

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**



**Tese**

**Mapeamento dos Laboratórios de alevinos do estado do  
Rio Grande do Sul e Desenvolvimento de Marcadores  
Moleculares para jundiá (*Rhamdia sp.*)**

**Marília Danyelle Nunes Rodrigues**

**Pelotas, 2013**

**MARÍLIA DANYELLE NUNES RODRIGUES**

**Mapeamento dos Laboratórios de alevinos do estado do Rio Grande do Sul e Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para jundiá (*Rhamdia sp.*)**

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 Animal).

Orientador: Dr. Heden Luiz Marques Moreira

Co-Orientador: Dr. Danilo Pedro Streit Jr.

**Pelotas, 2013**

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

R696m Rodrigues, Marília Danyelle Nunes

Mapeamento dos laboratórios de alevinos do estado do rio grande do sul e desenvolvimento de marcadores moleculares para jundiá (*rhamdia sp.*) / Marília Danyelle Nunes Rodrigues ; Heden Luiz Marques Moreira, orientador ; Danilo Pedro Streit Jr., coorientador. — Pelotas, 2013.

118 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

1. Jundiá. 2. Cadeia produtiva. 3. Ngs. 4. Microssatélite. I. Moreira, Heden Luiz Marques, orient. II. Jr., Danilo Pedro Streit, coorient. III. Título.

CDD : 639.37

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

**Banca examinadora:**

Dr. Heden Luiz Marques Moreira (presidente)

Dr. Nelson José Laurino Dionello

Dr. Vitor Hugo Borba Manzke

Dra. Beatriz Helena Gomes Rocha

Dra. Cristina Helena Maria Moreira Verneti

## **Dedico**

À Jesus meu salvador, à meu pai Saul Jorge Nunes e à meu esposo Marco que meu deu todo amor, carinho, compreensão e apoio em todas as decisões.

*As benignidades do SENHOR  
cantarei perpetuamente; com a minha  
boca manifestarei a tua fidelidade de  
geração em geração. Salmos, 89:1.  
SENHOR, tu tens sido o nosso  
refúgio, de geração em geração.  
Salmos, 90:1*

## **Agradecimentos**

Em um primeiro momento agradeço ao meu Deus, pois sem a presença de Jesus em minha vida não teria força para vencer.

Agradeço em especial ao meu esposo, pela imensa paciência que teve comigo durante minha caminhada, por ter orado por nós, pelas provações que tivemos que passar; obrigado, sem o teu amor e o teu carinho talvez não tivesse alcançado o meu objetivo, pois sei que sonhamos juntos.

Ao meu pai Saul Jorge Nunes que sempre acreditou na minha capacidade, incentivando, aconselhando, dando amor, sendo exemplo de honestidade, perseverança, coragem e acima de tudo, um pai herói e que hoje está junto com Deus.

Agradeço à minha mãe Maria Olina e às minhas irmãs Didi, Irene, Jussara e Suzara pelo incentivo, amor e carinho. Ao meu irmão Jorge, pelas risadas nos dias de descanso em Santana.

Aos meus cunhados Flávio e Marco, agradeço pelo carinho e amizade. E, ao meu sobrinho Arthur, pela amizade e pelos dias de risadas.

Não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de trabalho, Rafael, Carla, Harold e Natália. Os quais sempre foram compreensivos, incentivadores, companheiros e amigos.

Agradeço a EMATER, que com muito esforço visitou os produtores e auxiliou com a aplicação dos questionários e coleta de material biológico. Em especial a pessoa do Sr. Henrique Bartels, o qual foi parceiro do projeto em todos os momentos; sem a ajuda da EMATER seria impossível concluir este trabalho.

A todos os produtores do estado do Rio Grande do Sul, não encontro palavras para demonstrar o tamanho da minha gratidão, acreditaram na minha seriedade e no meu trabalho disponibilizando parte do seu tempo e do seu material de trabalho para que este projeto se cumprisse.

Agradeço também a outros amigos que muito ajudaram a desenvolver algumas etapas do meu projeto:

- Os meus orientados de TCC da Universidade Federal do Pampa, Rafael e Natália;

- Ao Grupo de Pesquisa: Diversidade Genética Animal coordenado pela Prof<sup>a</sup> Dra. Analía Del Valle Garnero da Universidade Federal do Pampa.

- Ao Prof Valdir Marcos Stefenon da Universidade Federal do Pampa.

- Ao Prof Danilo Streit pela disponibilidade da Bolsa de doutorado.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pela aprendizagem, atenção e amizade.

Ao CNPq e a CAPES pelo apoio financeiro ao meu projeto e a minha bolsa de doutorado.

Um agradecimento especial ao meu orientador Dr. Heden Moreira, que apostou na minha capacidade, que abriu as portas do seu Laboratório para que eu pudesse realizar meu sonho; que nos momentos de dificuldade me aconselhou, como um pai, que nos momentos de tristeza falava palavras de incentivo e que quando mais precisei foi quem me estendeu a mão. Professor muito obrigado por ser esse amigo.



## Resumo

RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes. **Mapeamento dos Laboratórios de alevinos do estado do Rio Grande do Sul e Desenvolvimento de Marcadores Moleculares para jundiá (*Rhamdia sp.*)**. 2013. 120 folhas. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O agronegócio é fundamental para a economia brasileira e a região Sul do país vem constantemente se destacando no cenário da piscicultura. Entretanto o Rio Grande do Sul (RS) não possui um levantamento de dados de produção (unidades produtoras de alevinos, disponibilidade e demanda de alevinos, assistência técnica prestada aos produtores, condições de cultivo, número e origem dos reprodutores das principais espécies de peixes produzidas no estado). Entretanto, o jundiá (*Rhamdia sp.*) vem sendo considerado como espécie promissora para produção na região Sul do Brasil, não somente pelas vantagens zootécnicas, mas também pelas pesquisas e experimentos realizados. Uma espécie recentemente adotada pelos pesquisadores, poucas são as informações disponíveis na área da genética para essa espécie de peixe. O objetivo deste estudo baseia-se em dois eixos, primeiramente mapear produtores e levantar informações sobre a produção do estado do RS e posteriormente desenvolver marcadores moleculares para a espécie nativa com maior potencial para produção, o jundiá. Em um primeiro momento foi elaborado um questionário composto por questões abertas e questões do tipo fechadas. O questionário foi proposto a dezesseis produtores de alevinos do estado do RS entre os meses de setembro de 2011 e Fevereiro de 2012. A análise dos resultados mostra que os alevinos de jundiá e carpa capim (*Ctenopharigodon idella*) são os mais produzidos pelas unidades produtoras de alevinos visitadas. Evidenciou-se ainda que a produção de alevinos é um importante elo da cadeia produtiva da piscicultura do estado do RS, gerando renda e emprego. Verificou-se que muitos empreendimentos apresentam falhas na gestão e manejo empregados na qualidade de água e reprodução, o que reforça a implementação de trabalhos em conjunto entre produtores, instituições de pesquisa, extensão e fomento; visando difundir entre os produtores a importância do monitoramento e controle dos

parâmetros de qualidade de água; desenvolver programas de melhoramento genético; tecnologias de planejamento e gestão que busquem a redução dos custos de produção e considerem a realidade local dos empreendimentos. Em um segundo momento, uma biblioteca shotgun paired-end foi preparada a partir de DNA genômico de jundiá. O sequenciamento da biblioteca foi conduzida em um sequenciador HiSeq (Illumina) com leituras paired-end de 100 pares de bases e agrupada com outras espécies. A partir de uma única corrida cinco milhões de leituras obtidas foram analisadas com o programa PAL\_FINDER\_v0.02.03. Para cada loci um dos *primers* teve a incorporação da sequência M13 e um grupo de doze loci foi escolhido e amplificado para posterior obtenção dos fragmentos microssatélites. Do total das leituras obtidas, 6.331 loci microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs) foram encontrados, dos quais 4.755 eram dinucleotídeo, 728 trinucleotídeo, 729 tetranucleotídeo, 117 pentanucleotídeo e 2 eram hexanucleotídeo. Os doze loci microssatélites escolhidos para amplificação foram sequenciados. O conhecimento dos microssatélite desenvolvidos se deu através de sequenciamento pelo método de Sanger, com fragmentos entre 140 e 200pb. Entretanto, somente seis loci tiveram resultados satisfatórios e apresentaram-se polimórficos. Contudo, podemos definir que a estratégia de sequenciamento através de biblioteca shotgun paired-end da plataforma HiSeq (Illumina) apresentou-se eficaz, além de ser rápida e de baixo custo para desenvolver marcadores microssatélites para espécies não modelo como o jundiá.

Palavras-chave: jundiá, cadeia produtiva, NGS e microssatélite.

## Abstract

RODRIGUES, Marília Danyelle Nunes. **Mapping of Laboratórios fingerlings the state of Rio Grande do Sul and Development of Molecular Markers for catfish (*Rhamdia sp.*)**. 2013. 120 sheets. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Agribusiness is fundamental for the Brazilian economy and the southern region of the country has steadily been increasing in fish farming scenario. However Rio Grande do Sul (RS) does not have a survey of production data (production units fingerlings, availability and demand for fingerlings, technical assistance to producers, cultivation conditions, number and origin of the breeding of the main species of fish produced state). However, the catfish (*Ramdia quelen*) has been considered as promising species for production in southern Brazil, not only the productivity advantages, but also by research and experiments. A species recently adopted by the researchers, there is little information available in genetics for this species of fish. This study is based on two axes, first map producers and collect information about the production of RS and subsequently develop molecular markers for native species with the highest potential for production, catfish. At first a questionnaire consisting of open questions and closed questions of the type was developed. The questionnaire was proposed to sixteen producers of fingerlings of RS between the months of September 2011 and February 2012. The analysis shows that silver catfish fingerlings and grass carp (*Ctenopharigodon idella*) are the most produced by mills of visits fingerlings. It was evident also that the production of fingerlings is an important link in the production chain of fish farming in the state of RS, generating income and employment. It was found that many enterprises had failures in the management and employees in the management of water quality and reproduction, which reinforces the implementation of collaborative efforts between manufacturers, research institutions, extension and promotion, in order to disseminate among producers the importance of monitoring and control of water quality parameters; develop breeding

programs, planning and management technologies that seek to reduce production costs and consider the local situation of the enterprises. In a second moment, a shotgun paired-end library was prepared from genomic DNA of catfish. The sequencing was carried out on a library HiSeq sequencer (Illumina) with paired-end reads of 100 base pairs and grouped with other species. From a single race five million readings obtained were analyzed with the program PAL\_FINDER\_v0.02.03. Each of the primers had loci embedding sequence M13 and a group of twelve loci and was chosen for further amplified microsatellite fragments obtained. Of all readings obtained, 6.331 microsatellite loci potentially amplifiable (PALs) were found, of which 4.755 were dinucleotide, 728 trinucleotide, 729 tetranucleotide, 117 pentanucleotídeo and 2 were hexanucleotídeo. The twelve microsatellite loci selected for amplification were sequenced. The knowledge developed microsatellite was through sequencing by the Sanger method, with fragments between 140 and 200bp. However, only six loci had satisfactory results and displayed polymorphism. However, we can define the shotgun paired-end HiSeq platform (Illumina) sequencing strategy through effective library is presented, as well as being quick and inexpensive to develop microsatellite markers for species not model like the catfish.

Key words: catfish, production chain NGS and microsatellites.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Questionário proposto pelo Grupo de Pesquisa AQUAM para identificação dos laboratórios produtores de alevinos no estado do Rio Grande do Sul.....	30
Figura 2 - Produção Mundial da Aquicultura por Região em 2010 .....	39
Figura 3 - Produção da Pesca e Aquicultura no Brasil .....	40
Figura 4 - Produção do Pescado da Aquicultura Continental triênio 2008-2010 .....	41
Figura 5 - Produção de Pescado da Aquicultura Continental por Unidade de Federação .....	42
Figura 6 - Produção de jundiá na Região Sul País (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina) nos anos de 2008, 2009 e 2010 .....	43
Figura 7 - Exemplar de um reprodutor de jundiá ( <i>Rhamdia sp</i> ) .....	45
Figura 8 - Desenvolvimento embrionário em jundiá ( <i>Rhamdia sp</i> ) .....	47
Figura 9 - Desenvolvimento larval em jundiá ( <i>Rhamdia sp.</i> ) .....	48
<b>Artigo 1 - Submetido à revista Organizações Rurais &amp; Agroindustriais</b>	
Figura 1 - Distribuição geográfica das unidades produtoras de alevinos do estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011 .....	64
Figura 2 - Grau de escolaridade dos produtores de alevinos entrevistados dos estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011. ....	69
Figura 3 - Oriegm da água utilizada nas UPAs no estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011 .....	70
Figura 4 - Incidência de doenças nas unidades produtoras de alevinos consultadas no estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011.....	71
Figura 5 - Principais destinos dos alevinos produzidos nas UPAs do estado do Rio Grande do Sul em 2011/2011.....	80
<b>Artigo 2 - Submetido à revista Neotropical Ichthyology</b>	
Figura 1 - Loci potencialmente amplificáveis microsatélites em jundiá ( <i>Rhamdia sp.</i> ) de acordo com o tamanho do motivo. Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb) .....	92

Figura 2 - Motivos SSR mais comuns de dinucleotídeos (2 di) em <i>Rhamdia sp.</i> . Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb) .....	93
Figura 3 - Motivos SSR mais comuns de trinucleotídeos (3 tri) em <i>Rhamdia sp.</i> . Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb). .....	94
Figura 4 - Motivos SSR mais comuns de tetranucleotídeos (4 tetra) em <i>Rhamdia sp.</i> . Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb) .....	95
Figura 5 - Motivos SSR mais comuns de pentanucleotídeos (5 penta) em <i>Rhamdia sp.</i> . Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb) .....	96
Figura 6 - Motivos SSR mais comuns de hexanucleotídeos (6 hexa) em <i>Rhamdia sp.</i> . Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb) .....	96
Figura 7 - Amplificações de microssatélites tetranucleotídeos desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> , visualização em gel de agarose 1%. Microssatélites obtidos a partir de resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb)	98
Figura 8 - Amplificações de microssatélites dinucleotídeos desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> , visualização em gel de agarose 1%. Microssatélites obtidos a partir de resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb)	98
Figura 9 - Sequências de tetranucleotídeos obtidas por sequenciamento do tipo Sanger a partir de loci microssatélites desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> (jundiá) através de sequenciamento de próxima geração .....	100
Figura 10 - Sequência de dinucleotídeo obtida por sequenciamento do tipo Sanger a partir de loci microssatélites desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> (jundiá) através de sequenciamento de próxima geração .....	101
Figura 11 - Locus Rq 51373. Sequência de tetranucleotídeo obtidas por sequenciamento do tipo Sanger a partir de loci microssatélites desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> (jundiá) através de sequenciamento de próxima geração .....	101
Figura 12 - Padrões de bandas dos loci microssatélites desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> (jundiá). Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata. Marcador de 10pb; Marcador de 100pb; Padrões de bandas dos diferentes loci microssatélites (01 a 10) .....	102

## LISTA DE TABELAS

### **Artigo 1 - Submetido à revista Organizações Rurais & Agroindustriais**

Tabela 1 - Municípios do estado do Rio Grande do Sul que possuem unidades produtoras de alevinos – UPAs, safra 2010/2011. ....	63
Tabela 2 - Indicadores das instalações e equipamentos das UPAs do estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011 .....	67
Tabela 3 - Número total de reprodutores e matrizes/espécie, número de peixes induzidos/espécie na safra 2010/2011 e porcentagem de animais induzidos/espécie das UPAs no estado do Rio Grande do Sul .....	73
Tabela 4 - Espécies produzidas, estimativa de unidades de alevinos produzidos/espécie (Uni), porcentagem de produção de alevinos/espécie, preço médio do milheiro (R\$) e desvio padrão (R\$±) da safra 2010/2011 no estado do Rio Grande do Sul .....	77

### **Artigo 2 - Submetido à revista Neotropical Ichthyology**

Tabela 5 - Primers microssatélites desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> (jundiá), através do Programa Primer3 (versão 2.0.0) .....	99
Tabela 6 - Caracterização genética dos cinco loci microssatélites desenvolvidos para <i>Rhamdia sp.</i> (jundiá) em seis populações .....	103

