorgentinini na América do Sul (*Basilichthys*, *Odontesthes*) (DYER, 2006).

O gênero *Odontesthes* apresenta a maioria das espécies e mais amplamente distribuída, sendo encontradas em águas costeiras marinhas, lagoas de água doce (BEMVENUTI, 2006) e estocada com sucesso em bacias artificiais de países sul-americanos.

A elevada qualidade do peixe-rei, boa aceitação comercial, carne com sabor, cheiro, textura e características químicas semelhantes às das requintadas espécies marinhas (SOMOZA et al., 2008), também tem incentivado o cultivo em locais distantes da sua área de distribuição nativa, como o Japão e a Itália (BAIGÚN et al., 2009).

No Brasil está presente principalmente nas lagoas Mirim e Mangueira, onde já foram descritas várias espécies como *Odontesthes bonariensis*, *O. humensis*, *O. mirinensis*, sendo as *O. bonariensis* e *O. Humensis* mais comumente encontradas (PIEDRAS e POUHEY, 2004; DYER, 2006).

Seu cultivo não é desenvolvido o suficiente para alcançar níveis comerciais, sendo a comercialização desta espécie através da coleta de populações naturais. O ponto inicial para o sucesso do cultivo de peixe-rei é a consolidação de um programa de melhoramento genético (TAVARES et al., 2011). Ao se realizar este tipo de técnica, com base em uma grande variabilidade genética inicial, asseguram-se a existência de variabilidade suficiente para se alcançar as melhorias desejadas para sucessivas gerações (KUBITZA et al., 2007).

Sendo assim, é de grande importância o desenvolvimento de estudos e definição de estratégias de cultivo, bem como a compreensão da variabilidade genética das diferentes espécies de peixe-rei, necessária para implementação de um programa de melhoramento genético animal. No entanto, estudos de variabilidade genética necessitam de marcadores moleculares altamente polimórficos, onde para a espécie *O. bonariensis* já foram relatados marcadores do tipo microssatélites (TAVARES et al., 2011).

Os microssatélites, também conhecidos como STR – (Repetições curtas em *tandem* “*Short tandem Reapeats*”) ou SSR – (Simples sequências repetidas “*Simple repeated sequences*”), são elementos repetitivos, arranjadas em repetições em *tandem*, com o comprimento de dois a seis nucleotídeos e estão entre os *loci* mais polimórficos do genoma (MILACH, 1998). Sendo ferramentas importantes para estudos sobre ecologia, evolução, melhoramento genético e genética de populações (MELO et al., 2006; TAVARES, et al., 2011; CASTOE et al., 2012).

Este estudo tem como objetivo dar subsídio técnico e científico para a definição do melhor modelo animal, entre diferentes grupos genéticos de peixe-rei, sendo realizados dois experimentos distintos em um único projeto. No primeiro experimento foram analisados o desempenho em crescimento de *O. bonariensis*, *O. humensis* e do híbrido (*O. bonariensis* e *O. humensis*) em sistema de criação intensivo. No segundo experimento foram identificados *loci* potencialmente amplificáveis de microssatélites na espécie *O. humensis*, com grande potencial para análise de variabilidade genética.

2 Projeto de pesquisa

2.1 Análise do crescimento e variabilidade genética de peixe-rei em sistema de criação intensivo

- Projeto cadastrado no Conselho Coordenador do Ensino, Pesquisa e Extensão/UFPel (COCEPE) sob o número 5.04.00.051
- Registro no Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA): 9278

PRPPG – Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Modelo Estruturado

<Análise de crescimento e variabilidade genética de peixe-rei em sistema de criação intensivo>

Equipe:

M.Sc. Rafael Aldrighi Tavares – Aluno de Doutorado PPGZ/UFPel

Dr. Nelson José Laurino Dionello – Orientador – Melhoramento Genético Animal

Dr. Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey – Aquicultura

Dr. Sérgio Renato Noguez Piedras – Recursos Pesqueiros

Dr. Heden Luiz Marques Moreira – Melhoramento Genético Animal

M.Sc. Diones Bender Almeida – Aluno de Doutorado PPGZ/UFPel

M.Sc. Cleber Bastos Rocha – Aluno de Doutorado PPGZ/UFPel

Marília Danyelle Nunes – Bióloga – Aluna de Mestrado PPGZ/UFPel

Jackes Douglas Manke dos Santos – Ecólogo – Aluno de Mestrado PPGZ/UFPel

Verônica Hammes Garcia - Aluno do curso de graduação em Biologia/UFPel

<Rafael Aldrighi Tavares>

<Pelotas, 22 de dezembro de 2010>

1. Caracterização do Problema

O Brasil apresenta extensas áreas de reservatórios de água doce, equivalendo a 12% da água doce do planeta, clima favorável, terras disponíveis, crescente mercado interno e maior biodiversidade de espécies nativas de peixes, contudo sua produção aquícola é irrisória (IBAMA, 2008; RESENDE et al., 2008). Para estruturar a cadeia produtiva o governo federal elaborou o projeto “Bases tecnológicas para desenvolvimento da aquicultura no Brasil”, onde procurará desenvolver informações e tecnologias adaptadas às condições locais, melhorando o desempenho do setor e proporcionando a sustentabilidade da atividade (AQUABRASIL, 2009). O Rio Grande do Sul apresenta uma situação privilegiada para esta prática, com reservatórios naturais e artificiais de água doce, extensas áreas de terras de várzeas e fauna ictiológica com espécies potencialmente promissoras para aquicultura.

Os últimos dados estatísticos do IBAMA mostram que a região Sul do Brasil contribui com a maior parcela na produção nacional, onde a carpa e a tilápia são as espécies mais representativas, tendo suas maiores produção concentradas nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná. Porém estas são espécies exóticas e através da piscicultura pode ocorrer à introdução destas espécies no ambiente, mudando a ecologia local, competindo por espaço e alimento com as espécies nativas e introduzindo patógenos e parasitas.

A forma para superar este problema é através do desenvolvimento da piscicultura de espécies nativas (SANDRE, 2009), onde no Rio Grande do Sul algumas são as espécies que merecem destaques entre elas o jundiá e o peixe-rei. O peixe-rei é uma espécie nativa da América do Sul, encontrada nas lagoas Mirim e Mangueira, onde já foram descritas várias espécies como *Odontesthes bonariensis*, *O. humensis*, *O. mirinensis*, sendo as espécies *O. bonariensis* e *O. Humensis* as que comumente se encontram nas lagoas Mangueira e Mirim (PIEDRAS e POUHEY, 2004; DYER, 2006). O peixe-rei tem boa aceitação comercial, carne com sabor, cheiro, textura e características químicas semelhantes às das requintadas espécies marinhas (SOMOZA et al., 2008). Seu cultivo não é desenvolvido o suficiente para alcançar níveis comerciais, sendo a comercialização desta espécie através da coleta de populações naturais. Um ponto para alavancar o cultivo desta espécie, no Sul do

Rio Grande do Sul, é a utilização do melhoramento genético dirigido. Ao se realizar este tipo de técnica, com base em uma grande variabilidade genética inicial, asseguram-se a existência de variabilidade suficiente para se alcançar as melhorias desejadas para sucessivas gerações (KUBITZA et al., 2007).

Desta forma, este projeto tem como escopo dar subsídio técnico e científico para a definição do melhor modelo animal, entre duas espécies de peixe-rei (*O. bonariensis* e *O. humensis*), a ser utilizada em um programa de melhoramento genético.

2. Objetivos e Metas

Objetivos

- Definição da espécie de peixe-rei, que apresenta melhor desempenho em um programa de melhoramento genético.
- Definição do melhor momento para seleção desta espécie.
- Manutenção da variabilidade genética do estoque.

Metas

- Realizar ensaios biológicos para obtenção de curva de crescimento nas diferentes espécies.
- Obter através da curva de crescimento o ponto de máximo peso corporal, definindo o melhor momento para seleção.
- Analisar a variabilidade genética do estoque, através de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

3. Metodologia

O projeto será desenvolvido no Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas. A metodologia empregada será a coleta de reprodutores na lagoa Mangueira, junto a pescadores locais e a realização dos cruzamentos entre *O. bonariensis* e entre *O. humensis*. Um total de 4000 larvas, divididos em dois grupos genéticos (Bonariensis e Humensis), com quatro repetições de cada grupo (500 larvas por repetição), serão mantidas durante 6 meses em sistema de recirculação de água, com temperatura constante de 20°C e salinidade de 5%, caracterizando uma condição de confinamento.

A análise do crescimento será dividida em três etapas conforme idade dos animais e tipo de alimentação. Na primeira etapa (0 a 30 dias) o alimento fornecido será zooplankton, quatro vezes ao dia (8, 11, 14, 17 horas), sendo os animais estocados em aquários de 50 litros. Na segunda etapa (30 aos 60 dias) será fornecido zooplankton mais ração comercial (55% de proteína bruta e 3600 kcal/kg), quatro vezes ao dia (8, 11, 14, 17 horas), mantendo os animais em aquários de 50 litros. Na terceira etapa os animais serão transferidos para tanques de 1000 litros e alimentados com ração comercial (55% de proteína bruta e 3600 kcal/kg), duas vezes ao dia (9 e 16 horas) até completarem 180 dias de estocagem.

O volume de alimento será na proporção de 5% da biomassa total, sendo ajustada a taxa de arraçoamento e densidade animal através de uma amostragem a cada 15 dias, de 10% dos peixes por unidade experimental. Também será realizada a biometria, através da avaliação do peso e comprimento da amostragem. Nos primeiros três meses os animais amostrados serão eutanasiados por aprofundamento da anestesia com solução de benzocaína 0,2 g.L⁻¹. Para as demais biometrias os peixes serão deixados em jejum de 24h e em seguida anestesiados com solução de benzocaína 0,1 g.L⁻¹.

Diariamente será realizado o controle dos parâmetros físicos e químicos da água (temperatura da água; alcalinidade; pH; oxigênio dissolvido e amônia total) e mortalidade dos animais. Os animais mortos serão congelados a -20°C e encaminhados ao biotério central da UFPel, onde serão enviados para cremação.

Para construção da curva de crescimento será utilizado o software WOMBAT, que permitirá a definição do melhor momento para a seleção através do ponto de máximo peso corporal.