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
2. Projeto de Pesquisa.....	22
2.1 Introdução .....	23
2.2 Qualificação do principal problema a ser abordado .....	23
2.3 Espécie abordada como modelo: Rhamdia sp. (jundiá).....	25
2.4 Objetivos .....	26
2.5 Metas a serem alcançadas .....	27
2.6 Metodologia a ser empregada.....	27
2.6.1 Obtenção das informações dos laboratórios de produção de alevinos: .....	27
2.6.2 Análise dos dados .....	30
2.6.3 Identificação visual .....	30
2.6.4 Avaliação genética dos plantéis .....	30
2.7 Plano de trabalho para cada bolsista detalhando as atividades desenvolvidas por este dentro do projeto .....	32
2.8 Principais contribuições científicas, tecnológicas e de inovação da proposta..	32
2.9 Orçamento detalhado.....	33
2.10 Cronograma físico-financeiro .....	34
2.11 Identificação dos participantes e colaboradores do projeto.....	35
2.12. Indicação de colaborações ou parcerias já estabelecidas com outros centros de pesquisa na área.....	36
3. Revisão da Literatura.....	39
3.1 Aquicultura mundial.....	39
3.1.1 Aquicultura no Brasil .....	40
3.1.2 Aquicultura no Rio Grande do Sul.....	42



3.1.2.1	Produção de Jundiá no RS .....	42
3.2	Biologia do Jundiá ( <i>Rhamdia</i> sp.) .....	44
3.2.1	Biologia reprodutiva .....	45
3.2.2	Patologias .....	48
3.2.3	Nutrição e Hábito alimentar .....	50
3.2.4	Genética .....	51
3.3	Marcadores Moleculares .....	53
3.3.1	Sequenciamento de próxima geração .....	55
3.3.2	Genética de populações.....	57
4.	Artigo Submetido à revista Ciência Rural .....	59
	Caracterização das Unidades Produtoras de Alevinos do Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.....	59
1	Introdução .....	61
2	Material e Métodos.....	61
3	Resultados e Discussão.....	62
3.1	Levantamento e distribuição geográfica das UPAs.....	62
3.2	Instalações, mão de obra e equipamentos das UPAs .....	64
3.3	Grau de escolaridade dos piscicultores .....	68
3.4	Origem e monitoramento qualidade da água nas UPAs .....	69
3.5	Incidência de doenças nas UPAs .....	71
3.6	Manejo reprodutivo e plantel de reprodutores e matrizes .....	72
3.7	Larvicultura e alevinagem .....	74
3.8	Produção e comercialização de alevinos.....	76
4	Conclusões .....	80
5	Referências Bibliográficas.....	81
5.	Artigo Submetido à revista Neotropical Ichthyology .....	85
	Desenvolvimento de marcadores microssatélites para uso no melhoramento genético de jundiá, <i>Rhamdia</i> sp. (Quoy & Gaimard, Pimelodidae) .....	85

Introdução .....	86
Materiais e Métodos.....	88
Animais e isolamento do DNA .....	88
Preparação da biblioteca genômica.....	88
Desenho dos primers.....	89
PCR e Amplificações SSR.....	89
Resultados e Discussão.....	90
Conclusão .....	104
Referências Bibliográficas.....	104
6. Conclusões.....	109
7. Referências Bibliográficas.....	110

## 1. Introdução

A contribuição da aquicultura aos estoques de suprimento para o mundo continua crescendo. Segundo dados da FAO – “*Food and Agriculture Organization of United Nations*” (2012), o crescimento observado do ano de 2010 foi de 7,5% em relação a 2009.

No Brasil, a produção aquícola continental também teve um crescimento substancial no triênio 2008 - 2010, com a produção cerca de 40% maior durante este período e representando 82,3% da produção total nacional (Brasil, 2012).

A piscicultura vem crescendo graças a incentivos governamentais, tais como a criação do Ministério da Pesca e Aquicultura, Lei nº 11.958; Lei da Pesca – Lei nº 11.959; Resolução Conama - nº413; levando assim a criação da EMBRAPA Aquicultura e Pesca em 2009. O governo Federal, implementou diversas ações oriundas da política de desenvolvimento do setor, e com isso, o país está aumentando a produção aquícola.

O projeto AQUABRASIL foi criado em 2007 pela EMBRAPA Pantanal, que é um órgão do governo Federal, com o objetivo de desenvolver informações e tecnologias adaptadas às condições locais para melhorar o desempenho da aquicultura no país. Este projeto utiliza como objetos de pesquisa as espécies camarão marinho, *Litopenaeus vannamei*; a Tilápia, *Oreochromis niloticus*; o tambaqui, *Colossoma macropomum* e o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*. Abordam fatores como de melhoramento genético, nutrição e alimentação, biossegurança e sanidade, manejo e gestão ambiental dos sistemas de produção e aproveitamento agroindustrial num enfoque integrado de pesquisa em rede.

Os dados da produção nacional de pescado da aquicultura continental, demonstrou que o estado do Rio Grande do Sul (RS) continua sendo o maior produtor de pescado do país, participando com 55.066,4 toneladas (Brasil, 2012).

Contudo, apesar do cenário auspicioso, o Rio Grande do Sul não possui um levantamento ou dados consistentes sobre as unidades produtoras de alevinos, disponibilidade e demanda; assim como, informações sobre a assistência técnica prestada aos produtores, condições de cultivo, número e origem dos reprodutores

das principais espécies de peixes produzidas no estado.

Traçar estratégias, diagnosticar possíveis problemas e apontar soluções para o setor, requer informações consistentes. A assistência técnica especializada, manejo adequado dos reprodutores e disponibilidade de alevinos são etapas a serem cumpridas, para uma produção eficiente e competitiva no estado do RS.

As espécies mais cultivadas na ordem de importância econômica são: em primeiro lugar as variedades de carpas; carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), carpa húngara (*Cyprinus carpio*), carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e carpa cabeça grande (*Aristichthys nobilis*); tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*); pacu (*Piaractus mesopotamicus*); e jundiá (*Rhamdia sp.*) (Brasil, 2012).

Entretanto, o RS possui espécies nativas com grande potencial para produção. O jundiá é uma espécie nativa promissora para região Sul do país. Conforme dados do Brasil (2012), a produção total de jundiá na região Sul do país foi de 1.274 toneladas em 2010, com uma tendência crescente pelo cultivo reconhecida por pesquisadores e técnicos da EPAGRI-SC, EMATER-RS, UFPel e UFRGS.

Graças ao esforço da pesquisa juntamente com órgãos governamentais e produtores, vem aumentando a produção e a comercialização do jundiá no RS e nos demais estados no qual o jundiá é nativo (Auozeni, 2013).

O desenvolvimento de biotécnicas de reprodução, fisiologia e nutrição apresenta-se como uma alavanca na produção de alevinos de espécies nativas, entretanto, ainda não é o suficiente para que se determine as espécies em potencial para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético (Oliveira *et al.*, 2013).

Para implementação de um programa de melhoramento para jundiá, algumas considerações importante podem ser apontadas, a partir de dados experimentais dos programas de melhoramento com outras espécies nativas:

- População base: a primeira fase de implantação do programa, considera-se que não haja parentesco entre os indivíduos. Para jundiá, é importante que os animais que serão utilizados como primeiros reprodutores do programa de melhoramento sejam provenientes de diferentes regiões (do estado ou do país). É importante que seja elevada a variabilidade genética entre os animais, o qual esta variabilidade pode ser aferida através da utilização de marcadores moleculares, uma

das metodologias mais indicadas são marcadores microssatélites. E a partir dos resultados de variabilidade genética é possível indicar o acasalamento dos primeiros reprodutores.

- Organização dos acasalamentos: é importante definir a forma como os animais serão acasalados. Para jundiá pode-se utilizar, hierárquico (um macho/fêmea com um grupo exclusivo de fêmeas/macho); fatoriais (acasalamentos de todos os machos com todas as fêmeas); subconjuntos fatoriais (pequenos grupos com as mesmas características do sistema fatorial); e simples (um macho para cada fêmea). Os sistemas apresentam vantagens e desvantagens, entretanto, os subconjuntos fatoriais e sistemas hierárquicos são as melhores opções, necessitam de estruturas simples e permitem a exploração dos resultados elevados por longo período de tempo (Oliveira *et al.*, 2013).

- Formação das famílias: a determinação do número de famílias está ligado a escolha do sistema de acasalamento; no caso do sistema de fatoriais o número de famílias é determinado pela multiplicação do número de reprodutores, por exemplo em um sistema fatorial com 40 machos e 45 fêmeas o número de famílias resultante pode ser de 1.800 se todas as combinações gerarem descendentes.

- Identificação: é importante que cada reprodutor utilizado seja identificado individualmente, permitindo o acompanhamento das respectivas progênes, as quais devem ser mantidas de forma isolada das demais para posterior identificação. A identificação é realizada através de PIT-tags "*passive integrated transponder*", microchips que são implantados na musculatura dorsal ou na cavidade visceral. Após a identificação, os representantes das diferentes famílias podem ser mantidos juntos. O sistema deve ser seguro, único, permanente, e de fácil visualização (Oliveira *et al.*, 2013).

- Avaliação do desempenho: o objetivo é identificar os animais de melhores desempenhos e selecioná-los como pais para próxima geração. Durante este período realiza-se medições das características utilizadas como critério para seleção (altura do corpo, largura do corpo, tamanho da cabeça, largura da cabeça, peso, etc) (Oliveira *et al.*, 2013). A partir desses critérios é possível identificar os caracteres associados genética e/ou fenotipicamente com o critério de seleção. É necessário que sejam realizadas pelo menos duas medições, a primeira na identificação dos animais e a segunda no final do período de cultivo. Um banco de dados é gerado com as informações individuais de desempenho, além de informações genealógicas,

idade, sexo, local e ano de cultivo; a partir desse banco de dados, as informações são processadas para posterior avaliação genética dos indivíduos.

- Avaliação genética: é caracterizado pela estimação do mérito genético dos indivíduos que estão sendo avaliados. É necessário estimar os componentes de variância e parâmetros genéticos das características utilizadas como critérios de seleção sob a população de peixes que está sendo avaliado o desempenho (Oliveira *et al.*, 2013).

Inicialmente, técnicas de biologia molecular estão sendo desenvolvidas para jundiá com o objetivo de disponibilizar dados que auxiliem na construção de um pacote tecnológico para a espécie. Tais técnicas incluem a criação de bibliotecas de loci microssatélites, atualmente conhecidos como sequenciamento de próxima geração (NGS - Next Generation Sequencers), um método eficiente e de baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuem dados disponíveis (Buschiazzo e Gemmell, 2006).

Esta nova tecnologia conduz para substituição de protocolos convencionais de isolamento de microssatélites (Abdelkrim *et al.*, 2009), e existem cada vez mais relatos empregando marcadores microssatélites NGS em estudos de espécies não modelos (Saarinen e Austin, 2010; Yu *et al.*, 2011). Para jundiá como espécie nativa e promissora, o desenvolvimento de marcadores microssatélites poderá disponibilizar dados em grande escala, possibilitando o avanço de pesquisas para a espécie.

## **2. Projeto de Pesquisa**

**EDITAL MCT/CNPq/CT-AGRONEGÓCIO/MPA N° 025/2010 – FORMAÇÃO DE RECURSOS HUMANOS EM PESCA E AQUICULTURA**

### **Chamada 1 - Aquicultura**

#### **Identificação da Proposta:**

**MAPEAMENTO E LEVANTAMENTO DOS LABORATÓRIOS PRODUTORES DE ALEVINOS E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DOS PLANTÉIS DE REPRODUTORES DE JUNDIÁ (*Rhamdia sp.*) DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

#### **Linhas temáticas:**

- Genética;
- Sistemas de Manejo e Cultivo (reprodução, larvicultura e engorda);
- Estudos socioeconômicos das cadeias produtivas da Aquicultura.

## **2.1 Introdução**

Atualmente, produzir alimentos está se tornando uma tarefa cada vez mais difícil, principalmente, no que diz respeito ao gerenciamento. Com isso, os pequenos empresários rurais são forçados a ampliarem sua capacitação e habilidades gerenciais na tentativa de aumentarem a competitividade dos negócios. O planejamento estratégico corresponde ao estabelecimento de um conjunto de decisões a serem tomadas pelo administrador para uma situação na qual o futuro tende a ser diferente do passado, assim o planejamento não diz respeito às decisões futuras, mas às implicações futuras de decisões tomadas no presente (Oliveira *et al.*, 2006).

A piscicultura pode ser uma alavanca de desenvolvimento social e econômico, possibilitando o aproveitamento efetivo dos recursos naturais locais, principalmente os hídricos e a criação de postos de trabalhos assalariados. Entretanto, existem inúmeras variáveis que condicionam ou afetam o sucesso de um empreendimento rural, como planejamento, gestão e conhecimento técnico. Na piscicultura nacional os estudos de planejamento estratégico e gerenciamento ainda são incipientes e restritos, principalmente na área da reprodução e manejo de plantéis de reprodutores.

Todo empreendimento possui implícito ou explicitamente: missão, objetivos, metas e estratégias. Na escolha das estratégias é fundamental explorar as potencialidades e experiências. Contudo, as decisões estratégicas não devem ser tomadas apenas baseadas na vocação ou experiência, mas sim com base em dados e informações obtidos a partir de estudos e da prática do setor onde se atua, para que obtenha-se resultados desejáveis (Oliveira *et al.*, 2006).

## **2.2 Qualificação do principal problema a ser abordado**

O estado do Rio Grande do Sul não possui disponível um levantamento ou dados consistentes sobre os laboratórios de produção de alevinos, disponibilidade e demanda de alevinos, assim como informações sobre a assistência técnica prestada



aos produtores, condições de cultivo, número, caracterização genética e origem dos reprodutores das principais espécies peixes produzidas no estado. Estas informações são relevantes para que se possa traçar estratégias, diagnosticarem possíveis problemas e apontar soluções para o setor. A assistência técnica especializada, manejo adequado dos reprodutores e disponibilidade de alevinos são etapas a serem cumpridas, para uma produção de qualidade e competitiva.

Segundo os Empreendimentos de Assistência Técnica de Extensão Rural (EMATER-RS) e a Associação Sulina de Crédito de Assistência Rural (ASCAR) (2006), um sério problema da piscicultura gaúcha é falta de conhecimento técnico, fazendo com que muitas pisciculturas apresentem instalações e manejo inadequados tanto do ponto de vista produtivo como ambiental. Outro fator agravante, ressaltado pela mesma referência, diz respeito à política equivocada de algumas prefeituras, governo estadual e federal durante a década de 80, na tentativa de fomentar a piscicultura, através de construções de tanques e estações de piscicultura sem critérios técnicos e ambientais.

### *2.2.1 Breve panorama da piscicultura gaúcha*

A produção aquícola brasileira vem apresentando crescimento significativo nos últimos anos. Em 2007 a produção da aquicultura nacional foi de 288.217 toneladas, saltando para 415.649 toneladas em 2009, o que representa um crescimento na ordem de 43,8% (Brasil, 2010), sendo a piscicultura de água doce responsável por 81,16% deste total.

No Estado do Rio Grande do Sul (RS) a piscicultura também tem demonstrado crescimento, passando de 23.779,0 para 47.532,7 toneladas entre 2007 e 2009 (Brasil, 2010). Quase a totalidade dessa produção é baseada no cultivo de espécies exóticas de peixes. Segundo dados do IBAMA, 90% da produção da piscicultura no Rio Grande do Sul em 2007 foi representada pelas diversas espécies de carpas (*Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis*), cultivadas principalmente em sistemas de policultivo. O jundiá (*Rhamdia sp.*) é a espécie nativa com produção (358 t) de maior representatividade no estado (IBAMA, 2007).

Para que o setor da piscicultura desenvolva ainda mais no Rio Grande do Sul é fundamental que haja disponibilidade de “sementes”, ou seja, alevinos de boa

procedência para serem cultivados e comercializados. No contexto atual da piscicultura gaúcha, observa-se que muitas vezes os laboratórios de produção de alevinos não possuem qualquer tipo de planejamento, gestão ou até mesmo assessoria técnica, desta forma os insucessos dos empreendimentos são frequentes. Desestimulando a atividade e interferindo diretamente na cadeia produtiva das espécies nativas produzidas no estado, deixando-a enfraquecida, diante da piscicultura de outros estados e pescados importados como o Salmão (*Salmo salar*) e Bacalhau (*Gadus morhua*). Melhorar os resultados zootécnicos dos peixes nativos assim como gerenciamento de sua cadeia produtiva são os atuais desafios da piscicultura gaúcha.

### **2.3 Espécie abordada como modelo: *Rhamdia* sp. (jundiá)**

Espécie nativa do estado do Rio Grande do Sul com significativa importância o jundiá (*Ramdia quelen*), possui grande interesse econômico para pesca artesanal, sendo a segunda espécie nativa mais capturada no estado do Rio Grande do Sul no ano de 2005, com 395 toneladas (IBAMA). A exemplo de várias espécies nativas do estado, sua produção pesqueira também sofreu forte queda nos últimos anos (Baldisserotto, 2009), fato que justifica a sua produção em cativeiro. Inúmeros pesquisadores recomendam sua produção, considerando a espécie nativa mais promissora para produção intensiva no estado, devido a características como: facilidade em adaptar-se a diferentes ambientes, condições climáticas e dietas artificiais, apresentando fácil manejo e boa aceitação comercial (Baldisserotto, 2004).

Embora o Jundiá apresente grande importância para a piscicultura no Rio Grande do Sul, há poucas informações e dados disponíveis sobre a sua produção no estado, sendo necessário um levantamento de dados principalmente a respeito das condições atuais dos plantéis de reprodutores da espécie além de informações sobre os laboratórios de produção de alevinos entre outras informações, que são necessárias para o planejamento e gerenciamento da cadeia produtiva da espécie.

No Rio Grande do Sul é comum a obtenção de alevinos e reprodutores de pisciculturas de outras regiões do Brasil (Baldisserotto, 2009). Esta prática a médio e

longo prazo poderá proporcionar maus resultados, pois além dos exemplares não estarem adaptados as baixas temperaturas do inverno do estado, há sempre possibilidade de ocorrer cruzamentos entre reprodutores trazidos de outras regiões do país com exemplares obtidos de bacias hidrográficas gaúchas, o que poderia levar a perda das características genéticas e fenotípicas das espécies nativas aqui encontradas.

Nenhum estudo ou levantamento sobre as características genéticas dos plantéis de reprodutores de jundiá (*R. quelen*) no Rio grande do Sul, foi realizado até então, desconhecendo-se o grau de homozigoses ou mesmo como são montados os cruzamento dos reprodutores. Assim faz se necessário um estudo nesse sentido, para que estratégias e medidas, como obtenção de reprodutores de procedência de bacias hidrográficas das mesmas regiões onde as pisciculturas estão localizadas e até mesmo a restrição da entrada de exemplares de outros estados possam ser planejadas.

## **2.4 Objetivos**

- Mapear e levantar os laboratórios de produção de alevinos de peixes de água doce do estado do Rio Grande do Sul;
- Agrupar informações sobre as condições das instalações dos laboratórios de produção alevinos de peixes de água doce do estado do Rio Grande do Sul e as práticas de manejo utilizadas na produção de alevinos e reprodutores;
- Obter informações sobre disponibilidade e demanda de alevinos das espécies produzidas no estado do Rio Grande do Sul;
- Reunir os índices de produtividade dos laboratórios de produção alevinos de peixes de água doce do estado do Rio Grande do Sul;
- Obter informações quanto à origem, idade e manejo sobre os plantéis de reprodutores das espécies de peixes produzidas no estado do Rio Grande do Sul;

- Caracterizar geneticamente os plantéis de reprodutores de jundiá (*Rhamdia sp.*) do estado do Rio Grande do sul, a partir do banco genético depositado na UFPel;

- Obter informações sobre a assistência técnica especializada, planejamento e gerenciamento prestados aos produtores de alevinos do estado do Rio Grande do Sul;

## **2.5 Metas a serem alcançadas**

- Diagnosticar possíveis problemas do setor de produção de alevinos estado do Rio Grande do Sul;

- Reunir informações sobre o setor de produção de alevinos estado do Rio Grande do Sul para traçar um planejamento estratégico a médio e longo prazo;

- Sugerir um plano de manejo para os plantéis de reprodutores das principais espécies de peixes produzidas no estado do Rio Grande do Sul;

- Propor um modelo de gerenciamento para os laboratórios de produção de alevinos do estado do Rio Grande do Sul;

- Confeccionar uma cartilha destinada aos produtores de alevinos estado do Rio Grande do Sul sobre as Boas Práticas de Manejo na Propagação Artificial de Peixes;

- Montar um mapa genético dos planteis de reprodutores de *R. quelen* no estado do Rio Grande do Sul.

## **2.6 Metodologia a ser empregada**

### *2.6.1 Obtenção das informações dos laboratórios de produção de alevinos:*

Para sistematizar a obtenção das informações, a equipe do *Aquam*, buscará junto a EMATER/ASCAR - RS, SEBRAE - RS, prefeituras e associações ou cooperativas de piscicultores do estado do Rio Grande do Sul. A partir da obtenção

destas informações, os bolsistas irão até os produtores identificados e aplicarão um questionário (Figura 1) elaborado para compor um banco de informações, para posterior detalhamento.

<b>Questionário – Levantamento de Laboratórios de produção de Alevinos do Estado do Rio Grande do Sul</b>		
<b>Informações básicas do empreendimento:</b>		
Cidade onde localiza-se o laboratório:		
Área da propriedade:		
Piscicultura é a principal atividade?	Sim ( )	Não( )
Nível de escolaridade do produtor:		
Quantos funcionários a propriedade possui?		
Custo mensal com folha de pagamento:		
Custo mensal com energia elétrica:		
Qual é a outra atividade da propriedade?		
Há quantos anos produzem alevinos?		
Faz terminação/engorda?	Sim ( )	Não( )
<b>Assistência técnica prestada</b>		
Possui assistência técnica na propriedade?	Sim ( )	Não( )
Sabe informar a formação técnica do profissional?	Sim ( )	Não( )
Recebe assistência técnica de alguma entidade?	Sim ( )	Não( )
Qual entidade?		
Está satisfeito com a assistência?	Sim ( )	Não( )
<b>Viveiros da propriedade</b>		
Possui quarentenário na propriedade?	Sim ( )	Não( )
Nº de viveiros da propriedade:		
Nº de viveiros utilizados para alevinagem:		
Área média dos viveiros:		
Nº de viveiros utilizados para reprodutores:		
Área média dos viveiros:		
Área total de lâmina d'água na propriedade:		
Profundidade média dos viveiros:		
Todos os viveiros possuem monge?	Sim ( )	Não( )
<b>Água utilizada no empreendimento</b>		
Origem da água utilizada nos viveiros?		
Origem da água utilizada no laboratório?		
Monitora a água através de alguma análise?	Sim ( )	Não( )
Qual análise e frequência?		
Quais parâmetros são avaliados?		
Os viveiros possuem aeradores? Nº de aeradores	Sim ( )	Não( )
Destino da água dos viveiros e laboratório?		
<b>Sanidade da água dos viveiros e laboratório</b>		
Possui problema com doença nos animais?	Sim ( )	Não( )
Qual? Em que fase? Alevinagem ou reprodutores e em qual espécie?		
Utiliza algum tratamento, qual?	Sim ( )	Não( )
É prescrito por algum profissional? Qual?	Sim ( )	Não( )
O tratamento é eficiente?	Sim ( )	Não( )
<b>Plantéis de reprodutores</b>		
Nº de espécies produzida?		
Quais?		
Qual o nº de reprodutores da propriedade?		
Qual o nº de reprodutores de cada espécie?		
Conhece a origem dos reprodutores?		
Adquiri reprodutores de outras regiões do estado?		
Adquiri reprodutores de fora do estado?		
Repõem com que frequência os reprodutores?		
Como adquiri reprodutores?		
Qual a densidade de estocagem utilizada?		
Utiliza densidades diferentes para espécies diferentes?		
Qual a taxa de arraçoamento fora do período reprodutivo?		

Qual a taxa de arraçamento no período reprodutivo?	
Utiliza alguma dieta natural? Qual? Para qual espécie?	
Granulometria da ração (mm):	
Qual a porcentagem de proteína bruta da ração?	
Qual a porcentagem de lipídios da ração?	
Quantidade de energia da ração?	
Custo mensal da ração para os reprodutores?	
<b>Critérios que utiliza para selecionar os reprodutores</b>	
Critérios para os machos:	
Critérios para as fêmeas:	
Utiliza critérios diferentes para espécies diferentes?	Sim ( ) Não( )
Sabe informar o n° de reprodutores utilizado por safra?	
<b>Laboratório de reprodução</b>	
Área do laboratório (m <sup>2</sup> ):	
N° de aquários ou tanques de indução e volume (L):	
N° de incubadoras e volume (L):	
Qual vazão das incubadoras (L/min)?	
Qual a quantidade de ovos que utiliza por incubadora?	
Monitora taxa de fertilização e eclosão?	Sim ( ) Não( )
Possui lupa ou microscópio?	Sim ( ) Não( )
<b>Tipo de protocolo de indução</b>	
Dosagem de hormônio utilizada:	
Quantas aplicações na fêmea/macho?	
Utiliza protocolo diferente para espécies diferentes?	Sim ( ) Não( )
Quais espécies?	
Como homogeneiza o hormônio a ser aplicado?	
Quantidade de hormônio utilizado por safra?	
Custo com hormônio por safra?	
Utiliza sistema semi-natural para reprodução?	Sim ( ) Não( )
Para quais espécies?	
<b>Larvicultura e alevinagem</b>	
Qual tempo de permanência das pós-larvas nas incubadoras?	
Alimenta as pós-larvas nas incubadoras?	Sim ( ) Não( )
Qual espécie e tipo de dieta ou alimento?	
Qual a densidade de estocagem utilizada na larvicultura?	
Utiliza calagem nos viveiros em qual proporção?	Sim ( ) Não( )
Utiliza adubação nos viveiros em qual proporção?	Sim ( ) Não( )
Qual tipo de adubação?	
Custo com adubação e calagem por safra:	
Utiliza adubação corretiva?	Sim ( ) Não( )
Utiliza repique e biometria? Qual frequência?	
Taxa de arraçamento na alevinagem:	
Qual a porcentagem de proteína bruta na ração durante a alevinagem?	
Utiliza a mesma ração para espécies de hábitos alimentares diferentes?	
Utiliza dieta natural? Para qual espécie?	Sim ( ) Não( )
Granulometria das rações utilizadas na alevinagem (mm):	
Custo com ração na alevinagem por safra:	
Custo total com alimentação (ração e dieta natural):	
Espécie que mais produz?	
Quantidade de alevinos total que produz por safra:	
Quantidade de alevinos total que produz de cada espécie/safra:	
Principal destino ou comprador:	
Possui veículo e caixas de transporte para entrega dos alevinos?	Sim ( ) Não( )

Preço do milheiro para cada espécie:	
Peso médio final dos alevinos comercializados (g):	
Está satisfeito com o setor de piscicultura no estado?	Sim ( )                      Não( )
Pretende ampliar o empreendimento?	Sim ( )                      Não( )
Principal dificuldade encontrada na atividade?	

Figura 1. Questionário proposto pelo grupo de pesquisa Aquam para identificação dos laboratórios produtores de alevinos no estado do Rio Grande do Sul.

### 2.6.2 Análise dos dados

Após a coleta dos dados, estes serão analisados de forma individualizada por empreendimento e posteriormente para cada região do estado, a fim de diagnosticar possíveis problemas inerentes de cada propriedade e região. O modelo de planejamento e gerenciamento quando for sugerido aos laboratórios de produção de alevinos, será fundamentado em conhecimentos técnicos e científicos das boas práticas de manejo indicadas para laboratórios de produção de alevinos.

### 2.6.3 Identificação visual

A fim de manter registrados os laboratórios que produzem alevinos no estado quanto ao seu panorama geográfico da área implantada, será efetuado registro com fotos, para posterior banco de imagens didático.

### 2.6.4 Avaliação genética dos plantéis

Esta parte do projeto será conduzida com a parceria com a Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Engenharia Genética (LEGA). Análises genéticas dos plantéis amostrados serão realizadas no sentido de avaliar a diversidade intra e inter plantéis. Serão utilizadas amostras de estoques de *Rhamdia sp.* já amostrados e depositados no banco genético do LEGA-UFPEL.

Pisciculturas que produzem alevinos de jundiá, mas que ainda não tiveram nadadeiras coletadas serão também amostradas de forma a expandir as análises de diversidade genética para esta espécie. Para jundiás as amostras poderão ser de nadadeira caudal, conforme autorização CEEA-UFPEL sob o número de registro 7960 e coletadas pelos componentes do LEGA. As amostras de nadadeiras serão preservadas em tubos eppendorfs com etanol a 70% até a extração do DNA.

### *a) Extração de DNA*

Para extração do DNA de nadadeiras será utilizado o protocolo descrito por Bardakci e Skibinski (1994), modificada por Almeida *et al.* (2009). A qualidade da extração será checada em gel de agarose 0,7%, corado com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA).

### *b) Genotipagem dos marcadores de microssatélite*

Para análise da diversidade genética de jundiá serão utilizados o polimorfismo descrito para o primeiro íntron do hormônio do crescimento (Silva *et al.*, 2010) e loci descritos por Perales-Flores *et al.* (2007) para catfish canal (*Ictalurus punctatus*) e outros disponíveis no NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). O controle negativo (reação sem a presença de DNA) será utilizado em cada amplificação para confirmar a ausência de contaminação dos reagentes.

A eficiência da amplificação será verificada através de eletroforese em gel de agarose a 0,7% (w/v) com coloração com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA). Os resultados serão analisados pelo Genescan Analysis Software (Versão 3.1, Perkin-Elmer Corporation, 1998).

### *c) Análise da diversidade genética*

A diversidade genética dentro dos estoques será caracterizada pelas frequências alélicas, heterozigosidade observada ( $H_0$ ), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), número de alelos por locus ( $A$ ) e a porcentagem de locus polimórficos ( $P$ ). A diversidade genética entre os estoques será medida através dos valores de  $F_{ST}$  (variância da frequência alélica) e a consanguinidade intra-estoque pelos valores de  $F_{IS}$ . As estimativas dos índices de fixação de Wright ( $F_{IS}$  e  $F_{ST}$ ) serão obtidas pelo uso do programa ARLEQUIN, "An integrated software package for population genetics data analysis." (Excoffier, 2005). Testes do equilíbrio de HW (Hardy-Weinberg) e desequilíbrio de ligação dentro de cada estoque e em toda a população serão avaliados pelo programa GENEPOP (Rousset, 2008) e/ou ARLEQUIN (Excoffier *et al.* 2005).



## **2.7 Plano de trabalho para cada bolsista detalhando as atividades desenvolvidas por este dentro do projeto**

### *- Bolsistas de Iniciação científica:*

Auxiliaram no levantamento dos dados dos laboratórios produtores de alevinos do estado do Rio grande do sul, aplicando o questionário aos produtores, na coleta e montagem de um banco de imagens dos laboratórios produtores de alevinos e na coleta e processamento do material genético para a caracterização genética dos plantéis de reprodutores de *R. quelen*. Redação de resumos para apresentação no Salão de Iniciação Científica da UFRGS e eventos da área de aquicultura.

### *-Bolsista de Doutorado:*

Responsável pela logística das visitas aos laboratórios produtores de alevinos, acompanhando os bolsistas de iniciação científica nas atividades, além de executá-las e análise dos dados obtidos. Redação de relatórios, resumos e artigos científicos com os dados obtidos.

### *- Bolsista Pós-Doutorado Júnior:*

Coordenação e gerenciamento das atividades e equipe de trabalho, análise dos dados e redação de relatórios, resumos e artigos científicos com os dados obtidos.

Serão realizadas reuniões semanais entre a equipe de trabalho e o coordenador geral do projeto para determinação das atividades a serem realizadas e tomadas de decisões.

## **2.8 Principais contribuições científicas, tecnológicas e de inovação da proposta**

Diagnosticar os laboratórios quanto aos fatores quali-quantitativos de produção de alevinos, além de produzir um modelo de gerenciamento, a partir destes dados e pelo monitoramento genético do plantel de uma espécie de peixe

nativa de suma importância (*Rhamdia sp.*), coloca o estado do Rio Grande do Sul na vanguarda do conhecimento e adoção de estratégia na produção de alevinos no Brasil.

#### *Contribuição científica*

- Produção de no mínimo três artigos para publicação em períodos A2;
- Produção de artigos de vulgarização com os dados do projeto;
- Divulgação dos resultados nos principais eventos científicos da área;
- Dados que serão utilizados em monografias (TCC) e uma Tese de Doutorado;
- Inserção de alunos de graduação na execução do projeto.

#### *Contribuição Tecnológica*

- Desenvolvimento de um modelo de gerenciamento para laboratórios de alevinos;
- Formação de um banco de imagens dos laboratórios de produção de alevinos no estado;
- Mapeamento genético do plantel de reprodutores de *R. quelen*, permitindo assim desenvolver um modelo de cruzamento destes animais no estado, estratégico para a produção desta espécie.