Análise da variabilidade genética será realizada através de 10 *loci* de marcadores microssatélites desenvolvidos para a espécie *O. bonariensis*. Os marcadores serão amplificados através da técnica de PCR e após visualizados em gel de poliacrilamida a 8%. Para análise dos dados gerados será utilizado o software Popgene.

4. Resultados e Impactos esperados

Resultados:

- Geração de dados científicos e técnicos que poderão auxiliar na tomada de decisão sobre qual espécie de peixe-rei apresenta um potencial para cultivo.
- Desenvolvimento de uma metodologia capaz de identificar perda de variabilidade genética de estoques de peixe-rei.
- Geração de conhecimento científico sobre o comportamento de espécies diferentes de peixe-rei.

Impactos:

A identificação do modelo de peixe-rei que melhor responde a adaptação e crescimento em sistema de cultivo intensivo permitindo o desenvolvimento de animais melhorados, beneficiando o cultivo e produção de peixe-rei no Brasil.

5. Cronograma do Projeto

Ano de 2011/2012

	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Adequação do sistema de cultivo	X	X	X	X								
Coleta de reprodutores						X	X					
Execução do ensaio de crescimento								X	X	X	X	X
Produção de zooplankton						X	X	X	X	X		
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Ano de 2012/2013

	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Execução do ensaio de crescimento	X											
Construção da curva de crescimento		X	X	X	X							
Extração DNA		X	X	X								
Desenho de <i>primers</i>			X	X								
PCR					X	X	X	X				
Gel Poliacrilamida							X	X	X	X		

Análise dos resultados												X	X
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Ano de 2013/2014

	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev
Análise dos resultados	X	X	X									
Qualificação					X							
Preparação dos artigos						X	X	X	X	X	X	
Defesa de tese												X
Revisão bibliográfica	X	X	X	X	X							

6. Outros Projetos e Financiamentos

Recursos humanos

Preços				
Item	Qtd.	Descrição	Unid.	Total
1	48	Bolsa de Pós-Graduação/CNPq	1.800,00	86.400,00
Sub-total: Recursos Humanos				86.400,00

Taxa de Bancada

Preços				
Item	Qtd.	Descrição	Unid.	Total
1	48	Taxa de Bancada/CNPq	394,00	18.912,00
Sub-total: Taxa de Bancada				18.912,00

Total do Investimento

Item	Descrição	Total
1	Sub-total: Bolsa de Pós-Graduação/CNPq	86.400,00
2	Sub-total: Taxa de Bancada/CNPq	18.912,00
Valor Total		105.312,00

7. Aspectos Éticos (quando aplicável)

Os animais serão mantidos em condição de controle total dos parâmetros físicos e químicos da água e todo procedimento de manejo a ser realizado somente após anestesia dos animais.

8. Referências Bibliográficas

AQUABRASIL. Bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável da aquicultura no Brasil: Disponível em <<http://www.macroprograma1.cnptia.embrapa.br/aquabrasil>>. Acesso em: 06 jan, 2010.

DYER, B.S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.

IBAMA. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 2008. 174p.

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

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F. Alimentação de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) com dietas naturais e artificiais. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1203-1206, 2004.

RESENDE, E.C.; RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P.; BENITES, C. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. **ADM – Artigo de divulgação na mídia**, v. 130, p. 1-4, 2008.

SANDRE, L.C.G. Melhoramento genético: Atualidades na piscicultura. **Revista Formação e Informação em Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SOMOZA, G.M.; MIRANDA, L. A.; BERASAIN, G.E.; COLAUTTI, D.; LENICOV M.R.; STRÜSSMANN, C. A. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 784-793, 2008.

3 Relatório do trabalho de campo

3.1 Relatório referente à atividade I

3.1.1 Coleta de reprodutores, reprodução e incubação dos ovos

Reprodutores de *O. bonariensis* e *O. humensis* foram coletados na lagoa Mangueira (S 32°59'12" e O 52°42'42") no mês de agosto do ano de 2011 e realizados os cruzamentos entre *O. bonariensis*, *O. humensis* e híbrido formado por macho de *O. humensis* com fêmea de *O. bonariensis*. Os ovos foram incubados separadamente em populações definidas como: Bonariensis, Humensis e Híbrida, em incubadoras, tipo funil, de fibra de vidro com capacidade 200 litros, com temperatura constante de 20°C, por um período aproximado de 15 dias.

3.1.2 Desenho experimental

O experimento foi conduzido no Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal de Pelotas - UFPel. Após a eclosão foram selecionadas aleatoriamente 2000 larvas, de cada população, e divididas em quatro repetições, totalizando 6000 indivíduos. Os animais foram mantidos durante 180 dias em sistema de recirculação de água com aquários de 50 litros, sendo realizadas 12 medidas de comprimento

total (Ct) e peso corporal (Pc) (0, 2, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 dias), através de uma amostragem aleatória de 10 indivíduos por repetição.

Do 0 aos 90 dias os animais amostrados foram eutanasiados por aprofundamento anestésico com solução de benzocaína $0,2 \text{ g.L}^{-1}$, medidos individualmente com ictímetro de precisão de 0,05 mm e pesados, por grupo de 10 animais, com balança de precisão de 0,01 mg. Para as demais análises os peixes foram mantidos em jejum de 24 horas e em seguida anestesiados com solução de benzocaína $0,1 \text{ g.L}^{-1}$, medidos e pesados individualmente.

Aos 60, 90, 120, dias a densidade, por repetição, foi ajustada para 250, 50 e 10 animais por unidade experimental, respectivamente.

3.1.3 Dieta e alimentação

Todos os peixes foram alimentados *ad libitum* com a mesma dieta, onde do zero aos 30 dias o alimento fornecido foi zooplâncton (rotíferos, cladóceros e copépodos), quatro vezes ao dia (8, 11, 14, 17 horas), dos 30 aos 60 dias zooplâncton mais ração Acqua line alevinos inicial (Supra, Brasil) com 56% de proteína bruta e $3700 \text{ Kcal.Kg}^{-1}$ de energia digestível, quatro vezes ao dia (8, 11, 14, 17 horas) e dos 60 aos 180 dias os animais foram alimentados com ração Acqua line alevinos inicial (Supra, Brasil) duas vezes ao dia (9 e 16 horas).

3.1.4 Condições de criação

Os animais foram criados em um sistema de recirculação de água composto por 12 aquários de polipropileno de 50 litros e um filtro biológico de 500 litros, com temperatura média de $20,84 \pm 0,86^\circ\text{C}$, pH de $7,6 \pm 0,5$, oxigênio dissolvido de $4,50 \pm 1,05 \text{ mg.L}^{-1}$, amônia total de no máximo $0,002 \text{ mg.L}^{-1}$ e para diminuição do estresse e prevenção de doenças foi utilizado uma concentração de NaCl de 5 g.L^{-1} .

Diariamente foi realizado sifonagem para retirada de resíduos acumulados no fundo dos aquários e a cada 30 dias limpeza do filtro biológico.

3.1.5 Análise dos dados

Taxa de crescimento específico para peso corporal (TCEp) e Taxa de crescimento específico para comprimento total (TCEc) foram calculados usando as fórmulas:

$$TCEp(\%.\text{dia}^{-1}) = ([\text{Ln}(Pc_f) - \text{Ln}(Pc_i)]/t) \times 100$$

$$TCEc(\%.\text{dia}^{-1}) = ([\text{Ln}(Ct_f) - \text{Ln}(Ct_i)]/t) \times 100$$

Sendo Pc_f e Pc_i o peso total (mg) e Ct_f e Ct_i o comprimento total (mm), inicial e final em um período de tempo t (dias).

Coefficiente de alometria (b) foi calculado por regressão entre Pc e Ct , através da equação:

$$Pc = a.Ct^b$$

Fator de condição (FC) foi calculado usando a fórmula:

$$FC(\text{mg}.\text{mm}^{-b}) = (Pc / Ct^b)$$

Onde b é o coeficiente de alometria.

Teste de Bartlett foi utilizado para testar a homogeneidade das variâncias dos dados e quando necessário os dados foram transformados para base logarítmica. As variáveis comprimento total, peso corporal e fator de condição foram analisadas usando método de ANOVA com populações (3 níveis) e dias (6 níveis) como fatores fixos. Efeitos sobre taxa de crescimento específico para peso corporal e comprimento total foram examinados por ANOVA com população (3 níveis) e período (5 níveis) como fatores fixos. Quando detectada diferença significativas na ANOVA ($\alpha=0,05$), as médias foram analisadas pelo teste de comparações múltiplas de Tukey.

A análise de crescimento para peso corporal e comprimento total por dia, entre as populações, foi realizada através de análise de regressão linear. A estimativa do comprimento máximo foi obtida pela equação da regressão linear do comprimento total e o valor estimado do peso corporal máximo foi obtido pela equação:

$$PC_{\max} = a.Ct_{\max}^b$$

Onde Ct_{\max} é comprimento total máximo estimado e b o coeficiente de alometria.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do software R 2.11.1.

3.2 Relatório referente à atividade II

3.2.1 Coleta de material e extração de DNA

Os tecidos foram coletados na lagoa Mangueira (Santa Vitória do Palmar, Brasil - S 32°59'12" e O 52°42'42"). O DNA genômico total foi extraído no Laboratório de Engenharia Genética Animal/UFPel, a partir de nadadeira caudal (200-300 mg) de *O. humensis*, usando separação orgânica pelo protocolo modificado de sal. Amostras de tecidos foram colocadas em microtubos com 550 µL de tampão de lise (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl), contendo 1% SDS e 7 µL de 200 µg.mL⁻¹ de proteinase K. Os microtubos foram incubados imediatamente em banho-maria a 50°C por 12 horas. Em seguida, 600 µL de NaCl 5 M foram adicionados a cada amostra, antes de serem centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para novos microtubos onde o DNA foi precipitado com 700 µL de etanol absoluto gelado e posteriormente incubadas a -20°C por 2 horas. As amostras de DNA foram centrifugadas, lavadas com 700 µL de etanol 70% e ressuspensos com 50 µL em tampão TE (10 mM de Tris pH 8,0 e 1 mM de EDTA), tratados com 30 µg.mL⁻¹ de RNase, e incubadas em banho-maria

durante 40 minutos a 37°C. O DNA obtido foi mantido a -20°C. A qualidade da extração foi checada em gel de agarose 1%, corado com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca. A concentração de DNA total foi medida através de espectrofotômetro utilizando NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA).

3.2.2 Geração e sequenciamento da biblioteca genômica

A biblioteca de DNA foi preparada a partir de 20 ng de DNA genômico de acordo com o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library (Illumina, USA). O sequenciamento da biblioteca foi conduzida em um sequenciador GAIIx (Illumina, USA) com leituras de 150 pares de bases. O preparo e sequenciamento foram conduzidos na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo – USP.

3.2.3 Identificação *loci* potencialmente amplificáveis de microssatélites e desenhos de *primers*

As leituras obtidas do sequenciamento foram analisadas com o programa PAL_FINDER_v.0.02.03, instalado em um computador com sistema operacional LINUX. Foram identificados como microssatélites (SSRs) dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos (5mer) e hexanucleotídeos (6mer), se contivessem repetições simples de pelo menos 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mers, e pelo menos três repetições para 5mers ou 6mers.

Após a identificação os microssatélites foram agrupados para um subdiretório local do programa Primer3 v.2. Foram utilizados os seguintes critérios para o desenho de *primers*: conteúdo GC superior a 30%; temperaturas de anelamento de 58 – 65°C com uma diferença máxima entre 2°C entre o par; os dois

últimos nucleotídeos 3' sendo G ou C e poli-N de no máximo quatro nucleotídeos. Todos os outros parâmetros foram ajustados para valores padrão do Primer3.

Os *loci* SSRs, que apresentaram sequências flanqueantes bastantes adequadas para desenho de *primers*, foram chamados de *Locis* Potencialmente Amplificáveis (PALs) e os PALs que apresentaram unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) e trechos mais longos de repetições (mais de 7 unidades de repetições observadas), foram chamados de “Best PALs”(bPALs).

4 Atividade I

4.1 Artigo aceito para publicação no periódico Semina: Ciências Agrárias

- A revista é uma publicação trimestral de divulgação científica e tecnológica vinculada à Universidade Estadual de Londrina/UEL – Paraná/Brasil. Publica artigos originais e artigos de revisão, relatos de casos e comunicações ligados à grande área das Ciências Agrárias (Agronomia, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Medicina Veterinária e Zootecnia).
- ISSN: 1679-0359.
- Qualis Capes: B2 - Zootecnia/Recursos Pesqueiros.
- Fator de Impacto (JCR 2012): 0,301.

4.1.1 Growth performance of three pejerrey genetic groups in intensive culture system

Growth performance of three pejerrey genetic groups in intensive culture system

Desempenho em crescimento de três grupos genéticos de peixe-rei criados em sistema intensivo

Rafael Aldrighi Tavares^{1*}; Sérgio Renato Noguez Piedras²; João Morato Fernandes¹; Juvêncio Luis Osório Fernandes Pouey²; Verônica Hammes Garcia¹; Heden Luiz Marques Moreira³; Nelson José Laurino Dionello²

Abstract: This study examined the growth performance of *Odontesthes bonariensis*, *O. humensis* and hybrid (*O. bonariensis* X *O. humensis*) in intensive culture system for a period of 180 days, using the body weight (W), total length (Lt), condition factor (CF), allometric coefficient (b), specific growth rate (SGR) and estimates of body weight and maximum total length (W_{max} , Lt_{max}) as indicators. Fish were randomly selected from three genetic groups (Bonariensis, Humensis and Hybrid), divided into water recirculation system consisting of 12 tanks (50 L). 12 measurements of body weight and total length (0, 2, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 days) were taken by means of a random sample of 10 subjects per replicate. All genetic groups grew in weight and length over the period analyzed, being influenced by the genetics of each species. *O. bonariensis* showed the best performance in growth and hybrid fish showed intermediate growth and estimated maximum body weight exceeding the pure species. Based on these results, it would be helpful the selective breeding and formation of domesticated strains.

Key words: *Odontesthes bonariensis*, *Odontesthes humensis*, hybrid, Genetic improvement

Resumo: Este estudo analisou o desempenho em crescimento de *Odontesthes bonariensis*, *O. humensis* e do híbrido *O. bonariensis* e *O. humensis* em sistema de criação intensivo, por um período de 180 dias, utilizando como indicadores o peso corporal (Pc), comprimento total (Ct), fator de condição (FC), coeficiente alométrico (b), taxa de crescimento específico (TCE) e estimativa de peso corporal e comprimento total máximo (Pc_{max} , Ct_{max}). Os peixes foram selecionados aleatoriamente de três grupos genéticos (Bonariensis, Humensis e Híbrida), divididos em sistema de recirculação de água composto de 12 aquários de 50L. Foram realizadas 12 medidas de peso corporal e comprimento total (0, 2, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 dias), por meio de uma amostragem aleatória de 10

¹ Postgraduate Students in Animal Science, Department of Animal Science, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, UFPel, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: rafaaldrighi@gmail.com; moratofernandes@hotmail.com; veronica.hgarcia@gmail.com

² Profs. Drs. of Department of Animal Science, Faculty of Agronomy Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas UFPel, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: sergiopiedras@hotmail.com; juvencio@ufpel.tche.br; dionello@ufpel.edu.br

³ Prof. Dr. of Department of Zoology and Genetics, Institute of Biology, UFPel, Pelotas, Rs, Brazil. E-mail: heden.luiz@gmail.com

* Author for correspondence

indivíduos por repetição. Todos os grupos genéticos cresceram em peso corporal e comprimento total ao longo do período analisado, sendo influenciadas pela genética de cada espécie. *O. bonariensis* apresentou o melhor desempenho em crescimento e os peixes híbridos apresentaram um crescimento intermediário e uma estimativa de peso corporal máximo que superou as espécies puras. Com base nestes resultados, seria útil a seleção de reprodutores e formação de linhagens domesticadas.

Palavras-chave: *Odontesthes bonariensis*, *Odontesthes humensis*, híbrido, melhoramento genético

Introduction

The cultivation of native fish species is being used extensively in aquaculture, but with no expression in the world market. The increased production is possible only by increasing the fish size or the growth of genetically improved fish (TAVE, 1996; GJEDREM, 2012; GJEDREM; ROBINSON; RYE, 2012). The domestication and genetic breeding of species used in aquaculture will be completed by controlling the biological aspects (NEWKIRK, 1980), including genetics and knowledge of the productive performance such as: weight, length, specific growth rate, condition factor and allometry coefficient. In the aquaculture, breeding programs are based on selective breeding, hybridization, triploidy and more currently the marker-assisted selection (GJEDREM, 1983; TAVE, 1996; HULATA, 2001; SACOBIE et al., 2012). The hybrid fish exhibit rapid growth and high disease resistance (SENANAN et al., 2004), also it stands out for its low cost and rapid achievement of genetically improved animals in comparison to selective breeding and marker-assisted selection.

The pejerrey is a representative of the order Atheriniform that includes fish found in fresh, marine, tropical and temperate waters (DYER, 2006). The genus *Odontesthes* has most of species and most widely distributed, being found in coastal marine waters, freshwater lakes (BEMVENUTI, 2006) and stored successfully in artificial basins of South American countries.

In Brazil, it is mainly present in the Mangueira and Mirim lagoons, located on the coast of Rio Grande do Sul, southern Brazil, where several species have been described as *Odontesthes bonariensis*, *O. humensis*, *O. mirinensis*, the species *O. bonariensis* and *O. humensis* being the most commonly found (PIEDRAS; POUEY, 2004; DYER, 2006).

The high quality of pejerrey, good commercial acceptance, meat taste, smell, texture and chemical characteristics similar to those of exquisite marine species (SOMOZA et al., 2008) have also encouraged the cultivation in places far from its native area of distribution such as Japan and Italy (BAIGÚN; COLAUTTI; GROSMAN, 2009).

The pejerrey production techniques progressively improved, being possible to complete the production cycle in rearing system in tanks (MIRANDA et al., 2006). In Japan there are several farms and intensive rearing of pejerrey (VELASCO; BERASAIN; OHASHI, 2008), but in countries like

Brazil, Argentina, where this species is native, the production is still insufficient being restrict to production of fingerlings for resettlement and artisan culture (GROSMAN, 2002; PIEDRAS et al., 2009). In extensive farming in cages in shallow lakes of Argentina, the production of pejerrey reaches on average 2085 kilograms per hectare (COLAUTTI et al., 2010).

The starting point for successful rearing of pejerrey is the consolidation of a breeding program (TAVARES et al., 2011), requiring the identification of the animal model with best livestock performance. The present study aims at analyzing the growth performance of three pejerrey genetic groups (*O. bonariensis*, *O. humensis* and hybrid between *O. bonariensis* and *O. humensis*) in intensive rearing system.

Material and Methods

Breeders of *O. bonariensis* and *O. humensis* were collected in Mangueira Lake (S 32 ° 59 '12 "and W 52 ° 42 '42 ") and the crosses between 11 pairs of each species, forming the pure populations. For forming the hybrids were used 8 males of *O. humensis* and 8 females of *O. bonariensis*. Fertilized eggs were incubated separately in defined populations as: Bonariensis, Humensis and Hybrid, in funnel-type incubators, fiberglass with 200 L capacity at constant temperature of 20 °C for 11-12 days.

The experiment was conducted at the Laboratory of Ichthyology at the Federal University of Pelotas. After hatching, 2000 larvae from each population were randomly selected and divided into four repetitions, totaling 6000 individuals. The animals were kept for 180 days in recirculating water system with tanks of 50 liters, being performed 12 measures in total length (Lt) and body weight (W) (0, 2, 7, 14, 21, 30, 45, 60, 75, 90, 120, 180 days) by means of a random sample of 10 subjects per replicate.

From 0 to 90 days, the sampled animals were euthanized by deep anesthesia with benzocaine solution of 0.2 gL⁻¹ measured individually with ictiometer of 0.05 mm precision and weighed for each group of 10 animals, with 0.01 mg precision scale. For the other analyzes, fish were fasted for 24 hours and then anesthetized with benzocaine solution of 0.1 gL⁻¹, measured and weighed individually. At 60, 90 and 120 days, the density by repetition was adjusted to 250, 50 and 10 animals, respectively.

All fish were fed *ad libitum* on the same diet, where from 0 to 30 days the diet provided was zooplankton (rotifers, cladocerans and copepods), from 30 to 60 days diet was zooplankton (rotifers, cladocerans and copepods) and plus commercial feed, Acq line initial fingerlings-Supra[®] (Alisul, Brazil) with 56% crude protein and 3700 kcalkg⁻¹ of digestible energy, and from 60 to 180 days the animals were fed on the same commercial diet, 6 days per week, twice per day.