#### *Contribuição Econômica*

- Obtenção de informações, passíveis de serem utilizadas em ações voltadas para a estratégia de desenvolvimento da piscicultura no estado do Rio Grande do Sul, com objetivo de gerar emprego e renda.

## **2.9 Orçamento detalhado**

<b>BOLSAS</b>	<b>DURAÇÃO (MESES)</b>	<b>VALOR (R\$)</b>
3 Bolsas Iniciação científica	24	25.920,00
1 Bolsa Doutorado	36	78.984,00
1 Bolsa Pós-Doutorado Júnior	12	43.200,00
<b>TOTAL</b>		<b>148.104,00</b>

## 2.10 Cronograma físico-financeiro

ATIVIDADES	ANO / SEMESTRES					
	2011		2012		2013	
	1°	2°	1°	2°	1°	2°
Obtenção de informações junto a EMATER, prefeituras, associações, etc	X					
Visita às propriedades	X	X	X	X	X	
Aplicação dos questionários	X	X	X	X	X	
Identificação visual	X	X	X	X	X	
Avaliação genética dos plantéis			X	X	X	
Processamento e análises dos dados			X	X	X	X
Redação e publicação de artigos científicos				X	X	X
Elaboração da cartilha destinada aos produtores de alevinos do RS sobre as Boas Práticas de Manejo na Propagação Artificial de Peixes				X	X	
Formação de recursos humanos (orientação de monografias, Tese e Pós-Doc	X	X	X	X	X	X
Entrega do relatório final						X

## 2.11 Identificação dos participantes e colaboradores do projeto

IDENTIFICAÇÃO	NOME	INSTITUIÇÃO	<a href="http://lattes.cnpq.br/">http://lattes.cnpq.br/</a>
<b>Coordenador</b>	Danilo P. Streit Jr.	<i>Aquam</i> /UFRGS*	6736497090468399
<b>Professores/Pesquisadores</b>	Enefer R. Oberst	<i>Aquam</i> /UFRGS	2320292551906626
	Heden M. Moreira	LEGA/UFpel**	1229541551615355
	Paulo R. S. Lopes	NAQUA/UFP***	7570377776514608
	André R. Ebert	<i>Aquam</i> /UFRGS	7663922699639069
	Bernardo S. Vaz	LEGA/UFpel	068730182241990
<b>Alunos de Doutorado</b>	Nívia Lothhammer	<i>Aquam</i> /UFRGS	0685186822037266
	Fernanda de Mello	<i>Aquam</i> /UFRGS	6923898210567970
	Leandro C. Godoy	<i>Aquam</i> /UFRGS	0814947894209025
<b>Alunos de Mestrado</b>	Luis R. J. Guerreiro	<i>Aquam</i> /UFRGS	545214934208267
	Janaína C. Da Silva	LEGA/UFpel	5764072513732125
	Marília Nunes	LEGA/UFpel	7080477419433012
<b>Apoio técnico</b>	Izani Bonel	LEGA/UFpel	3802256283765513
<b>Alunos de Graduação</b>	Liane Bassini	LEGA/UFpel	2505955337804811
	Diego de Oliveira	<i>Aquam</i> /UFRGS	1629968937015138
	Raquel Mesquita	<i>Aquam</i> /UFRGS	7424827125621621
	Pedro H. Salomão	<i>Aquam</i> /UFRGS	0151724107589765
	Maira N. Corso	<i>Aquam</i> /UFRGS	1978069204181

\*Produção e Conservação da Biodiversidade das Espécies Aquáticas/Universidade Federal do Rio Grande do Sul (*Aquam*/UFRGS);

\*\*Laboratório de Engenharia Genética/Universidade Federal de Pelotas (LEGA/UFpel);

\*\*\* Núcleo de Aquacultura/Universidade Federal do Pampa (NAQUA/UFP).

## **2.12. Indicação de colaborações ou parcerias já estabelecidas com outros centros de pesquisa na área**

- Laboratório de Engenharia Genética/Universidade Federal de Pelotas - LEGA/UFPel.
- Núcleo de Aquicultura/Universidade Federal do Pampa (NAQUA/UFP).

## **2.13 Infra-estrutura de apoio técnico para o desenvolvimento do projeto**

### *- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Aquam*

O setor de Aquicultura do Departamento de Zootecnia está localizado no Laboratório de Ensino Zootécnico - LEZO, do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Agronomia. Conta com uma área de 150 m<sup>2</sup> de alvenaria completa com um escritório e demais dependências. Está equipado para a realização de pesquisa, principalmente na fase de reprodução e larvicultura de peixes. A estrutura física é composta ainda por estufas de plástico 200m<sup>2</sup>. As unidades experimentais são de 10L, 90L e 1000L. Os equipamentos disponíveis no laboratório são: dois microscópicos, dois esteriomicroscópios, oxímetro, phmetro, câmera de captura de imagem, três computadores, quatro botijões de congelação de sêmen, um micro-injetor e outros equipamentos necessários para apoiar os estudos, como vidraria e demais materiais. Ainda conta com o apoio do Laboratório de Nutrição completo.

### *- Universidade Federal de Pelotas - LEGA*

Um laboratório de Biologia Molecular (50 m<sup>2</sup>) com bancadas e armários onde estão os equipamentos. Um laboratório de criação de peixes (50 m<sup>2</sup>) com caixas d'água, bombas, sistema de aquecimento, estantes de aquários com sistema de recirculação de água. 02 termocicladores, 02 sistemas horizontais de eletroforese (cuba + fonte), 02 microcentrifugas, 03 jogos de micropipetas monocanais reguláveis, 01 micropipeta multicanal, 01 Sistema Origens (eletroforese com controle de temperatura e circulação de buffer), 01 transluminador de luz branca e fluorescente, 01 fluxo laminar para preparo de PCR, 01 micro-manipulador, 01 microinjetor, 02 balanças de precisão, 02 pHmetros portáteis, 01 medidor multi-parâmetro (O<sub>2</sub> dissolvido, temperatura, pH, etc.), 02 Freezer vertical, 01 geladeira, 01 Estufa bacteriológica, 01 microscópio Olympus BX41, 01 Estereomicroscópio, 01

Banho termostatzado, 01 vórtex, 01 agitador orbital, 03 microcomputadores com acesso a internet. Além destes equipamentos o Laboratório tem acesso ao uso de Freezer -80 oC, sistema de foto-documentação de géis e sequenciador automático tipo Megabace pertencentes ao Centro de Biotecnologia onde o laboratório LEGA está sediado. Estes laboratórios estão localizados nos prédios 19 e 20 do Campus do Capão do Leão.

- *Universidade Federal do Pampa - NAQUA*

Este laboratório tem 3 tanques de concreto revestido de azulejo para manutenção de matrizes, quatro sistema fechado termo-regulado com biofiltro, com oito unidades experimentais com capacidade individual de 50 litros, totalizando 32 unidades experimentais, para ensaio experimentais em nutrição e produção. Com incubadoras para reprodução de peixes nativos e exóticos, bancada para ensaio com larvas de peixes termo-regulado, sistema fechado.

#### **2.14 Estimativa dos recursos financeiros de outras fontes que serão aportados pelos eventuais agentes públicos e privados parceiros**

A EMATER, prefeituras e associações disponibilizarão as informações para o acesso às pisciculturas. Além disso, os centros de pesquisa parceiros disponibilizarão equipamentos e material humano qualificado para a área em questão.

#### **2.15 Referências bibliográficas**

ALMEIDA, D. B.; SANTOS, A. G.; COSTA, M. A. P.; OLIVEIRA, P. A.; BASSINI, L. N. MOREIRA, C. G. A.; TAVARES, R. A.; MOREIRA, H. L. M. *Utilização de um novo protocolo de extração de DNA em tilápias (Oreochromis niloticus)*. In: XVIII CIC XI ENPOS I Mostra Científica, Pelotas, 20 a 23 de outubro de 2009.

BALDISSEROTTO, B. Freshwater fish culture in Rio Grande do Sul State: actual situation, problems and future perspectives. *Ciência Rural*, v.39, n.1, jan-fev, 2009.

BALDISSEROTTO, B. e RADÜNZ, N. J. *Criação de Jundiá*. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O.F. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. *Heredity*, Oxford, v.73, p. 117-123, 1994.

EMATER/ASCAR. *Diagnóstico da piscicultura (regional Ijuí)*. Ijuí, 2006. 10p. (Boletim técnico).

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, vol.1, p.47-50, 2005.

IBAMA. *Estatística da pesca 2006. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação*. Brasília, 2007.

MPA. Ministério da Pesca e Aquicultura. *Produção Pesqueira e Aquícola – Estatística 2008 e 2009*. 2010.

OLIVEIRA, D. de P. R. *Planejamento estratégico: conceitos, metodologia e práticas*. São Paulo: Atlas, 2006. 303p.

PERALES-FLORES, L.E.; SIFUENTES-RINCÓN, A.M.; LEÓN, F.J.G. Microsatellite variability analysis in farmed catfish (*Ictalurus punctatus*) from Tamaulipas, Mexico. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 30, n.3, p.570-574, 2007.

ROUSSET, F., 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* vol.8, p.103-106, 2008.

SILVA, J. C.; MOREIRA, H. L. M.; VAZ, B. S.; ALMEIDA, D. B.; COSTA, M. A. P., MOREIRA, C. G. A., MANZKE, V. H. B.. Identificação de polimorfismos no primeiro íntron do hormônio de crescimento do jundiá (*Rhamdia* sp.). *Tópicos Especiais em Biologia Aquática e Aquicultura III*. Jaboticabal, SP: Sociedade Brasileira de Aquicultura e Biologia Aquática - AQUABIO, 2010.

### 3. Revisão da Literatura

#### 3.1 Aquicultura mundial

Segundo dados da FAO “*Food and Agriculture Organization of United Nations*” (2012), a aquicultura mundial teve uma produção de aproximadamente 59 milhões de toneladas em 2010, apresentando um crescimento de 7,5% em relação a 2009.

Esta alta produção se deve principalmente ao continente asiático, que participa com 89% da produção mundial na aquicultura. Seguido dele, vem a Europa com 4,2%, a América do Sul com 3,1%, a África com 2,2%, Américas do Norte e Central com 1,2% e a Oceania com 0,3% (Figura 1).

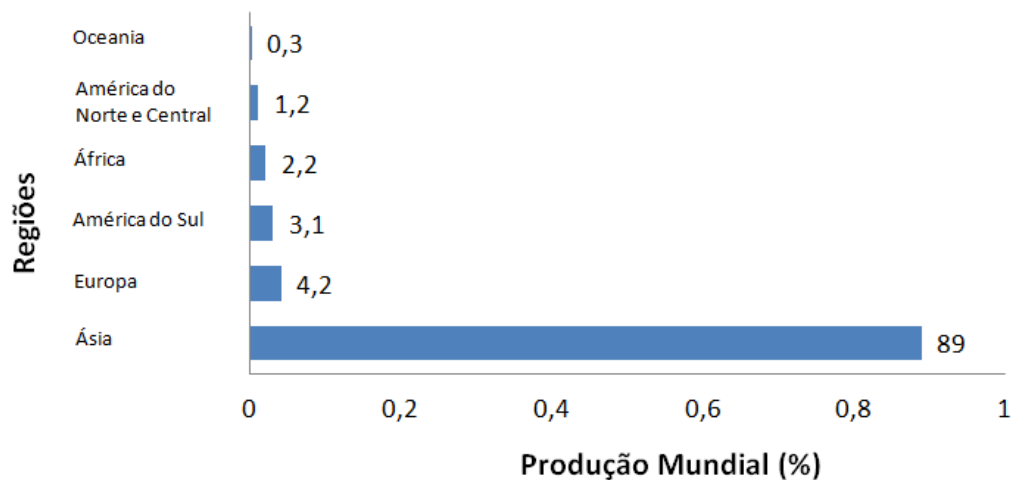


Figura 1 – Produção Mundial da Aquicultura por Região em 2010.  
Fonte: FAO, 2012.



Nas Américas do Norte, Sul e Central, a aquicultura vem se expandindo nos últimos anos. Contudo, a região promissora é a América do Sul por apresentar um crescimento contínuo na produção, em particular os países Peru e Brasil (FAO, 2012).

### 3.1.1 Aquicultura no Brasil

Segundo o Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA Brasil (2012) a produção Brasileira no ano de 2010 foi de 1.264.764,9 toneladas (Figura 2).

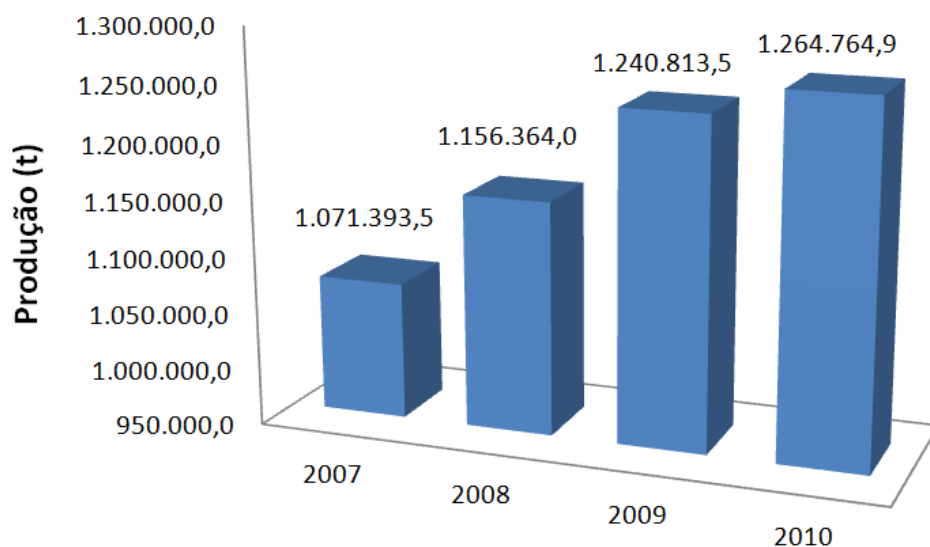


Figura 2 – Produção da Pesca e Aquicultura no Brasil.  
Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura (2012)

Através de incentivos do Governo Federal, como a criação do Ministério da Pesca e Aquicultura, Resolução Conama e a criação de um pólo da EMBRAPA exclusivo para Aquicultura e Pesca, o setor foi alavancado, trazendo desenvolvimento e cultura.

A produção aquícola continental no Brasil também teve um crescimento substancial no triênio 2008 - 2010, chegando a produção de 394.340 toneladas, cerca de 40% superior durante este período e representando 82,3% da produção total nacional (Brasil, 2012) (Figura 3).

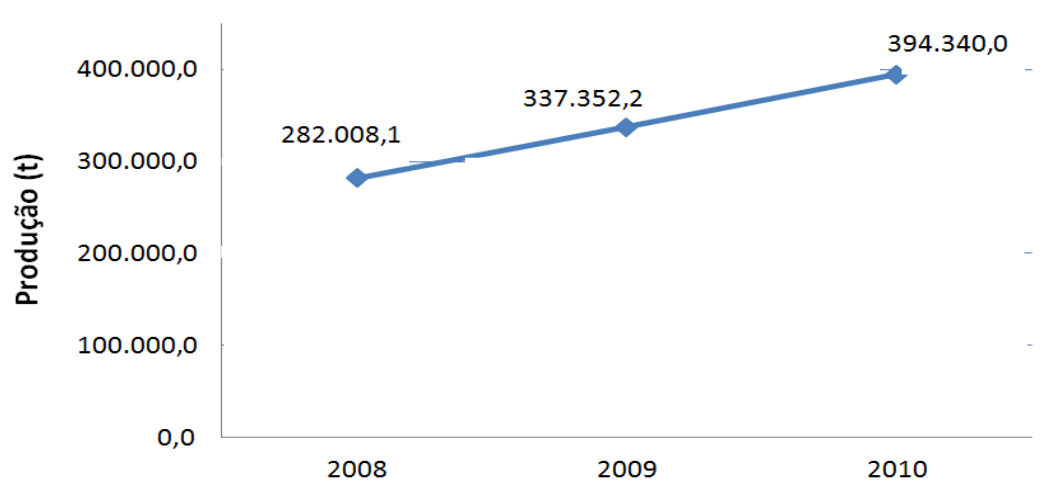


Figura 3 – Produção de pescado da aquicultura continental triênio 2008 - 2010.

Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura (2012)

Em 2010 a região Sul apresentou a maior produção de pescado do País, com 133.425,1 toneladas, correspondendo a 33,8% da produção nacional da modalidade. O segundo e o terceiro maiores produtores de pescados foram a região Nordeste e Sudeste com valores muito próximos, 78.578,5 toneladas e 70.915,2 toneladas respectivamente. Fechando a lista está a região Centro-oeste com 69.840,1 toneladas e a Norte com 41.481,1 toneladas (Brasil, 2012).

Aumentar a produção do pescado de 1,2 milhões de toneladas (2010) para 2,0 milhões de toneladas em 2014 é uma das metas anunciadas pelo Ministro da Pesca e Aquicultura, durante o lançamento do Plano Safra Pesca e Aquicultura; o qual significa um aumento superior a 80% na produção do pescado no período de dois anos.

O desafio o qual foi lançado à Aquicultura, necessita de um efetivo programa de profissionalização do setor, originando mão de obra qualificada com capacitação de técnicos e produtores. Entretanto, ainda é necessário um efetivo acompanhamento técnico nas propriedades, regularização ambiental das unidades produtoras e um programa de desenvolvimento tecnológico para piscicultura que possa superar o nível atual de produtividade, garantia da sanidade e imunidade da carne do pescado (Auzani *et al.*, 2013).

### 3.1.2 Aquicultura no Rio Grande do Sul

Os dados da produção nacional de pescado da aquicultura continental demonstrou que o estado do Rio Grande do Sul (RS) continua sendo o maior produtor de pescado do país, participando com 55.066,4 toneladas (Figura 4).

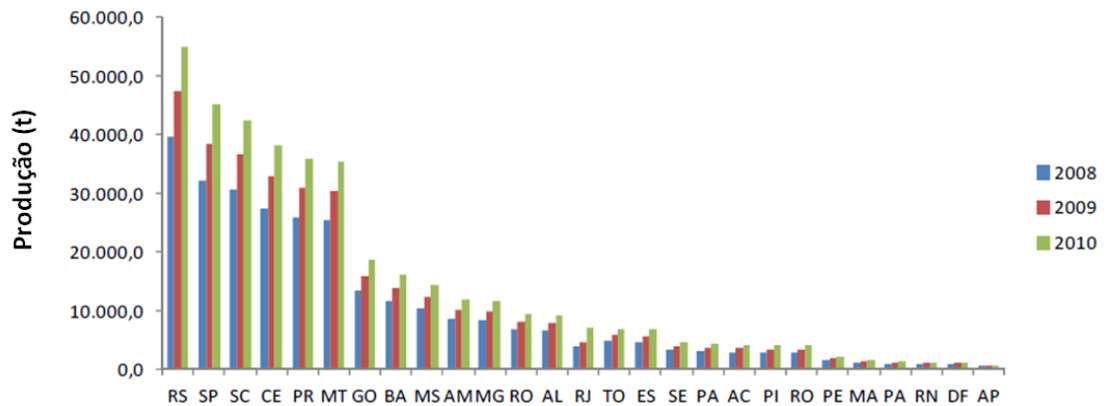


Figura 4 - Produção de pescado da aquicultura continental por Unidade de Federação em 2010.

Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura (2012).

Em relação às espécies mais cultivadas na ordem de importância econômica, em primeiro lugar ficam as variedades de carpas; carpa capim (*Ctenopharyngodon idella*), carpa húngara (*Cyprinus carpio*), carpa prateada (*Hypophthalmichthys molitrix*) e carpa cabeça grande (*Aristichthys nobilis*); tilápia nilótica (*Oreochromis niloticus*); pacu (*Piaractus mesopotamicus*); e jundiá (*Rhamdia sp.*) (Brasil, 2012). Cabe ressaltar que o jundiá não está sendo cultivado somente no RS, a estatística do Brasil (2012) aponta uma alta produção nos estados de Santa Catarina (SC) e Paraná (PR), com tendência crescente.

#### 3.1.2.1 Produção de Jundiá no RS

Conforme dados do Brasil (2012) a produção total de jundiá na região Sul do país foi de 911 toneladas em 2008, 1.090 toneladas em 2009 e 1.274 toneladas em 2010 (Figura 5). Essa tendência crescente pelo cultivo do jundiá é confirmada por pesquisadores e técnicos da EPAGRI-SC, EMATER-RS, UFPel e UFRGS.

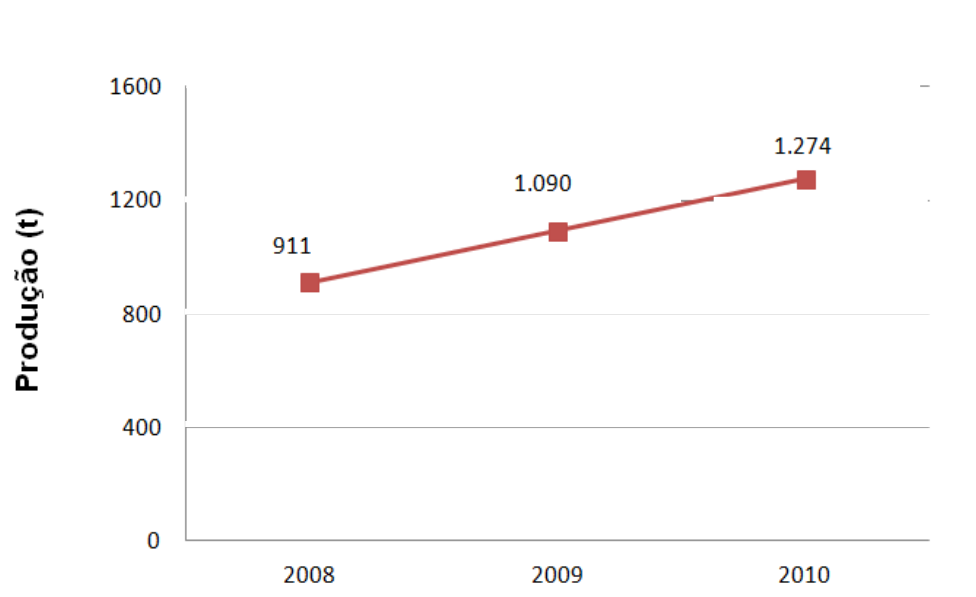


Figura 5 - Produção de jundiá na região Sul do país (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina) nos anos de 2008, 2009 e 2010.  
Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura (2012).

A produção total de alevinos no RS no ano de 2010 foi de 37,2 milhões, sendo em média 10% de jundiá (Brasil, 2012). Entretanto, segundo dados levantados durante o ano de 2011 e 2012 pelo grupo de pesquisa da UFPel (LEGA - Laboratório de Engenharia Genética Animal) em parceria com a UFRGS e a EMATER, relacionadas a safra 2010/2011, apontam um número quase três vezes menor na produção (13.570.000 alevinos) que os dados estatísticos do MPA para 2010. Para jundiá, segundo dados do grupo de pesquisa, a produção foi de aproximadamente 2.300.000 alevinos, quase 20% da produção total do estado. Essa diferença pode ser devido à ausência de dados atualizados sobre laboratórios de produtores de alevinos, o qual não ocorre somente no RS, mas também nas pisciculturas de todo Brasil, e/ou por diferenças de produção entre 2010 e 2011. Neste contexto, Scorvo-Filho *et al.* (2010) afirmam que para o bom planejamento da atividade a obtenção de informações sobre a produção de alevinos são essenciais.

O aumento na produção e na comercialização do jundiá no RS e nos demais estados onde a espécie é produzida, deve ser creditado ao trabalho de profissionais, que historicamente vem realizando pesquisas com a participação efetiva de técnicos, piscicultores, representantes de órgãos de fomento à pesquisa e entidades ambientais (Auoza *et al.*, 2013).

Os avanços com a pesquisa sobre o jundiá é resultado de projetos integrados, coordenados por pesquisadores de universidades de três estados da Região Sul do Brasil (Barcellos, 2013). No ano de 2011, foi criada a rede de jundiá, com a participação das seguintes entidades e instituições: EPAGRI-SC, UFSM, UFPel, UPF, UFSC, ESALq, APTA/PESCA, Fundação 25 de Julho de Joinville, IFC Campus Camboriú, UFFS, com o apoio financeiro do CNPq/MPA e da Fapesc. Trata-se de uma rede que cuida da pesquisa, da inovação e do desenvolvimento tecnológico da espécie jundiá, dedicando-se à transferência de tecnologia à comunidade (Barcellos, 2013).

### **3.2 Biologia do Jundiá (*Rhamdia sp.*)**

O jundiá é um peixe nativo que apresenta distribuição neotropical, tendo sua ocorrência registrada desde a região Central da Argentina até o Sul do México (Silfvergrip, 1996).

A sistemática do gênero é confusa desde que foi descrita. Silfvergrip (1996) realizou uma revisão taxonômica do gênero baseada em caracteres da morfologia interna, e concluiu que o gênero *Rhamdia* é formado por 11 espécies, pertencendo a seguinte divisão taxonômica: Classe: *Osteichthyes*, Série: *Teleostei*, Ordem: *Siluriformes*, Família: *Pimelodidae*, Gênero: *Rhamdia*, Espécie: *Rhamdia sp.*. Nomes vulgares, no Brasil: jundiá, jundiá-tinga, jandiá, jandiá-tinga, mandi e sapipoca; Argentina: bagre, bagre negro, bagre sapo e bagre sulamericano (Gomes *et al.*, 2000).

O jundiá tem preferência por ambientes de águas mais calmas, junto às margens e vegetação de lagos e poços fundos dos rios. Durante o dia habita entre as pedras e troncos submersos, de onde sai à noite, à procura de alimento (Guedes, 1980). Experimentos comprovam que larvas e alevinos dessa espécie em cativeiro apresentam aversão à luz e busca de locais escuros (Piaia *et al.*, 1999).

Como peixe nativo, o jundiá é considerado uma das espécies mais promissoras a ser cultivada. Algumas características dessa espécie tornam-na especiais para produção, como a resistência ao manejo, crescimento acelerado (inclusive no inverno, onde há presença de baixas temperaturas), boa eficiência alimentar e, sobretudo, por apresentar uma carne saborosa, sem espinhos

intramusculares, além de boa aceitação pelo mercado consumidor (Carneiro *et al.*, 2002).

Característica favorável e importante para produção do jundiá em cativeiro é o fato desta espécie ser estenoalina, a qual alevinos suportam transferência de água de 0 a 10% (água do mar) e até 9,0g/L de sal comum (NaCl) por 96 horas, de modo que o tratamento de doenças com NaCl pode ser utilizado nesta espécie sem problemas (Marchioro, 1997).

O jundiá, suporta variações no pH na faixa de 4,0 a 8,5 (dureza de 30,0mg/L CaCO<sub>3</sub>, entretanto estudos comprovam que o melhor crescimento das larvas ocorre na faixa de pH de 8,0 a 8,5 (Lopes, 1998).

Outro caractere que influencia no crescimento da espécie é a temperatura. Embora o jundiá seja uma espécie euritérmica, tolerando variações de temperatura de 15 a 35°C (Baldisserotto *et al.*, 2005; Zaniboni Filho, 2004) o crescimento aumenta com o incremento da temperatura, principalmente nos primeiros anos de vida. Entretanto, devido ao amadurecimento sexual rápido dos machos (gasto de energia para o desenvolvimento gonadal), as fêmeas apresentam um crescimento mais acentuado, em cerca de 20 a 30% (Esquivel, 2005; Zaniboni Filho, 2004).



Figura 6 – Exemplar de um reprodutor de jundiá (*Rhamdia sp.*).

### 3.2.1 Biologia reprodutiva

O ciclo reprodutivo dos peixes é influenciado pelo ciclo hormonal, pela salinidade das águas, pelas precipitações pluviométricas, por flutuações de foto período e da temperatura ambiente (Gomes *et al.*, 2000).

A maturidade sexual do jundiá é atingida no primeiro ano de vida. Os machos iniciam a maturação das gônadas com 13,4 cm e as fêmeas com 16,5 cm de tamanho corporal (Amaral Jr *et al.*, 2013). Durante o ano apresenta dois picos reprodutivos, um na primavera e outro no verão com desovas múltiplas em cada

pico. Entretanto, o período reprodutivo e os picos de desenvolvimento das gônadas podem variar a cada ano e de um lugar para outro (Garcia *et al.*, 2013).

O jundiá é uma espécie ovulípara no habitat natural, a desova é feita preferencialmente em lugares de águas rasa, limpa, pouca corrente e com fundo pedregoso (Silva *et al.*, 2004) e não apresenta cuidado parental.

O desenvolvimento inicial do jundiá é dividido em duas fases: embrionária e larval. Os ovos são esféricos, demersais e não-adesivo (Esquivel, 2005) com um espaço perivitelino claramente definidos e córion resistente (Pereira *et al.*, 2006). Os estágios de clivagem iniciam com 3,5 horas, os primeiros sinais de movimento embrionário podem ser observados 21 horas após a fertilização e a eclosão das larvas com 30,5 horas após a fertilização. A sequência dos acontecimentos mais importantes pode ser observada em cada fase nas figuras 7 e 8.

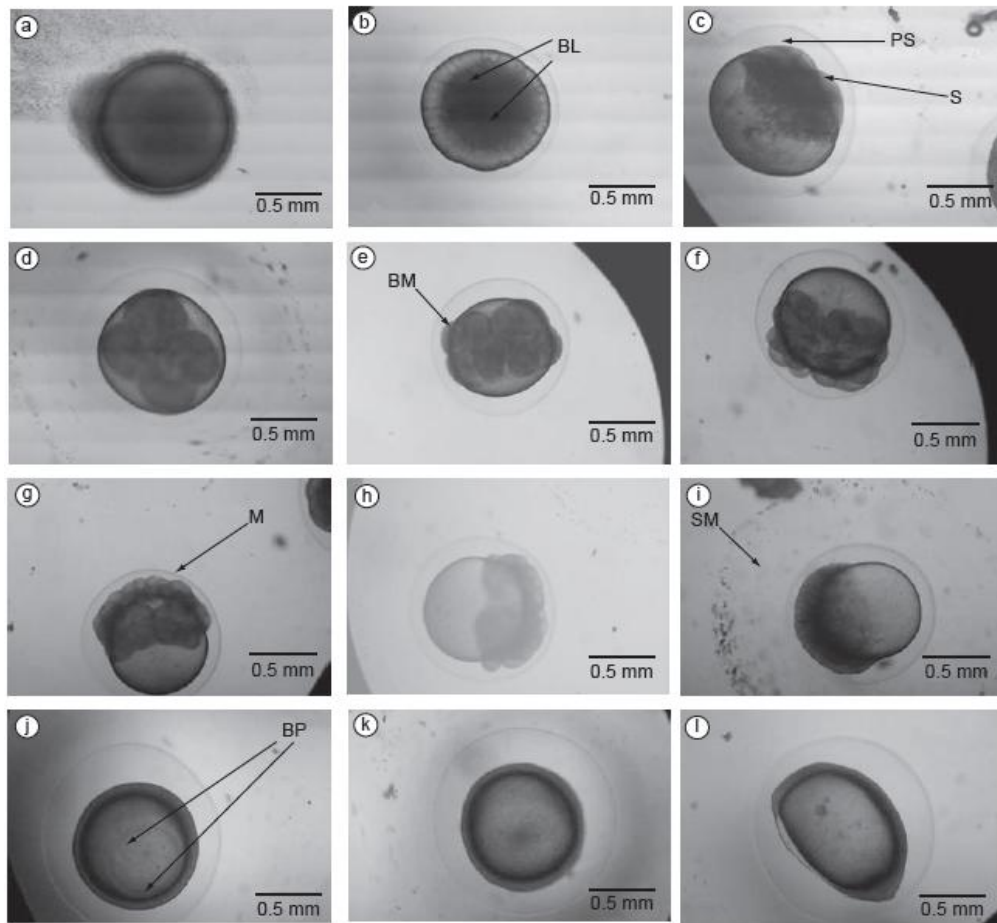


Figura 7 – Desenvolvimento embrionário em jundiá (*Rhamdia sp.*): a) oócito gerado; b) formação do blastodisco (BL); c) estágio de duas células (PS-espaco perivitelino, S-linha de segmentação); d) estágio de quatro células; e) estágio de oito células (BM – blastômeros); f) estágio de dezesseis células; g) estágio de trinta e duas células (M-membrana do óvulo); h) estágio de sessenta e quatro células; i) cobertura da gema, blastoderma (SM – membrana secundária, 540 $\mu$ m; j) blastoderma (BP – blastóporo); k) redução da gema; l) mudança de conformação da gema.