The animals were reared in a water recirculation system consisting of 12 water propylene tanks of 50 L and a biological filter of 500 L, with mean temperature of $20.84 \pm 0.86^\circ\text{C}$, pH 7.6 ± 0.5 , $4.50 \pm 1.05 \text{ mgL}^{-1}$ dissolved oxygen, 0.002 mgL^{-1} maximum ammonia total and for decreased stress and disease prevention was used a 5 gL^{-1} NaCl, parameters considered acceptable for the species (PIEDRAS; POUEY, 2004). Siphoning was performed daily for the removal of waste accumulated at the bottom of tanks, including biometric days, and every 30 days cleaning of the biological filter.

Specific growth rate for body weight (SGR_w) and specific growth rate for total length (SGR_{L_t}) were calculated using the formulas proposed by Ricker (1979):

$$\text{SGR}_w(\% \text{ day}^{-1}) = ([\text{Ln}(W_f) - \text{Ln}(W_i)]/t) \times 100$$

$$\text{SGR}_{L_t}(\% \text{ day}^{-1}) = ([\text{Ln}(L_{t_f}) - \text{Ln}(L_{t_i})]/t) \times 100$$

where W_f e W_i are body weight (mg) and L_{t_f} and L_{t_i} are total length (mm) at the end and beginning of time period t (d), respectively.

The allometric coefficient (b) was calculated by regression between W and L_t , using the equation described by Richter et al. (2000):

$$W = aL_t^b$$

Condition factor (CF) was calculated using the formula proposed by Bagenal (1978):

$$\text{CF}(\text{mg mm}^{-b}) = (W/L_t^b) \times 100$$

where (b) is the coefficient of allometry.

Bartlett's test was used to test for data's variances homogeneity. The data on specific growth rate did not show normal distribution being transformed into logarithmic base. The variables total length, body weight and condition factor were analyzed using the ANOVA method, with populations (3 levels) and days (six levels) as fixed factors. Effects on specific growth rate for body weight and total length were examined by ANOVA, with population (3 levels) and time (5 levels) as fixed factors. When the ANOVA detected significant differences ($\alpha = 0.05$), means were analyzed by multiple comparison test of Tukey.

The growth analysis for body weight and total length per day among populations was performed using linear regression. The estimate of the maximum length was obtained by linear regression equation of the total length and the estimated value of the maximum body weight was obtained by the equation:

$$W_{\max} = aL_{\max}^b$$

where $L_{t_{max}}$ is the estimate of the maximum length.

All analyzes were performed with the aid of the software R 2.11.1.

Results

During the 180 days of growth, mortalities among populations showed no significant difference (mean 43%).

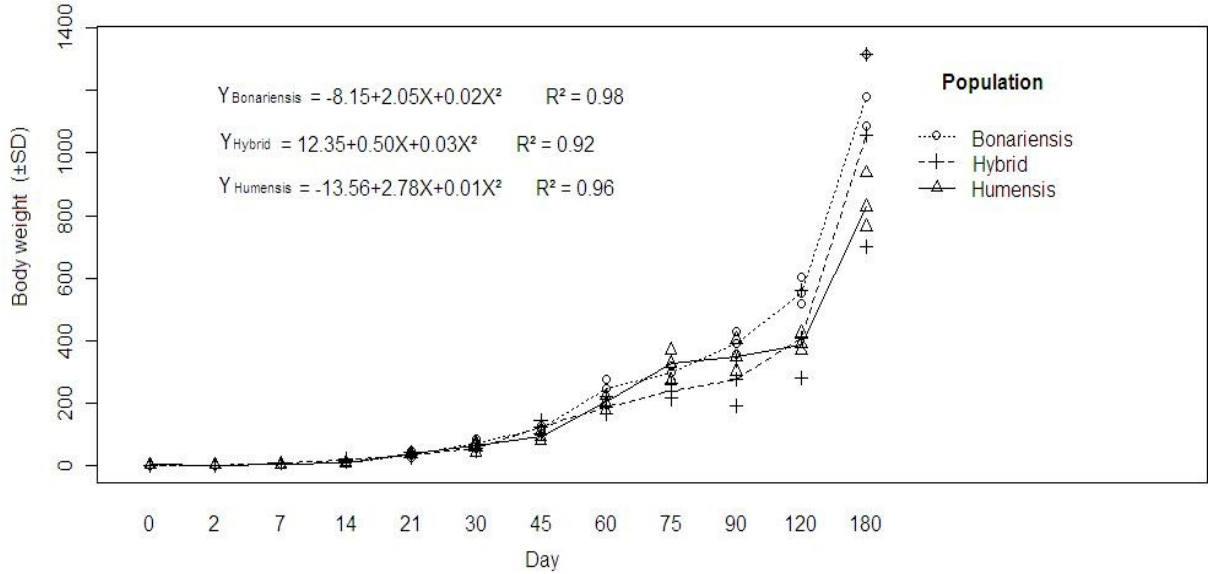
All populations were grown in body weight and total length throughout the period analyzed (Figs 1, 2 and Table 1).

In the initial analysis (day 0) the three populations showed significant differences in mean body weight, whose the Humensis population was the one with the highest value and the Bonariensis with the lowest one. At 30 days all populations were similar in mean body weight and at 60 and 90 days the mean body weight was higher for populations Humensis and Bonariensis compared to the Hybrid one. The population Bonariensis had mean body weight higher than the other populations at 120 days and higher than Humensis at 180 days and similar to the Hybrid population. Although the population Humensis presented significantly higher initial body weight, at the end of the growing period had body weight 29.92% lesser than the Bonariensis population (Table 1). The initial average total length was significantly higher for Humensis population, but lower than Bonariensis at 60 days. The population Bonariensis continued with the average total length larger than the others, from day 60 until the end of 180 days, where 16.82% gain was obtained compared to the population Humensis and 10.03% compared to the Hybrid one (Table 1).

Initially, the mean for condition factor of Bonariensis population was lower than other populations, but at 30 days it was significantly higher. From day 60 until the end period, Bonariensis population remained with mean value higher than Humensis and similar to Hybrid. The mean condition factor shows a decreasing trend from 30 to 180 days for all populations (Table 1).

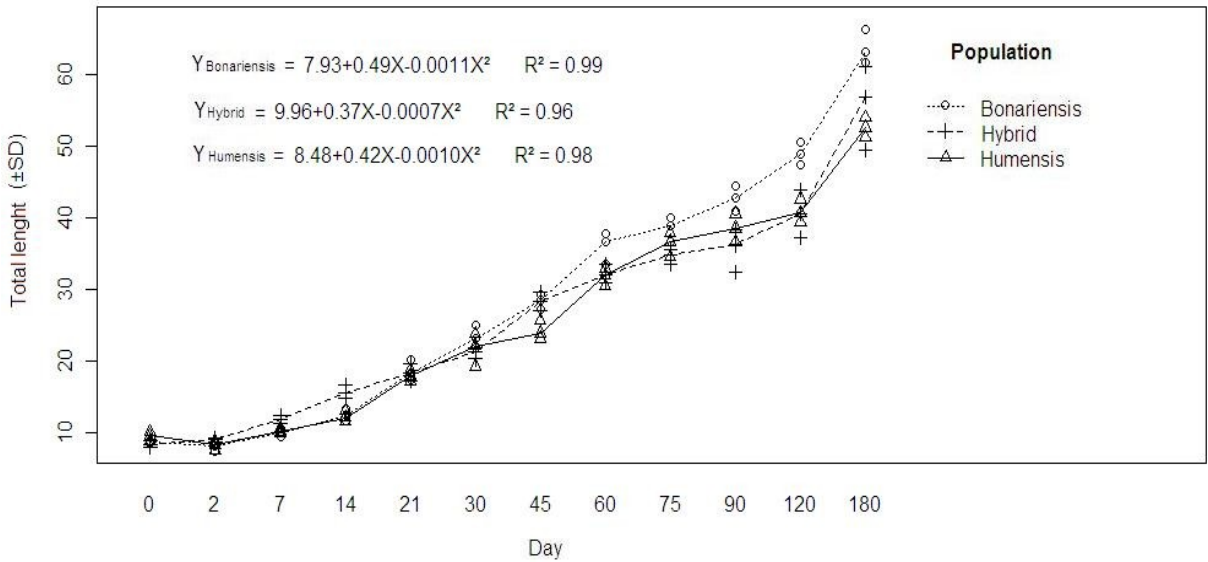
The specific growth rate for body weight tended to decrease throughout the period (Table 2). In the period between 0 and 30 days, the population Bonariensis has on average the specific growth rate for body weight significantly higher than the populations Humensis and Hybrid. During the periods 30-60, 60-90 and 120-180 days the specific growth rate for body weight was similar for the three populations (Table 2). The Hybrid population within 90 to 120 days had the highest average value of specific growth rate for body weight than the other populations, where the average body weight goes from a lower value at 90 days to a higher one at 120, compared to the Humensis population (Tables 1, 2).

Figure 1. Mean body weight (mg) between the three populations of pejerrey, over the period of 180 days of culture.



Source: Elaboration of the authors.

Figure 2. Mean total length (mm) between the three populations of pejerrey over the period of 180 days of culture.



Source: Elaboration of the authors.

Table 1. Mean (\pm SD) body weight, total length and condition factor of three populations of pejerrey during the 180 days of culture.

Population	Day 0	Day 30	Day 60	Day 90	Day 120	Day 180
<i>Body weight (mg)</i>						
Bonariensis	1.3 \pm 0.01 ^C	71.6 \pm 12.6 ^A	247.5 \pm 30.2 ^A	391.2 \pm 31.3 ^A	489.2 \pm 14.2 ^A	1181.4 \pm 101.6 ^A
Hybrid	2.5 \pm 0.09 ^B	57.07 \pm 6.4 ^A	185.5 \pm 23.4 ^B	274.9 \pm 67.6 ^B	446.2 \pm 8.1 ^B	1058.9 \pm 280.4 ^{AB}
Humensis	3.1 \pm 0.04 ^A	64.8 \pm 15.01 ^A	203.2 \pm 23.3 ^A	347.2 \pm 50.4 ^A	407.0 \pm 13.9 ^C	828.1 \pm 78.5 ^B
<i>Total length (mm)</i>						
Bonariensis	8.8 \pm 0.2 ^B	23.2 \pm 1.4 ^A	36.6 \pm 2.1 ^A	42.7 \pm 1.5 ^A	48.9 \pm 1.4 ^A	63.1 \pm 2.1 ^A
Hybrid	8.4 \pm 0.3 ^B	21.40 \pm 0.7 ^A	32.1 \pm 1.1 ^B	36.2 \pm 2.6 ^B	40.5 \pm 2.8 ^B	56.8 \pm 5.1 ^B
Humensis	9.6 \pm 0.4 ^A	22.1 \pm 1.9 ^A	31.9 \pm 1.1 ^B	38.5 \pm 1.7 ^B	40.7 \pm 1.3 ^B	52.5 \pm 1.1 ^B
<i>Condition factor (mg mm^{-b})</i>						
Bonariensis	0.15 \pm 0.01 ^B	0.41 \pm 0.02 ^A	0.36 \pm 0.02 ^A	0.34 \pm 0.01 ^A	0.32 \pm 0.01 ^A	0.30 \pm 0.02 ^A
Hybrid	0.26 \pm 0.03 ^A	0.28 \pm 0.01 ^C	0.24 \pm 0.01 ^B	0.24 \pm 0.01 ^B	0.25 \pm 0.02 ^B	0.22 \pm 0.01 ^B
Humensis	0.24 \pm 0.04 ^A	0.35 \pm 0.02 ^B	0.36 \pm 0.03 ^A	0.32 \pm 0.01 ^A	0.31 \pm 0.01 ^A	0.29 \pm 0.01 ^A

Values with different upper case superscripts within a column are significantly different at $p < 0.05$ (based on Tukey tests).

Source: Elaboration of the authors.

Bonariensis and Hybrid populations in the first period (0-30 days) differed from Humensis population for the mean values of specific growth rate for total length. In periods 30-60, 60-90, 90-120 no difference has occurred among populations and in the final period (120-180 days) the Hybrid population had higher specific growth rate for length compared to Humensis and Bonariensis populations (Table 2).

Table 2. Mean (\pm SD) specific growth rate for body weight (SGR_W) and specific growth rate for total length (SGR_{L_t}) of three populations of pejerrey during the 180 days of culture.

Population	Day 0-30	Day 30-60	Day 60-90	Day 90-120	Day 120-180
<i>SGR_W (% day⁻¹)</i>					
Bonariensis	13.30 \pm 0.57 ^A	4.14 \pm 0.87 ^A	1.55 \pm 0.50 ^A	0.75 \pm 0.19 ^B	1.46 \pm 0.14 ^A
Hybrid	10.39 \pm 0.34 ^B	3.93 \pm 0.41 ^A	1.25 \pm 1.19 ^A	1.69 \pm 0.91 ^A	1.39 \pm 0.49 ^A
Humensis	9.99 \pm 0.88 ^B	3.87 \pm 1.19 ^A	1.77 \pm 0.52 ^A	0.55 \pm 0.38 ^B	1.18 \pm 0.17 ^A
<i>SGR_{L_t} (% day⁻¹)</i>					
Bonariensis	3.22 \pm 0.18 ^A	1.52 \pm 0.33 ^A	0.51 \pm 0.20 ^A	0.85 \pm 0.17 ^A	0.22 \pm 0.09 ^B
Hybrid	3.11 \pm 0.16 ^A	1.35 \pm 0.13 ^A	0.39 \pm 0.34 ^A	0.29 \pm 0.93 ^A	0.60 \pm 0.35 ^A
Humensis	2.75 \pm 0.19 ^B	1.24 \pm 0.39 ^A	0.62 \pm 0.18 ^A	0.02 \pm 0.09 ^A	0.50 \pm 0.11 ^B

Values with different upper case superscripts within a column are significantly different at $p < 0.05$ (based on Tukey tests).

Source: Elaboration of the authors.

The quadratic regression model fitted best for all populations, on both growth in body weight as in total length (Figures 1, 2).

The coefficient of allometry for the three populations was higher than three, ie, positive allometric growth with increase in total length more pronounced than in body weight for period of 180 days studied (Table 3).

The estimated maximum body weight was higher for the Hybrid population, but lower for the estimate of maximum total length. The population Bonariensis had estimated maximum total length higher than other populations, with estimated maximum body weight lower than the Hybrid population (Table 4).

Table 3. Allometry coefficient of three populations of pejerrey during the 180 days of culture.

Population	Allometry coefficient	R ²
Bonariensis	0.0021Lt ^{3.2394}	0.98
Hybrid	0.0026Lt ^{3.2259}	0.99
Humensis	0.0027Lt ^{3.2262}	0.99

Source: Elaboration of the authors.

Table 4. Estimated maximum body weight and maximum total length for the three populations of pejerrey.

Population	Maximum body weight (mg)	Maximum total length (mm)
Bonariensis	1379.010	62.49
Hybrid	1391.185	53.47
Humensis	1015.296	59.67

Source: Elaboration of the authors.

Discussion

The difference in growth performance among populations clearly demonstrates the genetic influences within each species and the diversification of pejerrey species supported by Dyer (2006) and Bemvenuti (2006). Body weight and initial total length for the three populations are similar to those found by Costa et al. (2009) for *Odontesthes argentinensis*. At 30 days the body weight and total length are similar to those reported by Piedras and Pouey (2004) for *O. bonariensis* fed on natural and artificial diets, and those found by Costa et al. (2009) for *O. argentinensis*. Studies by Miranda et al. (2006) and Velasco, Berasain and Ohashi (2008) on intensive production of *O. bonariensis* had higher values of length and weight at 60 and 90 days compared to this study. Mean length and weight at 180 days showed superior performance of *O. bonariensis* compared to *O. humensis*. These means are similar to those obtained by Tsuzuki et al. (2000) studying the growth of *Odontesthes hatcheri* and *O. bonariensis* at 180 days and different saline concentrations. Colautti et al. (2010) in study of extensive farming in cages in the lake Lacombe, Argentina, during 315 days, obtained animals *O. bonariensis* with mean weight of 23.1 g and length 15.44 cm.

Hybridization did not show the expected growth performance, ie, higher compared to pure species, unlike other hybrid fish that have rapid growth (SENANAN et al., 2004; PANG, 2005;

GREEN; RAWLES, 2010), but studies involving hybrid fish are domesticated strains, used in breeding programs and related with sterility, and the pejerrey fish reach sexual maturation at least one year.

O. bonariensis showed better growth performance (W and Lt), even with lower total weight and initial total length. The fact that this species has high growth performance is related to the high specific growth rate in the initial period, probably by early feeding, as the pejerrey larvae have rapid development in hatching with pigmented eyes, mouth and anus opened (SAMPAIO; PIEDRAS, 2005) and the best adaptation and feeding provided, this species being considered zooplanktonofagous (PIEDRAS; POUHEY, 2005). Another factor to be considered is the energy reserve of the yolk sac, where species with the largest reserves begin exogenous feeding later. The lower initial body weight of *O. bonariensis* may be related to a lower yolk content, once reports of Strüssmann and Takashima (1989) and Phonlor and Vinagre (1990) show that this species had a survival period after hatching under fasting less than *O. humensis*.

The basic assumption for the analysis of the condition factor is that the fish under the best nutritional and health conditions are thicker and therefore heavier for a given length (RICHTER et al., 2000). For the three populations of pejerrey the condition factor tended to decrease with increasing days of rearing. Lizama and Takemoto (2000) found that the condition factor is very broad among species, there not being a definite pattern in relation to growth. The species *O. bonariensis* presented higher body weight and condition factor at 180 days, although much less in comparison with the data published by Reartes (1995): 10.10 g in 141 days; Berasain, Colautti and Velasco (2000): 8.4 g in 198 days; Velasco, Berasain and Ohashi (2008): 11.28 g in 196 days. These authors used low stocking density in cement tanks with a surface of 100 m², where only the replacement of water was held and there was no excessive cleaning management, decreasing the stress factor.

The specific growth rate is a common criterion used for selection in aquaculture breeding programs, where domesticated fish have higher growth rates than wild animals, due to higher rates of food consumption, more efficiency in using food and genetic effects (SACOBIE et al., 2012). The specific growth rate for the body weight tended to decrease throughout the period similar to that found by Velasco, Berasain and Ohashi (2008) in experiment of intensive production of *O. bonariensis* juveniles.

In the period from 90 to 120 days, Humensis and Bonariensis populations showed drastic decrease in specific growth rate for body weight, but the Hybrid population had increased, resulting in higher body weight than the population Humensis at 120 days. This decrease was possibly due to stress (TSUZUKI et al., 2007; PIEDRAS et al., 2009) generated by adjusting animal density at day 90, where the condition factor decreased from 90 to 120 days in Humensis and Bonariensis populations and increased in the Hybrid ones. According to Gomiero and Braga (2003), the condition factor

indicates the degree of fish's well-being against the environment they live in and it must remain constant, regardless of size that the fish might have in a given period.

The coefficient of allometry has an important biological significance, indicating the rate of weight gain compared to the growth in length (FROTA; COSTA; BRAGA, 2004) and can be isometric when the allometric coefficient is equal to three, when negative allometric when allometric coefficient is less than three or positive allometric when the allometric coefficient is higher than three.

Colautti, Lenicov and Berasain (2006) states that the rates of growth between total length and body weight of fish are allometric, ie, these ratios are not constant. The allometric coefficient was higher than three for the three groups, similar to those of Colautti, Lenicov and Berasain (2006) for natural populations of *O. bonariensis*, and different from those found by Becker, Bruschi and Peret (2003). These authors analyzed the three *Odontesthes* species: *Odontesthes bicudo*, *Odontesthes piquava* and *Odontesthes ledae*, showing isometric growth for juvenile and adult animals, except for adults of *O. piquava* that showed negative allometric growth. Due to the allometric coefficient of the Hybrid population being lower than the others, the estimated maximum body weight was greater and its estimated total length was lower, showing that Hybrid fish have a more rounded conformation estimated than *O. bonariensis* and *O. humensis*. This study concludes that the growth performance is influenced by the species and *O. bonariensis* showed the best growth performance for 180 days when reared in intensive conditions. Hybrid fish showed intermediate growth and estimates of maximum body weight exceeding the pure species. Based on these results, it would be helpful the selection of breeders and formation of domesticated strains.