Fonte: Pereira *et al.*, 2006



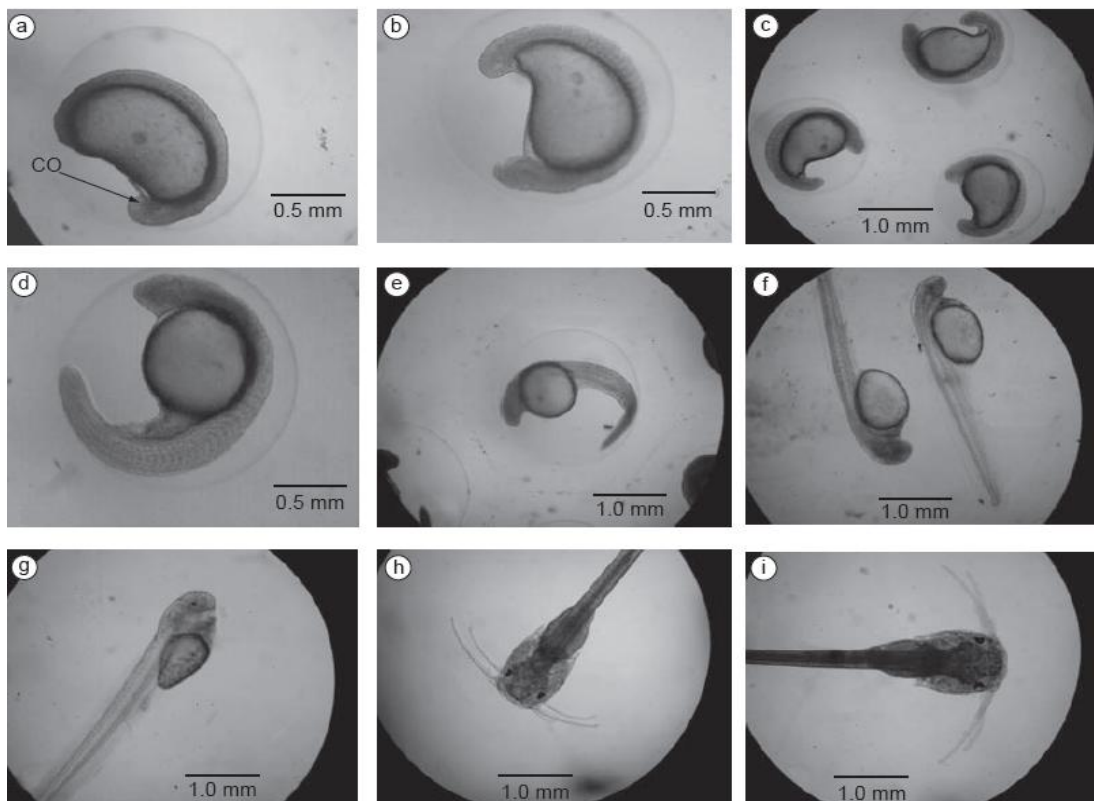


Figura 8 – Desenvolvimento larval em jundiá (*Rhamdia sp.*): a) organização cefálica; b) início do desenvolvimento caudal; c) crescimento acelerado da região caudal e diminuição da gema; d) movimento; e) movimento vigoroso do embrião; f) eclosão; g) larva com a boca aberta; h) larva com 104 horas; i) larva com 123 horas.

Fonte: Pereira *et al.*, 2006

### 3.2.2 Patologias

A resistência dos peixes e o estresse estão ligados a fatores que podem ser gerenciados, como as condições de cultivo, manejo inadequado, alimentação fora das exigências da espécie e a idade (Martins *et al.*, 2013). Além disso, variações ambientais também podem favorecer a imunossupressão nos organismos aquáticos, tais como, oscilações na temperatura, oxigênio dissolvido, pH, concentração de amônia e xenobiontes (Moraes e Martins, 2004).

Tanto os parasitos quanto as bactérias estão presentes no meio ambiente e de certa forma também estão nos peixes, onde proliferam-se sob condições de estresse e imunidade baixa (Martins *et al.*, 2013).

Protozoários parasitas são os mais comuns causadores de mortalidades tanto na alevinagem como na engorda (Martins *et al.*, 2010). O *Ichthyophthirius multifiliis* (Protozoa: *Ciliophora*) conhecido popularmente como “ictio”, é um protozoário

ciliado, com formato arredondado, medindo até 1,0 mm de diâmetro, causando pontos brancos nos peixes. Tal parasita foi amplamente distribuído nas populações a partir de introduções de peixes para consumo e ornamentais (Martins *et al.*, 2013) e por apresentar baixa especificidade de hospedeiro o torna um dos mais preocupantes parasitas em peixes de água doce.

O ciclo de vida do ictio é direto, monoxênico e pode se completar em poucos dias. Quando adulto (chamado de trofonte ou trofozoíto) fica aderido ao tecido branquial ou na pele de peixes infectados. Ao atingir a maturidade, libera-se do hospedeiro e aloja-se no substrato do viveiro (fase chamada de tomonte) (Martins *et al.*, 2013) onde sofre divisões binárias originando células chamadas tomitos, as quais podem liberar de 64 a 3 mil terontes, dependendo das condições aquáticas que influenciam na reprodução do tomonte (Matthews, 2005). Os terontes são portanto, a forma infectante do parasito, são alongados e ciliados, estes necessitam encontrar um hospedeiro, caso contrário morrerão em cerca de 48 horas.

As reservas energéticas e a temperatura da água podem influenciar no tempo de sobrevivência dos terontes. O tempo necessário para completar seu ciclo de vida depende da temperatura, ocorrendo geralmente entre quatro e cinco dias (Martins *et al.*, 2013). Entretanto, em temperatura ótima (24 e 26 °C) a multiplicação do cisto ocorre entre sete e oito horas (Hoffman, 1978).

A ictioftiríase em jundiás causa pontos brancos na superfície do corpo, nadadeiras e brânquias, hemorragias, anorexia, peixes vagando na superfície da água e excessiva produção de muco seguida de morte (Martins *et al.*, 2013).

Os *Henneguya sp.* são parasitas que também podem ser encontrados em jundiás. Em análises histopatológicas, cistos foram encontrados nas brânquias de *R. quelen* e cistos pequenos (cerca de 35-60 µm de comprimento) foram identificados dentro de vasos sanguíneos justapostos ao epitélio respiratórios (Schmale *et al.*, 2004), seguido de reações inflamatórias.

Outros parasitas também foram observados nesta espécie, como *Aeromonas hydrophila* (patogênica facultativa, provoca infecções), *Yersinia ruckeri* (causa a doença da boca vermelha), *Plesiomonas shigelloides* (ocorre em peixes estressados e elevação da temperatura), *Flavobacterium sp.* (bactéria que causa doença nas brânquias), *Pseudomonas sp.* (patogênicas oportunistas), *Vibrio sp.* (causador da

peste vermelha), *Staphylococcus sp.* (causa úlceras no corpo), *Micrococcus sp.* (causa lesões no dorso), *Edwardsiella tarda* (causa lesões na pele e desenvolve abscessos), *Actinobacter sp.* (destrói os ovos e causa infecções) (Shama, 1997), Monogenea (ectoparasita presente nas nadadeiras), *Trichodina sp.* (ectoparasitas que causam infecções secundárias) e *Acanthostomum gnerii* (trematódeos digenéticos) (Watson, 1976).

Tal parasitismo leva á queda na resistência dos animais, tornando-os suscetíveis a infecções bacterianas e fúngicas. Contudo, é necessária a prevenção e o tratamento, dificilmente um parasito ocorre sozinho, sendo acompanhado por outros parasitos tornando o hospedeiro cada vez mais fraco.

### **3.2.3 Nutrição e Hábito alimentar**

Em se tratando de nutrição de peixes, poucos são os grupos que trabalham com esse tópico, pois além de infraestrutura especializada, demanda também de um maior tempo de experimento para obtenção de resultados confiáveis.

Com os avanços na produção de peixes e uma perspectiva de desenvolver um pacote tecnológico para o jundiá, estudos de nutrição ainda precisam ser elucidados. Na atual demanda tecnológica, a pesquisa em nutrição não se baseia apenas em avaliar um ingrediente em si nas formulações de alimentos, é indispensável avaliar o aproveitamento do alimento pelo peixe e o aporte adequado de nutrientes essenciais (Radünz-Neto *et al.*, 2013).

Os ingredientes purificados apresentam composição química uniforme com alta digestibilidade de aminoácidos e livres de fatores antinutricionais, mas que não apresentam a máxima eficiência de desempenho (Radünz-Neto *et al.*, 2013). Entretanto, estudos sobre exigências nutricionais de proteína e energia para jundiá, demonstram que uma proporção entre 3.200-3.650 kcal/Kg de energia por 32,6% e 37,3% de proteína bruta são proporções ideais (Meyer e Fracalossi, 2004).

Além de aspectos relacionados às exigências nutricionais, é necessário utilizar avaliações metodológicas em outras áreas, como a análise de parâmetros zootécnicos, enzimologia, hematologia, metabolismo geral, qualidade e aceitabilidade do produto final (Radünz-Neto *et al.*, 2013); ambos para o entendimento das respostas obtidas.

Quanto ao hábito alimentar, o jundiá alimenta-se à noite e é uma espécie generalista com relação à escolha do alimento (Guedes, 1980); alimentando-se de

peixes, crustáceos, insetos, restos de vegetais, e detritos orgânicos (Guedes, 1980; Meurer e Zaniboni Filho, 1997). Como um onívoro, aceita muito bem dietas elaboradas.

Para larvicultura em tanques escavados, a melhor sobrevivência encontrada ocorreu utilizando zooplâncton como alimentação (Luchini e Salas, 1983). Resultado que não foi diferente utilizando aquários de 200 litros (Luchini e Salas, 1985), onde o zooplâncton também apresenta melhor crescimento e sobrevivência para jundiá.

Segundo Piaia e Radunz Neto (1997), o tratamento viável para ser utilizado na alimentação durante a primeira fase larval é o regime de fígado cru e pó de levedura *Saccharomyces cerevisiae*.

Na fase de recria e engorda, a combinação de ingredientes como farelo de soja e ingredientes de origem animal (farinha de carne suína e farinha de vísceras de aves) apresentam um melhor resultado (Veiverberg, 2011). Os aminoácidos podem ser supridos tanto pela inclusão de aminoácidos livres quanto pela inclusão da farinha de origem animal (Radünz-Neto, *et al.*, 2013). Entretanto, deve ser levado em consideração outro aspecto na elaboração das dietas, como a origem e a qualidade da matéria-prima, além de critérios para controle da qualidade.

#### **3.2.4 Genética**

O jundiá vem sendo considerado como espécie promissora para produção na região Sul do Brasil. Uma espécie recentemente adotada pelos pesquisadores, sendo poucas as informações disponíveis na área da genética.

Os primeiros estudos sobre a genética do jundiá iniciaram-se em 1976 com os pesquisadores Toledo e Ferrari, através de análises de cariótipo da família Pimelodidae. São conhecidos os números diplóides de diversas espécies de peixes, onde para jundiá tem-se  $2n = 58$  cromossomos.

Outra característica citogenética marcante no jundiá é a presença frequente de cromossomos supranumerários ou cromossomos B, responsáveis pela variação intra e interindividual no número de cromossomos nas várias populações. De acordo com Camacho (1993), os cromossomos B podem ser considerados como não essenciais, são originados a partir de um cromossomo A, mas seguindo sua própria evolução. São cromossomos compostos por heterocromatina, característica essa que atrasa a replicação (Volobujev, 1981), entretanto, ainda é considerado um

dilema em citogenética de peixes, pois a sua função e origem permanecem obscuros.

Em um âmbito mais intrínseco, análises de biologia molecular começaram a ser utilizadas efetivamente nos estudos com jundiá. Estudos utilizando marcadores de polimorfismo de DNA amplificados ao acaso – PCR-RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), demonstraram um alto grau de polimorfismo genético, correspondente a 93,9% em uma população criada em cativeiro, estando relacionado com a alta ocorrência de bandas polimórficas de baixa repetição nessa população (Lidani *et al.*, 2006). Em 2010 novos dados foram publicados, agora já com o sequenciamento do hormônio de crescimento, caracterização do gene, bem como a estrutura tridimensional gerada através de ferramentas de bioinformática (Vaz *et al.*, 2010).

Novas tecnologias de sequenciamento do DNA vêm sendo desenvolvidas possibilitando rapidez e um efetivo custo benefício. As tecnologias na área da genética possibilitam efetivamente um ganho tanto para os estudiosos como para os produtores que irão se beneficiar das inovações.

Estudos mais recentes apresentam o mapeamento de 6.331 “loci potencialmente amplificáveis de microssatélites” específicos para jundiá, deste total, 4.755 são dinucleotídeo, 728 trinucleotídeo, 729 tetranucleotídeo, 117 pentanucleotídeo e 2 eram hexanucleotídeo (Rodrigues *et al.*, 2012). Os marcadores microssatélites apresentam-se altamente polimórficos, permitindo o estudo de diferenças genéticas entre populações estreitamente relacionadas, são marcadores moleculares amplamente utilizados na área da genética populacional e melhoramento genético.

Embora os estudos com jundiá ainda estejam emergindo, ainda é desconhecida a estrutura populacional, o que dificulta a implementação de um programa de melhoramento genético para esta espécie que é tão promissora para a região Sul do Brasil.

Ainda nesse contexto, percebe-se a importância de mais pesquisas serem desenvolvidas possibilitando estudos mais apurados sobre as populações naturais e de cultivo que possam contribuir para uso futuro em programas de melhoramento genético e demais análises para esta espécie.

### 3.3 Marcadores Moleculares

Marcadores morfológicos e proteicos (aloenzimas e isoenzimas) começaram a ser utilizados em estudos de variabilidade populacional em peixes na década de 60 (Park e Moran, 1994). Com o avanço da biotecnologia e da biologia molecular, os marcadores moleculares transformaram-se em ferramentas extremamente confiáveis para avaliação genética, pois diferentemente dos morfológicos apresentam neutralidade fenotípica, dificilmente exibem interações epistáticas e geralmente são herdados codominantemente.

Existem várias definições para conceituar marcadores moleculares. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), um marcador molecular pode ser definido como qualquer fenótipo molecular proveniente de um gene expresso ou de algum segmento específico de DNA. Outro autor define que um marcador molecular é uma/s característica(s) do DNA que pode diferenciar indivíduos e estes são herdados geneticamente (Milach, 1998).

Através dos marcadores moleculares é possível selecionar e realizar cruzamentos em uma mesma geração, aumentando a eficiência de programas de melhoramento. Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), os marcadores moleculares podem ser utilizados embora não tenham sido mapeados, estando estes associados a um gene, região cromossômica ou a um fenótipo, entretanto necessitam continuar nas gerações subsequentes, certificando sua natureza genética.

Os marcadores moleculares em peixes tornaram-se uma importante ferramenta no estudo de genética de populações, podendo ser utilizados para:

- Caracterizar a estrutura da população em uma espécie;
- Determinar a variabilidade genética em diferentes populações;
- Identificar diferentes linhagens, espécies e/ou híbridos;
- Definir a filogenia de espécies e populações;
- Identificar marcadores ligados a genes que expressam características de interesse zootécnico;

Diversos marcadores moleculares têm sido desenvolvidos. Entretanto, o aprimoramento na utilização de marcadores moleculares se deu após o

desenvolvimento da técnica de PCR (Reação em cadeia da polimerase) (Saiki *et al.*, 1988). Dentre os principais marcadores moleculares estão:

a) Baseados na técnica de eletroforese de proteínas :

- Isoenzimas (Hunter e Markert, 1957)

b) Baseados nas técnicas de restrição:

- RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) (Grodzicker *et al.*, 1974);

- VNTR (*Variable Number Of Tandem Repeats* - Número variável de repetições em tandem – minissatélites) (Jeffreys *et al.*, 1985);

c) Baseados na técnica de PCR:

- RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* – Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso) (Williams *et al.*, 1990);

- AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism* - Polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados) (Zabeau e Vos, 1993);

- SNP (*Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de nucleotídeo simples) (Wang *et al.*, 1998);

- SSR (*Simple Sequence Repeat* - Sequências simples repetidas) ou Microsatélites (Litt e Lutty, 1989).