Acknowledgments

The authors are grateful to CNPq and to the PPGZ at the Universidade Federal de Pelotas for financial support. We thank members of the Laboratory of Ichthyology at the Universidade Federal de Pelotas for help in developing the Work.

References

- BAGENAL, T. *Methods for the assessment of fish production in fresh waters*. London: Blackwell, 1978. 313 p.
- BAIGÚN, C. R. M.; COLAUTTI, D. C.; GROSMAN, F. Assessment of condition in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) populations: which index works best? *Neotropical Ichthyology*, Porto Alegre, v. 7, n. 3, p. 439-446, 2009.

- BECKER, F. G.; BRUSCHI, W.; PERET, A. C. Age and growth of three *Odontesthes* species from southern Brazil (Atherinopsidae), with reference to phylogenetic constraints in their life-history. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 63, n. 4, p. 567-78, 2003.
- BEMVENUTI, M. A. Silversides in South Brazil: morphological and ecological aspects. *Biocell*, Mendoza, v. 30, n. 1, p. 111-118, 2006.
- BERASAIN, G. E.; COLAUTTI, D. C.; VELASCO, C. Culture of the pejerrey, *Odontesthes bonariensis*, during its first year of life. *Revista de Ictiología*, Corrientes, v. 8, n. 1-2, p. 1-7, 2000.
- COLAUTTI, D. C.; LENICOV, M. R.; BERASAIN, G. E. A standard weight equation to assess the body condition of pejerrey. *Biocell*, Mendoza, v. 30, n. 1, p. 131-135, 2006.
- COLAUTTI, D. C.; SOUZA, J. R. G.; BALBONI, L.; BAIGÚN, C. R. M. Extensive cage culture of pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) in a shallow pampean lake in Argentina. *Aquaculture Research*, London, v. 41, n. 10, p. 376-384, 2010.
- COSTA, M. P. V.; SILVA, R. Z.; SAMPAIO, L. A.; COUSIN, J. C. B. Larval microanatomy of marine silverside *Odontesthes argentinensis* from Rio Grande do Sul - Brazil. *Biociências*, Porto Alegre, v. 17, n. 1, p. 91-105, 2009.
- DYER, B. S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). *Biocell*, Mendoza, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.
- FROTA, L. O.; COSTA, P. A. S.; BRAGA, A. C. Length-weight relationships of marine fishes from the central Brazilian coast. *NAGA*, Penang, v. 27, n. 1, p. 20-26, 2004.
- GJEDREM, T. Genetic variation in quantitative breeding in fish and shellfish traits and selective. *Aquaculture*, Philadelphia, v. 33, n. 1-4, p. 51-72, 1983.
- GJEDREM, T. Genetic improvement for the development of efficient global aquaculture: A personal opinion review. *Aquaculture*, Philadelphia, v. 344-349, n. 1, p. 12-22, 2012.
- GJEDREM, T.; ROBINSON, N.; RYE, M. The importance of selective breeding in aquaculture to meet future demands for animal protein. *Aquaculture*, Philadelphia, v. 350 - 353, n. 1, p. 117-129, 2012.
- GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Length-weight relationship and condition factor for *Cichla cf. ocellaris* and *Cichla monoculus* (Perciformes, Cichlidae) in Volta Grande Reservoir, Rio Grande - MG/SP. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 25, n. 1, p. 79-86, 2003.
- GREEN, B. W.; RAWLES, S. D. Comparative growth and yield of channel catfish and channel X blue hybrid catfish fed a full or restricted ration. *Aquaculture Research*, London, v. 41, n. 9, p. 109-119, 2010.
- GROSMAN, F. *Fundamentals biological, economic and social for proper resource management pejerrey*. Buenos Aires: Astyanax, 2002. 132 p.
- HULATA, G. Genetic manipulations in aquaculture: a review of stock improvement by classical and modern technologies. *Genetica*, Amsterdam, v. 111, n. 1-3, p. 155-173, 2001.
- LIZAMA, M. A. P.; TAKEMOTO, R. M. Relationship between the growth pattern and different trophic categories: a hypothesis to be tested. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 22, n. 2, p. 455-463, 2000.

- MIRANDA, L. A.; BERASAIN, G. E.; VELASCO, C. A. M.; SHIROJO, Y.; SOMOZA, G. M. Natural spawning and intensive culture of pejerrey *Odontesthes bonariensis* juveniles. *Biocell*, Mendoza, v. 30, n. 1, p. 157-162, 2006.
- NEWKIRK, G. F. Review of the genetics and the potential for selective breeding of commercially important bivalves. *Aquaculture*, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 209-228, 1980.
- PANG, C. K. Production of marine tilapia hybrid for culture in a coastal fish farm. *Singapore Journal of Primary Industries*, Singapore, v. 32, n. 1, p. 93-105, 2005.
- PHONLOR, G.; VINAGRE, L. Artificial fertilization, incubation, growth and survival larval of *Odontesthes humensis* (DeBuen, 1953) reared in the laboratory. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlo, v. 50, n. 2, p. 35-343, 1990.
- PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F. Feeding pejerrey (*Odontesthes bonariensis*) fingerlings with natural and artificial diets. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 34, n. 4, p. 1203-1206, 2004.
- _____. Feeding of the silverside (*Odontesthes bonariensis*, Atherinopsidae) in the Mirim and Mangueira lagoons, Rio Grande do Sul, Brazil. *Iheringia*, Porto Alegre, v. 95, n. 2, p. 117-120, 2005.
- PIEDRAS, S. R. N.; POUHEY, J. L. O. F.; MOTOYAMA, I. S.; MARTINS, G. B. Survival of embryos of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *Odontesthes humensis* at different concentration of salinity. *Biotemas*, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 235-238, 2009.
- REARTES, J. L. *El pejerrey (Odontesthes bonariensis): Métodos de cría y cultivo masivo*. Rome: FAO. 1995. 35 p.
- RICHTER, H.; LÜCKSTÄDT, C.; FOCKEN, U. L.; BECKER, K. An improved procedure to assess fish condition on the basis of length-weight relationships. *Archive of Fishery and Marine Research*, Hamburg, v. 48, n. 3, p. 226-235, 2000.
- RICKER, W. Growth rates and models. In: HOAR, W.; RANDALL, D.; BRETT, J. (Ed.). *Fish physiology: bioenergetics and growth*. New York: Academic Press, 1979. 786 p.
- SACOBIE, C. F. D.; GLEBE, B. D.; BARBEAU, M. A.; LALL, S. P.; BENFEY, T. J. Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. *Aquaculture*, Philadelphia, v. 334-337, n. 1, p. 58-64, 2012.
- SAMPAIO, L.; PIEDRAS, S. R. N. Cultivation of the marine pejerrey, *Odontesthes argentinensis*, and freshwater, *Odontesthes bonariensis*. In: BALDISSEROTO, B.; GOMES, L. (Ed.). *Native species for aquaculture in Brazil*. Santa Maria: Ed. Universidade Federal de Santa Maria, 2005. 472 p.
- SEANAN, W.; KAPUSCINSKI, A. R.; NA-NAKORN, U.; MILLER, L. M. Genetic impacts of hybrid catfish farming (*Clarias macrocephalus* X *C. gariepinus*) on native catfish populations in central Thailand. *Aquaculture*, Philadelphia, v. 235, n. 1, p. 167-184, 2004.
- SOMOZA, G. M.; MIRANDA, L. A.; BERASAIN, G. E.; COLAUTTI, D.; LENICOV, M. R.; STRÜSSMANN, C. A. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. *Aquaculture Research*, London, v. 39, n. 7, p. 784-793, 2008.
- STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Histology and morphometry of starved pejerrey *Odontesthes bonariensis* larvae. *Nippon Suisan Gakkaishi*, Tokyo, v. 55, n. 2, p. 237-246, 1989.
- TAVARES, R. A.; NUNES, M. D.; ALMEIDA, D. B.; SILVA, J. C.; VAZ, B. S.; MOREIRA, C. G. A.; DIONELLO, N. J. L.; PIEDRAS, S. R. N.; MOREIRA, H. L. M. Utilization of microsatellite

- markers to form families of “pejerrey” *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, Belo Horizonte, v. 63, n. 5, p. 1263-1267, 2011.
- TAVE, D. *Selective breeding programmes for medium-sized fish farms*. Rome: FAO. 1996. 122 p.
- TSUZUKI, M. Y.; AIKAWA, H.; STRÜSSMANN, C. A.; TAKASHIMA, F. Comparative survival and growth of embryos, larvae, and juveniles of pejerrey *Odontesthes bonariensis* and *O. hatcheri* at different salinities. *Journal of Applied Ichthyology*, London, v. 16, n. 1, p. 126-130, 2000.
- TSUZUKI, M. Y.; OGAWA, K.; STRÜSSMANN, C. A.; MAITA, M.; TAKASHIMA, F.; MELO, C. M. R. The significance of cortisol on acclimation to salinity in pejerrey *Odontesthes bonariensis*. *Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science*, Belo Horizonte, v. 59, n. 5, p. 1301-1307, 2007.
- VELASCO, C.; BERASAIN, G. E.; OHASHI, M. Intensive production of juvenile pejerrey (*Odontesthes bonariensis*). *Biología Acuática*, Buenos Aires, v. 24, n. 1, p. 53-58, 2008.

5 Atividade II

5.1 Artigo a ser submetido ao periódico Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

- É editado pela Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG – MG/Brasil destina-se à publicação de trabalhos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal e áreas afins.
- ISSN: 1678-4162.
- Qualis Capes: B2 - Zootecnia/Recursos Pesqueiros.
- Fator de Impacto (JCR 2012): 0,269.