Os marcadores microsatélites (SSR) estão sendo amplamente utilizados por apresentarem algumas vantagens para serem aplicados em estudos de genética, sendo os mais empregados em estudos populacionais (Tostain *et al.*, 2007).

Os SSR apresentam segregação mendeliana simples, sua é herança codominante, são abundante nos genomas eucariotos, são multialélicos, apresentam alto polimorfismo e são amplificáveis via PCR. São caracterizados por serem regiões do genoma com sequências de DNA repetitivo, podendo ser classificados conforme a composição das sequências repetidas:

- Repetições imperfeitas, quando apresentam interrupções por bases que não correspondem ao motivo. Exemplo: ACACACATGTACACACA.

- Repetições perfeitas, quando não há interrupções. Exemplo: AGAGAGAGA;

- Repetições compostas, quando duas ou mais classes estão dispostas de forma adjacente. Exemplo: CACACACACACAGAGAGAGAGA.

Além da composição das sequências, os microssatélites são classificados em relação à unidade repetitiva: mononucleotídica (AAAAAAA), dinucleotídica (ACACACACAC), trinucleotídica (ACTACTACTACTACT), Tetranucleotídica (ACGGACGGACGGACGG), Pentanucleotídica (AAACCAAACCAAACCAAACCAA) e Hexanucleotídica (AATTCGAATTCGAATTCGAATTCG) (Oliveira *et al.*, 2006).

As sequências que flanqueiam os SSR geralmente encontram-se conservadas entre os indivíduos da mesma espécie, além disso, podem ser transferidas entre espécies e populações do mesmo gênero (Alves *et al.*, 2006). Entretanto, uma das desvantagens no uso dos microssatélites é o alto custo para desenvolver os iniciadores, o que posteriormente é compensatório por apresentar um grande potencial em pesquisas consecutivas.

### 3.3.1 Sequenciamento de próxima geração

O desenvolvimento de marcadores microssatélites provenientes de espécies modelos outrora exigia um dispendioso esforço técnico, com procedimentos demorados e caros. Estes procedimentos incluem técnicas como a criação de bibliotecas enriquecidas para loci SSR, clonagem, hibridização para detectar clones positivos, isolamento de plasmídeo e sequenciamento de Sanger (Castoe *et al.*, 2012). Entretanto, avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA vêm proporcionando métodos mais eficientes e de baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuem dados disponíveis (Buschiazzo e Gemmell, 2006), atualmente conhecidos como sequenciamento de próxima geração (NGS - *Next Generation Sequencers*).

As plataformas atualmente disponíveis são caracterizadas por tecnologias metodológicas distintas, como a capacidade de gigabytes produzidos, taxas de erro, tempo de execução, custo x benefício, etc. As principais atualmente disponíveis no mercado que utilizam o sequenciamento de próxima geração são:

- *Genome Analyzer IIx (GAIIx), HiSeq2000, HiSeq2500, MiSeq-Illumina;*
- *Genome Sequencer FLX System (454) – Roche;*
- *SOLiD 5500xl System – Applied Biosystem;*



- *HeliScope<sup>TM</sup> Single Molecule Sequencer* – Helicos;
- *PacBio RS* – Pacific Bioscience;
- *Personal Genome Machine, Ion Proton* – Ion Torrent;
- *GridION, MinION* – Oxford Nanopore.

Esta nova tecnologia conduz para substituição de protocolos convencionais de isolamento de microssatélites (Abdelkrim *et al.*, 2009), e existem cada vez mais relatos empregando marcadores microssatélites NGS em estudos de espécies não modelos (Saarinen e Austin, 2010; Yu *et al.*, 2011). Para jundiá como espécie nativa e promissora, o desenvolvimento de marcadores microssatélites poderá disponibilizar dados em grande escala, possibilitando o avanço de pesquisas para a espécie.

Através da plataforma Roche 454 GS-FLX, foram obtidas sequências genômicas para *Henichorynchus siamensis*, um teleósteo de água doce de grande importância econômica na bacia do rio Mekong (China), 65.954 sequências foram obtidas com a plataforma, dentre o total de sequências, 1.837 eram SSRs (Iranawati *et al.*, 2012). Para *Megalobrama Pellegrini*, peixe nativo da China, foram obtidas 257.497 leituras brutas, sendo 49.811 PALs (Loci potencialmente amplificável) microssatélites (Wang *et al.*, 2012). Embora se tenha utilizado a mesma plataforma (Roche 454 GS-FLX) e ambos peixes nativo da China, o número de sequências obtidas para *Henichorynchus siamensis* foram efetivamente menores do que as obtidas para *Megalobrama Pellegrini*.

O número de sequências obtidas pode variar, dependendo da espécie e do perfil de cada plataforma na realização da triagem das sequências, já que existem algumas restrições para o descarte das leituras. Para *Coscoroba coscoroba* (coscoroba), cinco milhões de leituras obtidas foram analisadas com o programa PAL\_FINDER\_v0.02.03 para extrair as que continham microssatélites, a partir do *screening* das leituras, 3.046 loci microssatélites foram encontrados utilizando a plataforma HiSeq (Illumina) com leituras *paired-end* de 100 pares de bases (Calabuig *et al.*, 2012).

O avanço tecnológico da genética molecular nos permite obter maior conhecimento sobre o genoma antes não estudado, além disso, vem sendo acompanhado pelo grande desenvolvimento da bioinformática, da estatística e da

genética de populações; permitindo estudar e conhecer a estrutura e a diversidade das populações.

### 3.3.2 Genética de populações

A Genética de populações visa à investigação da dinâmica dos genes nas populações, busca esclarecer os mecanismos que estejam alterando a sua composição gênica, como por exemplo, o efeito de fatores evolutivos (deriva genética, mutações, seleção natural e fluxo gênico) ou apenas a frequência genotípica pelo aumento da homozigose (efeito dos casamentos consanguíneos ou da subdivisão da população em isolados) (Beiguelman, 2008).

No ano de 1908 o matemático inglês Godfrey Harold Hardy (1877 – 1947) e o médico alemão Wilhem Weinberg, concomitantemente concluíram que, se nenhum fator evolutivo atuasse sobre uma população que satisfizesse certas condições (população infinitamente grande com acasalamentos ao acaso), as frequências dos respectivos alelos permaneceriam inalteradas ao longo das gerações. A partir de então esse princípio ficou conhecido como Lei ou Teorema de Hardy-Weinberg (Hartl e Clark, 2010).

O princípio de Hardy-Weinberg estabelece que, para um determinado par de alelos com frequências  $p$  e  $q$ , em uma população mendeliana em equilíbrio, a frequência dos diferentes genótipos em cada geração estará de acordo com a expressão  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Entretanto, a importância do princípio de Hardy-Weinberg é o estabelecimento de um padrão teórico para o comportamento dos genes ao longo das gerações (Hartl e Clark, 2010). Na prática, o equilíbrio de H-W auxilia na compreensão da população, se esta encontra-se ou não em equilíbrio e os possíveis fatores evolutivos que estão atuando.

Através de modelos matemáticos elaborados de forma empírica ou desenvolvidos a partir de observação e experimentação, é possível caracterizar a forma com que os fatores evolutivos estão atuando na população, sejam estas populações naturais ou de cultivo. De tal forma, a genética de populações possibilita um tratamento qualitativo e quantitativo dos fenômenos evolutivos, além de garantir o estabelecimento de previsões e o teste estatístico de hipóteses (Hartl e Clark, 2010).

Com o avanço tecnológico, conjuntos de modelos têm sido desenvolvidos, bem como a maneira de abordar os processos evolutivos de forma integrada,

garantindo uma maior aplicação da genética de populações no estudo de populações naturais e de cultivo. Dentre os avanços estão os marcadores moleculares e o desenvolvimento de computadores e *softwares* cada vez mais eficazes, facilitando a manipulação cada vez maior de dados, além da aplicação de modelos evolutivos mais complexos. Segundo Hartl e Clark (2010), tais avanços associados podem determinar com precisão as seguintes questões:

- Grau de diversidade presente entre populações e dentro da população;
- Intensidade do fluxo gênico entre populações;
- A estrutura da população;
- Eventos evolutivos passados que impactaram a população ao longo das gerações.

Contudo, a genética de populações é uma importante ferramenta junto ao desenvolvimento de biotécnicas, como biologia molecular, estatística e bioinformática, que apresentam-se como uma alavanca para que se determine as espécies em potencial para o desenvolvimento de programas de melhoramento genético, além da preservação de espécies em extinção.

#### 4. Artigo Submetido à revista Ciência Rural

### CARACTERIZAÇÃO DAS UNIDADES PRODUTORAS DE ALEVINOS DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

Marília Danyelle Nunes Rodrigues<sup>1</sup>, Heden Luiz Marques Moreira<sup>2</sup> e Danilo Pedro Streit Jr<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas;

<sup>2</sup>Departamento de Ecologia, Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas;

<sup>3</sup>Departamento de Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul;

#### RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar as unidades produtoras de alevinos estado do Rio Grande do Sul, para tanto foi elaborado um questionário composto por questões abertas e questões do tipo fechadas. Um questionário foi desenvolvido para caracterizar as unidades produtoras de alevinos do estado do Rio Grande do Sul. Dezesesseis das dezoito unidades responderam o questionário entre setembro de 2011 a fevereiro de 2012. A análise mostra que os alevinos de jundiá (*Rhamdia sp.*) e carpa capim (*Ctenopharigodon idella*) são os mais produzidos pelas unidades produtoras de alevinos visitadas. Ele também mostrou que a produção de alevinos é um importante elo da cadeia produtiva da piscicultura do estado do Rio Grande do sul, gerando renda e emprego. Verificou-se que muitos empreendimentos apresentam falhas na gestão de funcionários. Constatou-se também que muitas práticas de gestão são insuficientes, particularmente no que diz respeito à qualidade da água e reprodução. Portanto, deve haver um monitoramento e controle dos parâmetros físicos e químicos da qualidade da água na produção de alevinos. Além disso, não há nenhum controle da qualidade e origem dos animais utilizados como reprodutores. Portanto sugere-se a realização de um programa de melhoramento genético para o desenvolvimentos de melhores matrizes para o aumento da produtividade das espécies que estão sendo usadas para piscicultura no estado. Estas observações reforçam a necessidade de implementação de esforços conjuntos entre pesquisa, extensão e governo, a fim de contribuir para a melhoria do setor produtivo do Estado do Rio Grande do Sul. No entanto, a aplicação de novas tecnologias

de produção e de gestão que busquem reduzir os custos de produção deve levar em conta a realidade local das unidades produtoras de alevinos.

**Palavras chave:** cadeia produtiva, alevinagem e análise sócio-econômica.

### **Characterization of units producing fingerlings of state Rio Grande do Sul, Brazil**

#### **ABSTRACT**

The aim of this study was to characterize the units producing fingerlings state of Rio Grande do Sul, to both was drafted a questionnaire consisting of open-ended questions and questions yes or not. A questionnaire (ou form) was developed to characterize units producing fingerlings from Rio Grande do Sul state. Sixteen out of eighteen hatcheries answered the form between September 2011 and February 2012. The analysis shows that silver catfish fingerlings (*Rhamdia sp.*) and grass carp (*Ctenopharigodon idella*) are the most produced by hatcheries visited. It also showed that the production of fingerlings is an important link in the production chain of fish farming in the state of Rio Grande do Sul, generating income and employment. It was observed that many hatcheries have failures in managing employees. It was also found that many management practices are inadequate, particularly with respect to water quality and reproduction. So there must be widespread among producers the importance of monitoring and control of physical and chemical parameters of water quality in the production of fingerlings. Furthermore, there is no control of the quality and origin of animals are used as breeding stock. Therefore, it is suggested to carry out a breeding program for the development of improved strains for increased productivity of the species that are used in fish farming in the state. These observations reinforce the need for implementation of joint efforts among research, extension and government, in order to contribute to the improvement of this productive sector of the state of Rio Grande do Sul. However, the application of new production technologies and management that seek to reduce the costs of production must take into account the local reality of hatcheries.

**Key words:** production chain, fingerlings production and socio-economic analysis

## 1 INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul destaca-se no cenário da piscicultura continental brasileira como o maior produtor no último triênio (2008 a 2010) de acordo com a avaliação do Ministério da Pesca e Aquicultura (BRASIL, 2012), sendo que no ano de 2010 a produção piscícola do estado foi de 55.066,04 toneladas de pescado, o que representa um incremento de 13,68% na produção em relação ao ano de 2009. Apesar deste cenário favorável, o estado do Rio Grande do Sul não possui um levantamento ou dados consistentes sobre as unidades produtoras de alevinos, disponibilidade e demanda de alevinos; assim como informações sobre a assistência técnica prestada aos produtores, condições de cultivo, número e origem dos reprodutores das principais espécies de peixes produzidas no estado.

Estas informações são relevantes para traçar estratégias, diagnosticar possíveis problemas e apontar soluções para o setor, o qual, juntamente com as fábricas de ração, são os primeiros elos da cadeia produtiva do pescado. A assistência técnica especializada, manejo adequado dos reprodutores e disponibilidade de alevinos são etapas a serem cumpridas, para uma produção eficiente e competitiva.

Neste contexto, SCORVO-FILHO et al. (2010) alertam para ausência de dados atualizados sobre os laboratórios de produtores de alevinos no Brasil. O autor supracitado ainda afirma que para o bom planejamento da atividade, a obtenção de informações sobre a produção nacional de alevinos, assim como as condições de instalação dos laboratórios de reprodução são essenciais.

Diante do cenário de crescimento na produção piscícola do estado do Rio Grande do Sul e da carência de informações sobre Unidades Produtoras de Alevinos (UPAs) do estado, o objetivo deste estudo foi caracterizá-las, quanto à distribuição geográfica, números de produção, instalações, sanidade e tecnologia de produção e manejo empregados.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

A partir da revisão de literatura em periódicos nacionais e internacionais sobre as boas práticas de manejo preconizadas para unidades produtoras de alevinos, foi elaborado um questionário composto por questões abertas e fechadas.

O questionário foi subdividido em questões referentes às características técnicas das unidades produtoras de alevinos (localização, área da propriedade, número de funcionários e tempo de atuação como produtor de alevinos e etc), assistência técnica prestada aos

produtores, condições dos viveiros, origem e destino da água utilizada no cultivo, sanidade de alevinos e reprodutores, plantel de reprodutores, condições e manejo empregado nos laboratórios de reprodução, larvicultura e alevinagem e número de alevinos produzidos na safra 2010/2011.

A aplicação do questionário foi realizada com dezoito produtores de alevinos do estado do Rio Grande do Sul registrados como ativos junto a Empresa de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER-RS) entre os meses de setembro de 2011 e Fevereiro de 2012. Os dados coletados foram tabulados em planilha *Excel* e submetidos à análise estatística descritiva (média e desvio padrão), nos casos necessários.

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Levantamento e distribuição geográfica das UPAs**

No levantamento do número de UPAs (Tabela 1) e sua distribuição (Figura 1) no estado do Rio Grande do Sul foi identificado que 50% dos empreendimentos estão localizados na região noroeste do estado, 31,25% na região central e 18,17% na leste. Entre os piscicultores entrevistados a média de tempo (anos) que atuam na produção de alevinos é 18,25 anos ( $\pm 3,7$ ). Estes resultados podem ser interpretados que esta atividade é explorada de forma comercial no estado do Rio Grande do Sul continuamente, sendo que em 100% das UPAs visitadas possuem a produção de alevinos como a principal fonte de renda.

TABELA 1- Municípios do estado do Rio Grande do sul que possuem unidades produtoras de alevinos-UPAs (safra 2010/2011).

Municípios	Nº de UPAs/Município
Aiuricaba	1
Cruzeiro do Sul	2
Ijuí	1
Frederico Westphalen	1
Mato Leitão	1
Passo do Sobrado	1
Passo Fundo	1
Pejussara	1
Seberi	1
Sentinela do Sul	1
Silveira Martins	1
Tapejara	1
Teutônia	1
Terra de Arreia	1
Três de Maio	1
São João do Polêsine	1
Viamão	1
Victor Graeff	1
Total	18

Fonte: dados da pesquisa (2010/2011)

Um dos principais fatores que podem explicar o maior número de UPAs na região noroeste do estado são as condições climáticas favoráveis para o desenvolvimento da piscicultura em comparação a outras regiões do estado do Rio Grande do Sul, visto que na região noroeste encontram-se as maiores precipitações médias do estado (1500 – 1800 mm de chuva/ano) e temperaturas médias anuais (16 – 20° C), (KUINCHTNER & BURIOL, 2001). Outro fator que deve ser considerado neste contexto é afirmação de AUOZANI et al. (2007); os autores atribuem o desenvolvimento do setor na região nordeste a uma organização histórica a partir de um amplo trabalho de mobilização e articulação das mais diferentes entidades da região e do Estado, com apoio de Universidades. Cabe ainda ressaltar que nesta região houve a formação de um Pólo a partir de um Comitê de Gerenciamento amplamente representado, em duas vertentes: (a) articulação institucional, garantindo contornos políticos e jurídicos e (b) trabalho de caráter técnico científico e empresarial para contemplar a cadeia do peixe (AUOZANI et al., 2007). O modelo desenvolvido na região nordeste do Rio Grande do Sul surtiu efeito, e talvez pudesse ser utilizado para consolidar a piscicultura nas demais regiões.