5.1.1 *Loc*í potencialmente amplificáveis em *Odontesthes humensis*

1 *Comunicação*

2 [*Communication*]

3
4 *Loci potencialmente amplificáveis em Odontesthes humensis*

5
6 [*Potentially amplifiable loci in Odontesthes humensis*]

7
8 R.A. Tavares^{1*}, S.R.N. Piedras², M.D. Nunes¹, D.B. Almeida¹, C.G.A. Moreira³, J.M.
9 Fernandes¹, S.F. Freitas², H.L.M. Moreira³, J.L.O.F. Pouey², N.J.L. Dionello²

10 ¹Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFPel

11 ²Departamento de Zootecnia – UFPel

12 ³Instituto de Biologia – UFPEL

13 *Autor para correspondência – Universidade Federal de Pelotas,

14 Caixa Postal 453, 96010-970 – Pelotas,RS

15 E-mail: rafaaldrighi@gmail.com

16
17 ABSTRACT

18 *In this work 25,806 potentially amplifiable microsatellite loci were identified in the species of*
19 *pejerrey Odontesthes humensis, with 21% of dinucleotide, 22% trinucleotide, 37%*
20 *tetranucleotide, 13% pentanucleotide and 7% hexanucleotide. Total loci, 167 were classified*
21 *as high quality, with capacity of be highly variable in the population. The results show that*
22 *with a small coverage of the genome was possible to identify a large number of microsatellite*
23 *loci. Furthermore, it was generated a great number of loci of high quality, with great*
24 *potential for analysis of genetic variability of this species.*

25
26 *Palavras-chave: peixe-rei, microssatélites, marcadores moleculares, PAL*

27
28 Com os avanços da tecnologia de sequenciamento de próxima geração, recursos genômico
29 estão se expandindo rapidamente, mesmo para as espécies de peixes não modelo. Entre as
30 espécies de peixes aquícolas, muitas economicamente importantes estão sendo sequenciadas,
31 tais como Salmão do Atlântico (*Salmo salar*) (Lien *et al.*, 2011) e Tilápia do Nilo
32 (*Oreochromis niloticus*) (Guyon *et al.*, 2012). Estes recursos genéticos incluem etiquetas de
33 sequências expressas (ESTs), mapas físicos, mapas de ligação genético e marcadores
34 moleculares.

35 Dentre os marcadores disponíveis atualmente, está o microssatélite (*SSR-Simple Sequence*
36 *Repeats*) por ser uma ferramenta satisfatoriamente utilizada em estudos de estrutura de
37 populações, conservação de espécies e gestão de recursos genéticos. O desenvolvimento de
38 marcadores microssatélites exigia um dispendioso esforço técnico, com procedimentos
39 demorados e caros. Estes procedimentos incluem técnicas como a criação de bibliotecas
40 enriquecidas para *loci* SSRs, clonagem, hibridização para detectar clones positivos,
41 isolamento de plasmídeo e sequenciamento (Castoe *et al.*, 2012). Entretanto avanços na
42 tecnologia de sequenciamento de DNA vêm proporcionando métodos mais eficientes e de
43 baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuem dados
44 disponíveis, gerando os chamados *loci* potencialmente amplificáveis (PALs) (Lance *et al.*,
45 2013), uma poderosa ferramenta para estudos genéticos.

46 O peixe-rei é um representante da ordem atheriniformes, que inclui peixes encontrados em
47 águas doces, marinhas, tropicais e temperadas de todo mundo. Dentro dos atheriniformes o
48 peixe-rei é um exemplar da subfamília atherinopsinae, que são compostos por seis gêneros em
49 dois grupos antitropicais: Atherinopsini na América do Norte (*Atherinops*, *Atherinopsis*,
50 *Colpichthys*, *Leuresthes*) e Sorgentinini na América do Sul (*Basilichthys*, *Odontesthes*) (Dyer,
51 2006). O *Odontesthes* é o gênero com a maioria das espécies, e mais amplamente distribuída,
52 sendo encontrada em águas costeiras marinhas e lagoas de água doce da América do Sul. No
53 Brasil está presente principalmente nas lagoas Mirim e Mangueira, onde já foram descritas
54 várias espécies, sendo a *O. humensis* uma das mais comumente encontrada (Dyer, 2006),
55 caracterizada como um importante recurso pesqueiro.

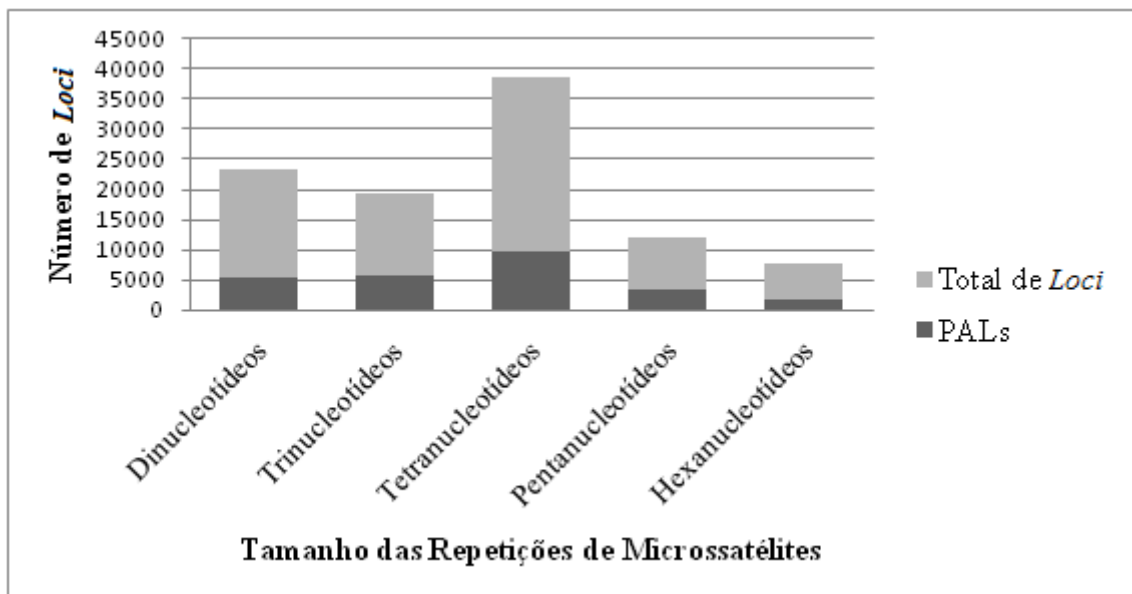
56 O conhecimento sobre a variabilidade genética e os padrões de estrutura das populações são
57 pré-requisitos para o desenvolvimento de estratégias para aquicultura, através de futuros
58 programas de melhoramento genético. No entanto, estudos de variabilidade genética em *O.*
59 *humensis* requer o desenvolvimento de marcadores moleculares com alto polimorfismo.

60 Este estudo tem o objetivo de desenvolver *loci* potencialmente amplificáveis de
61 microssatélites para *O. humensis* visando compreender a genética desta espécie.

62 Todos os materiais biológicos utilizados neste estudo foram obtidos de coletas na lagoa
63 Mangueira (Santa Vitória do Palmar, Brasil - S 32°59'12" e O 52°42'42"). O DNA genômico
64 total foi extraído a partir de nadadeira caudal (200-300 mg) de *O. humensis*, usando separação
65 orgânica pelo protocolo modificado de sal (Barrero *et al.*, 2008).

66 Uma única biblioteca genômica foi preparada a partir de 20 ng de DNA de acordo com o
67 protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library (Illumina, San Diego, USA). O
68 sequenciamento da biblioteca foi conduzida em um sequenciador GAIIx (Illumina, San

69 Diego, USA) com leituras de 150 pares de bases. As leituras obtidas foram analisadas com o
 70 programa PAL_FINDER_v.0.02.03 (Castoe *et al.*, 2012), identificando microssatélites com
 71 dinucleotídeos (2mer), trinucleotídeos (3mer), tetranucleotídeos (4mer), pentanucleotídeos
 72 (5mer) e hexanucleotídeos (6mer). Repetições estas que deveriam ser simples e de pelo menos
 73 12 pb de comprimento para 2mer, 3mer e 4mers, e pelo menos três repetições para 5mers ou
 74 6mers. Após a identificação os *loci* SSRs foram agrupados para um subdiretório local do
 75 programa Primer3 v.2 (Lance *et al.*, 2013) para o desenho dos *primers*.
 76 Foram obtidos 1.265.204 leituras, contendo aproximadamente 0,184 Gpb. O tamanho do
 77 genoma de *O. humensis* é desconhecido, embora genomas de peixes que foram pesquisados
 78 apresentam em média 1,250 Gbp (Katagiri *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2013), sendo assim a
 79 cobertura total foi de aproximadamente 15% do genoma.
 80 Do total de leituras obtidas, 75.347 continham SSRs, no entanto, 34% apresentaram
 81 sequências flanqueantes bastantes adequadas para desenho de *primers*, produzindo 25.806
 82 PALs, sendo 21% de 2mers, 22% de 3mers, 37% de 4mers, 13% de 5mers e 7% de 6mers
 83 (Fig. 1).



84

85 Figura 1. Comparação entre o número total de *loci* e o número de *loci* potencialmente
 86 amplificáveis (PALs), identificados por tamanho das repetições de microssatélites.

87

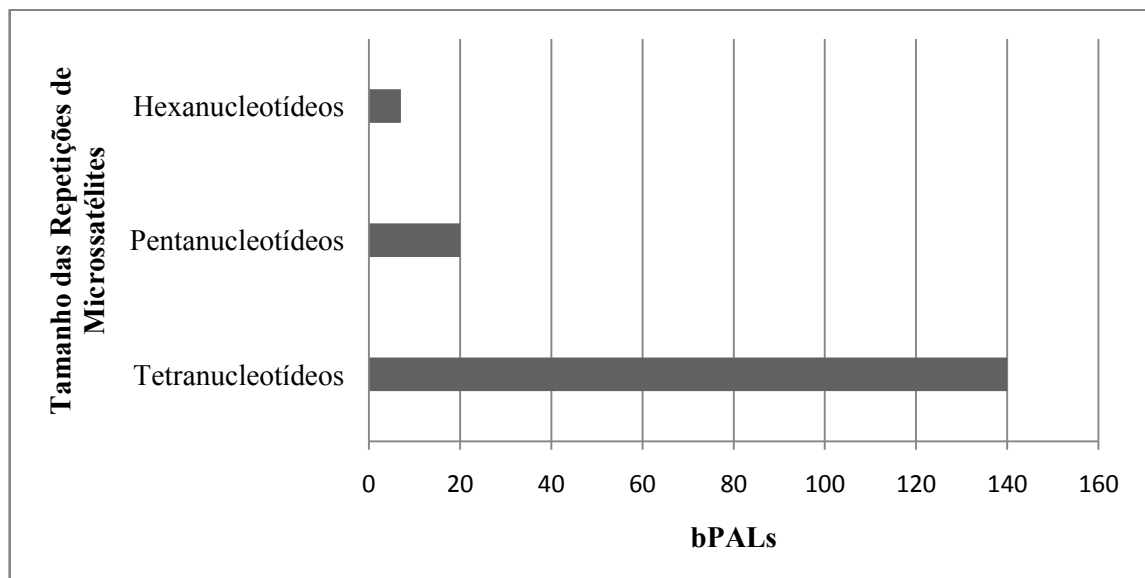
88 Em comparação com a espécie modelo “Zebrafish” (*Danio rerio*) (116.915 SSRs) (Rouchka,
 89 2010) o *O. humensis* apresenta números de *loci* microssatélites inferior, porém para obtenção
 90 dos *loci* SSRs, em zebrafish, foi utilizado o genoma total de aproximadamente 1,7 Gpb e para
 91 este estudo um total de 0,185 Gpb .

92 Para *Carpa Siamês* (*Henichorynchus siamensis*), 65.954 sequências foram obtidas com a
 93 plataforma 454 GS-FLX (Roche, Branford, USA), sendo que 1.837 eram SSRs (Iranawati *et al.*,
 94 2012). Lance *et al.* (2013) sequenciaram 0,5 Gpb do genoma de “Speckled Dace”
 95 (*Rhinichthys osculus*) e “Mountain Whitefish” (*Prosopium williamsoni*), apresentando
 96 entorno de 30.000 e 26.000 PALs respectivamente. Essas divergências podem ser devido às
 97 diferenças nas plataformas utilizadas e suas características peculiares, como cobertura do
 98 genoma, número de sequências e tamanho de leituras.

99 A repetição mais frequente encontrada foi o tetranucleotídeo (Fig. 1), sendo que Luo *et al.*
 100 (2012) obtiveram em “Tarim Schizothoracin” (*Schizothorax biddulphi*) e Lance *et al.* (2013)
 101 em “Speckled Dace” e “Mountain Whitefish” mais motivo dinucleotídeo.

102 Para tetranucleotídeos, o motivo de SSR mais frequente encontrado foi ATGG, onde segundo
 103 Meglécz *et al.* (2012), para Chordata em geral o motivo mais comum encontrado para
 104 tetranucleotídeo foi AGAT e em plantas AAAT, resultados distintos em ambos estudos e
 105 grupos de espécies o que sugere a vasta variação que pode ser encontrada dentre as
 106 repetições de *loci* microssatélites.

107 Do total de PALs foram selecionados os *loci* SSRs de melhor qualidade, chamados de “Best
 108 PALs”(bPALs), estes *loci* apresentam unidades longas de repetições (4mers, 5mers e 6mers) e
 109 trechos mais longos de repetições (mais de 7 unidades de repetições observadas), que são
 110 mais propensos a ser altamente variável na população (Castoe *et al.*, 2012; Lance *et al.*,
 111 2013). O número de bPALs foi de 167 (Fig. 2), valores próximo ao encontrado por Castoe *et al.*,
 112 2012) em aves (100 - 450) e inferiores aos resultados de Lance *et al.* (2013) em peixes
 113 (4.635 – 6.631).



115 Figura 2. *Loci* de melhor qualidade (bPALs) identificados por tamanho das repetições de
116 microssatélites.

117 Os resultados demonstram que com uma pequena cobertura do genoma de *O. humensis* foi
118 possível a identificação de um grande número de *loci* potencialmente amplificáveis de
119 microssatélites. Além disso, foi gerado um número ótimo de bPALs, com grande potencial
120 para análise de variabilidade genética desta espécie.

121

122

REFERÊNCIAS

123

124 BARRERO, N.M.L.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P. et al. Comparison of DNA extraction
125 protocols of fish fin and larvae samples: modified salt (NaCl) extraction. *Ciencia e*
126 *Investigacion Agraria*, v.35, p.65-74, 2008.

127 CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J. et al. Rapid Microsatellite Identification
128 from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*, v.7,
129 n.2, p.1-10, 2012.

130 DYER, B.S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei,
131 Atheriniformes). *Biocell*, v.30, n.1, p.69-88, 2006.

132 GUYON, R.; RAKOTOMANGA, M.; AZZOUZI, N. et al. A high-resolution map of the Nile
133 tilapia genome: a resource for studying cichlids and other percomorphs. *BMC Genomics*,
134 v.13, n.222, p.1-17, 2012.

135 IRANAWATI, F.; JUNG, H.; CHAND, V. et al. Analysis of Genome Survey Sequences and
136 SSR Marker Development for Siamese Mud Carp, *Henicorhynchus siamensis*, Using 454
137 Pyrosequencing. *International Journal of Molecular Science*, n.13, p.10807-10827, 2012.

138 JIANG, Y.; GAO, X.; SHIKAI, L. et al. Whole genome comparative analysis of channel
139 catfish (*Ictalurus punctatus*) with four model fish species. *BMC Genomics*, v.14, n.780, p.1-
140 11, 2013.

141 KATAGIRI, T.; KIDD, C.; TOMASINO, E. et al. A BAC-based physical map of the Nile
142 tilapia genome. *BMC Genomics*, v.6, n.89, p.1-6, 2005.

143 LANCE, S.L.; LOVE, C.N.; NUNZIATA, S.O. et al. 32 species validation of a new Illumina
144 paired-end approach for the development of microsatellites. *PLoS ONE*, v.8, n.11, p.1-11,
145 2013.

- 146 LIEN, S.; GIDSKEHAUG, L.; MOEN, T. et al. A dense SNP-based linkage map for Atlantic
147 salmon (*Salmo salar*) reveals extended chromosome homeologies and striking differences in
148 sex-specific recombination patterns. *BMC Genomics*, v.12, n.615, p.1-10, 2011.
- 149 LUO, W.; NIE, Z.; ZHAN, F. et al. Rapid Development of Microsatellite Markers for the
150 Endangered Fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) Using Next Generation Sequencing and
151 Cross-Species Amplification. *International Journal of Molecular Science*, n.13, p.14946-
152 14955, 2012.
- 153 MEGLÉCZ, E.; NÈVE, G.; BIFFIN, E.; GARDNER, M. G. Breakdown of Phylogenetic
154 Signal: A Survey of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model
155 Eukaryote Species. *PLoS ONE*, v.7, n.7, p.1-15, 2012.
- 156 ROUCHKA, E.C. Database of exact tandem repeats in the Zebrafish genome. *BMC*
157 *Genomics*, v.11, n.347, p.1-11, 2010.

6 Considerações Gerais

A implantação e consolidação de um programa de melhoramento genético de peixe-rei requerem a definição da espécie que apresente um melhor desempenho zootécnico, juntamente com seleção de reprodutores com alto grau de variabilidade genética e manutenção desta variabilidade entre as gerações.

O desempenho em crescimento está diretamente relacionado aos diferentes grupos genéticos de peixe-rei, onde foi estimado um maior peso corporal para os híbridos, formados pelo cruzamento entre machos de *O. humensis* e fêmeas de *O. bonariensis*.

A geração de um número ótimo de *loci* de melhor qualidade, para *O. humensis*, torna real a possibilidade de análise da variabilidade genética de diferentes populações desta espécie.

De forma geral, seria útil a seleção de reprodutores de *O. bonariensis* e *O. humensis*, com o auxílio de marcadores microssatélites e formação de linhagens domesticadas.

7 Referências Bibliográficas

BAIGÚN, C.R.M.; COLAUTTI, D.C.; GROSMAN F. Assessment of condition in pejerrey *Odontesthes bonariensis* (Atheriniformes: Atherinopsidae) populations: which index works best? **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 3, p. 439-446, 2009.

BEMVENUTI, M.A. Silversides in South Brasil: Morphological and ecological aspects. **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 111-118, 2006.

CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J.; JONES K.L.; TOMBACK D.F.; OYLER-MCCANCE S.J.; FIKE J.A.; LANCE S;L;; STREICHER J;W;; SMITH E.N.; POLLOCK D.D. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. 1-10, 2012.

DYER, B.S. Systematic revision of the South American silversides (Teleostei, Atheriniformes). **Biocell**, v. 30, n. 1, p. 69-88, 2006.

IBAMA. Estatística da pesca 2006 Brasil: grandes regiões e unidades da federação, Brasília, 2008. 174p.

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

KUBITZA, F.; CAMPOS, J.L.; ONO, E.A.; ISTCHUK, P.I. Estatísticas, espécies, pólos de produção e fatores limitantes à expansão da atividade. **Panorama da Aquicultura**, v.22, n.132, p. 14-25, 2012.

OLIVEIRA, R.C. O panorama da aquicultura no Brasil: A prática com foco na sustentabilidade. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, v. 2, n. 1, p. 71-89, 2009.

MELO, D.C; Oliveira, D.A.A; Ribeiro, L.P.; Teixeira, C.S.; Sousa, A.B.; Coelho, E.G.A.; Crepaldi, D.V.; Teixeira, E.A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 1, p. 87-93, 2006.

MILACH, S.C.K. Marcadores de DNA. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, n. 5, p. 14-17, 1998.

PIEDRAS, S.R.N.; POUHEY, J.L.O.F. Alimentação de alevinos de peixe-rei (*Odontesthes bonariensis*) com dietas naturais e artificiais. **Ciência Rural**, v. 34, n. 4, p. 1203-1206, 2004.

RESENDE, E.C.; RIBEIRO, R.P.; LEGAT, A.P.; BENITES, C. Melhoramento genético em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. **ADM – Artigo de divulgação na mídia**, v. 130, p. 1-4, 2008.

SANDRE, L.C.G. Melhoramento genético: Atualidades na piscicultura. **Revista Formação e Informação em Zootecnia**, v. 1, n. 1, p. 1-6, 2009.

SOMOZA, G.M.; MIRANDA, L.A.; BERASAIN, G.E.; COLAUTTI, D.; LENICOV, M.R.; STRÜSSMANN, C.A. Historical aspects, current status and prospects of pejerrey aquaculture in South America. **Aquaculture Research**, v. 39, p. 784-793, 2008.

TAVARES, R.A.; NUNES, M.D.; ALMEIDA, D.B.; SILVA, J.C.; VAZ, B.S.; MOREIRA, C.G.A.; DIONELLO, N.J.L.; PIEDRAS, S.R.N.; MOREIRA, H.L.M. Utilization of microsatellite markers to form families of “pejerrey” *Odontesthes bonariensis* in a genetic breeding program. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 5, p. 1263-1267, 2011.