Outro fenômeno observado é a ausência de UPAs nas regiões oeste e sul do estado do Rio Grande do Sul, umas das prováveis causas para esta ausência relaciona-se com a forte



tradição da bovinocultura de corte no meio rural destas regiões (RIO GRANDE DO SUL, 2006). PIEDRAS & BAGER (2007), em estudo de caracterização da aquicultura da região sul do estado do Rio Grande do Sul concluíram que a piscicultura na maioria dos municípios da região, é desenvolvida de forma artesanal como atividade complementar na propriedade e alimentação familiar, sem nenhuma importância econômica na geração de emprego e renda. Esta conclusão dos autores supracitados é outro evento que pode explicar ausência de UPAs na região já que a demanda por alevinos é baixa.

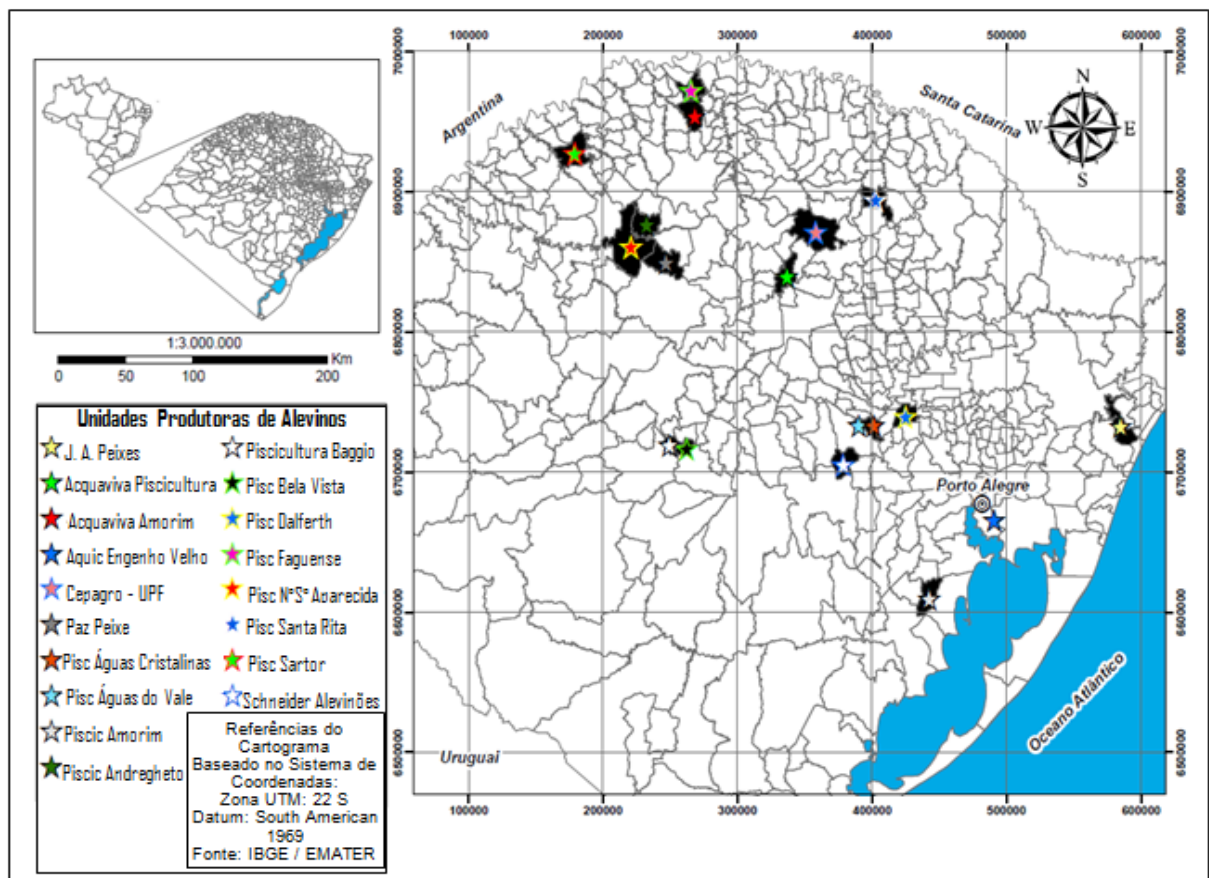


FIGURA 1 – Distribuição geográfica das unidades produtoras de alevinos do estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011.

Fonte: dados da pesquisa

### 3.2 Instalações, mão de obra e equipamentos das UPAs

A análise dos indicadores de instalações (Tabela 2) das UPAs do estado do Rio Grande do Sul, revelou que há uma grande variação na área total das propriedades (ha) entre as UPAs, o mesmo é observado para área total de lâmina d' água disponível para a produção de alevinos o que representa consequência direta na capacidade de produção das UPAs. POLI, GRUMANN & BORGHETTI (2000) relatam que o estado do Rio Grande do Sul possuía 50 hectares de lâmina d' água no total destinados à produção alevinos. Todavia, no presente

estudo foi possível constatar que a área total destinada para alevinagem na safra 2010/2011 aumentou em 2,8 vezes em relação ao ano de 2000; passando para 140,4 hectares, situação que condiz com o contínuo crescimento da produção (kg) da piscicultura do estado a partir do ano 2007 (BRASIL, 2012).

No presente estudo foi possível observar que o número total de viveiros das UPAs (Tabela 2) do estado do Rio Grande do Sul é de 497, sendo 85,3% (424 viveiros) deste total são utilizados para a alevinagem e 14,7% (73 viveiros) empregados na estocagem de reprodutores e matrizes. Apesar do maior número de viveiros serem utilizados para alevinagem, observou-se que os viveiros de estocagem de reprodutores e matrizes possuíam aproximadamente o dobro da área (2016,6 m<sup>2</sup>) empregada na alevinagem (1016,6 m<sup>2</sup>). Diante deste fato vale mencionar que a área de viveiros (m<sup>2</sup>) para reprodutores e matrizes preconizadas pelas boas práticas de manejo deve estar entre 300 a 600 m<sup>2</sup>, não sendo recomendados viveiros com grandes dimensões, como os observados nas UPAs consultadas. O tamanho demasiado dificulta a captura e seleção dos reprodutores podendo causar estresse dos mesmos e desencadear o processo de regressão dos gametas (SENHORINI & LANDINES, 2005).

No que diz respeito à mão-de-obra utilizada nas UPAs consultadas pelo presente estudo 19% (3 UPAs) utilizam mão-de-obra exclusivamente familiar, sendo que os demais empreendimentos (81% das UPAs) contratam funcionários. A mão-de-obra na produção de alevinos é um importante indicador socioeconômico, pois representa o principal item de custo na produção de alevinos (BARROS, 2005; JOMORI et al., 2005). Observou-se ainda, que as UPAs consultadas no estado do Rio Grande do Sul empregam um total 39 funcionários o que corresponde a 4,33 funcionários/hectare de lâmina d' água.

Outra informação relevante sobre as instalações das UPAs pesquisadas (Tabela 2), é o baixo nível de viveiros destinados a quarentenários, apenas 25% das UPAs os possuem. Os quarentenários são viveiros mantidos em isolamento das demais instalações e equipamentos da propriedade destinados a alevinos ou reprodutores adquiridos recentemente de outros empreendimentos ou natureza. Estes quarentenários possuem a finalidade de manter estes animais em um período de isolamento para mitigar o risco de introdução de doenças no empreendimento (BRASIL, 2012).

A estrutura física das UPAs de um modo geral, atende a necessidade imediata para a qual é destinada. Pois, foi verificado que 25% das UPAs consultadas possuem monges nos viveiros (Tabela 2). Vale destacar que é um eficiente sistema de controle do nível de água dos

viveiros e esgotamento dos mesmos, quando comparados aos demais sistemas como os canos de PVC ou “cachimbos”, porém apresentam maior custo na sua construção, visto que possuem estrutura de alvenaria (RIBEIRO et al., 2001). Também foi observado que 25% das unidades visitadas possuem aeradores (Tabela 2), acionados apenas em situações de emergência (baixos níveis de oxigênio dissolvido (mg/L)), principalmente durante a noite e madrugada. Este fato pode indicar que nas UPAs do Rio Grande do Sul há uma prática de utilização de altas densidades de estocagem (alevinos/m<sup>2</sup>) ou até mesmo falhas no manejo da utilização da água para o cultivo por estas UPAs. Todas as UPAs visitadas possuem tanques de alvenaria para o manejo de indução hormonal reprodutiva. Esta instalação é de grande importância, uma vez que matrizes e reprodutores necessitam ficar acondicionados nestes locais, onde o período crítico relacionado ao estresse dos animais deve ser minimizado, a fim de se evitar a regressão dos gametas e mortalidade dos animais pós manejo reprodutivo (URBINATI & CARNEIRO, 2004).

TABELA 2 – Indicadores das instalações e equipamentos das UPAs do estado do Rio Grande do Sul safra 2010/2011.

Indicadores das instalações e equipamentos	Total	Média	Desvio padrão (±)
Área da propriedade (ha)	839	69,9	92,4
Lâmina d' água (ha)	140,4	11,7	13,0
Número de funcionários	39	4,33	4,0
Porcentagem de UPAs com quarentenário (%)	25	-	-
Porcentagem de UPAs com monge nos viveiros (%)	25	-	-
Porcentagem de UPAs que utilizam aeradores (%)	25	-	-
Número de viveiros utilizados para alevinagem (un)	424	35,33	26,8
Área dos viveiros de alevinagem (m <sup>2</sup> )	1.086,4	1016,6	686,0
Nº de viveiros utilizados na estocagem de reprodutores (un)	73	6,08	2,39
Área dos viveiros para a estocagem de reprodutores (m <sup>2</sup> )	351.577	2016,6	1068,4
Profundidade dos viveiros das UPAs (m)	-	1,49	0,34
Área dos laboratórios de reprodução e larvicultura (m <sup>2</sup> )	-	108	105
Número de tanques de indução a reprodução	-	4	2
Volume dos tanques de indução a reprodução (m <sup>3</sup> )	-	2125	801
Número de incubadoras tipo Woynarovich de 60 litros	101	16,8	5,2
Número de incubadoras tipo Woynarovich de 200 litros	87	9,6	4,5
Número de incubadoras tipo vidro de McDonald de 9 litros	60	-	-
Porcentagem de UPAs com microscópio estereoscópico (%)	75	-	-
Porcentagem de UPAs com caixa de transporte para peixe vivo (%)	100		

Fonte: dados da pesquisa

O número total de incubadoras para ovos e larvas disponíveis nas UPAs do estado do Rio Grande do Sul (Tabela 2), pode ser considerado adequado (248 unidades, média de 15,5 incubadoras/ UPAs). Porém, 37,5% dos produtores entrevistados não sabem informar a vazão (litros/min) e densidade de ovos (gramas/litro) empregados durante o processo de incubação dos ovos. O desconhecimento dessas informações pode resultar no comprometimento do processo de incubação de ovos e larvas destas UPAs; uma vez que, cada tipo de incubadora requer uma determinada vazão (litros/min) para a remoção da amônia originada pelo desenvolvimento embrionário no interior das incubadoras e promover a oxigenação necessária para o desenvolvimento de embriões, larvas e pós-larvas (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983). A utilização de vazões inadequadas pode promover injúrias físicas ao córion dos

embriões e deformações em larvas e pós-larvas (GUERREIRO et al., 2011). O desconhecimento da densidade de ovos (gramas/litro) utilizada nas incubadoras por parte dos produtores pode subutilizar a capacidade das incubadoras ou ainda utilizar densidades de ovos superiores à capacidade das mesmas.

Quanto aos equipamentos que são utilizados nas UPAs, foi verificado que 75% possuem microscópio estereoscópico, utilizado para o monitoramento correto das taxas de fertilização e eclosão. Estas informações são essenciais para a estimativa de pós-larvas produzidas durante a safra, sendo que a partir deste valor, é possível planejar o número de viveiros necessários para estocagem das pós-larvas, utilização de fertilizantes e ração. Ainda sobre o monitoramento das taxas de fertilização e eclosão, 100% dos produtores entrevistados afirmam que o realizam. Outro equipamento essencial para uma unidade produtora de alevinos é a caixa de transporte de peixes vivo; sendo que 100% das UPAs visitadas possuem o referido equipamento, que além de facilitar manejos internos das UPAs, como transportes de reprodutores e transferência de alevinos entre viveiros, podem ser utilizadas na comercialização e entrega de alevinos diretamente aos clientes.

### **3.3 Grau de escolaridade dos piscicultores**

Verificou-se que o grau de escolaridade dos produtores de alevinos (Figura 2) entrevistados pode ser considerado elevado, visto que 8% dos produtores entrevistados possuem pós-graduação, 17% ensino superior e 33% ensino técnico. O bom índice de escolaridade verificado no estudo pode ser considerado vantajoso, apesar de nenhum produtor possuir formação técnica na área de piscicultura; pois proporciona condições aos produtores de procurar e entender os novos conceitos que regem a produção de animais aquáticos (ROTTA, 2003). Este fato, pode explicar ainda o elevado número de produtores que informaram receber assistência técnica em suas UPAs, visto que 75% dizem receber assistência técnica especializada em piscicultura. Entretanto 67% dos piscicultores não sabem informar a área de formação dos técnicos responsáveis pela assistência prestada.

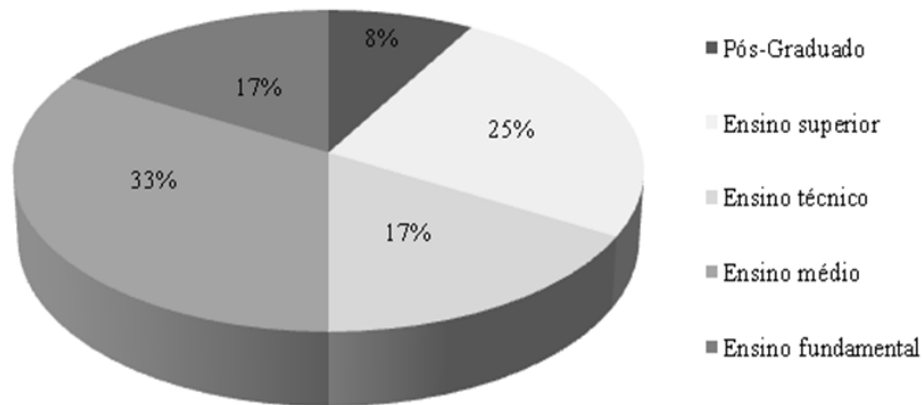


FIGURA 2 – Grau de escolaridade dos produtores de alevinos entrevistados do estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011.

Fonte: dados da pesquisa

### 3.4 Origem e monitoramento qualidade da água nas UPAs

Conhecer a origem da água utilizada na produção de larvas e pós-larvas, é considerada uma premissa básica antes mesmo da construção do laboratório de reprodução, local onde serão incubados e produzidos ovos, larvas e pós-larvas. Não só para o conhecimento do volume de água (litros ou m<sup>3</sup>) disponível na propriedade, mas também porque os parâmetros físico-químicos da água podem variar dependendo da origem (nascente, poços, rios e chuva).

No presente estudo foi verificado que 42% das UPAs consultadas (Figura 3), utilizam água de nascentes sem represamento. As águas proveniente de nascentes podem conter altos níveis de ferro (Fe<sup>3+</sup>) que quando em contato com o oxigênio precipita na forma de hidróxido de ferro – Fe (OH)<sub>3</sub>, que pode recobrir o córion impedindo as trocas gasosas do embrião. Assim recomenda-se que águas com esta característica sejam submetidas a um repouso em reservatórios para decantação do hidróxido de ferro, antes de serem usadas no abastecimento das incubadoras (KUBITZA, 2004).

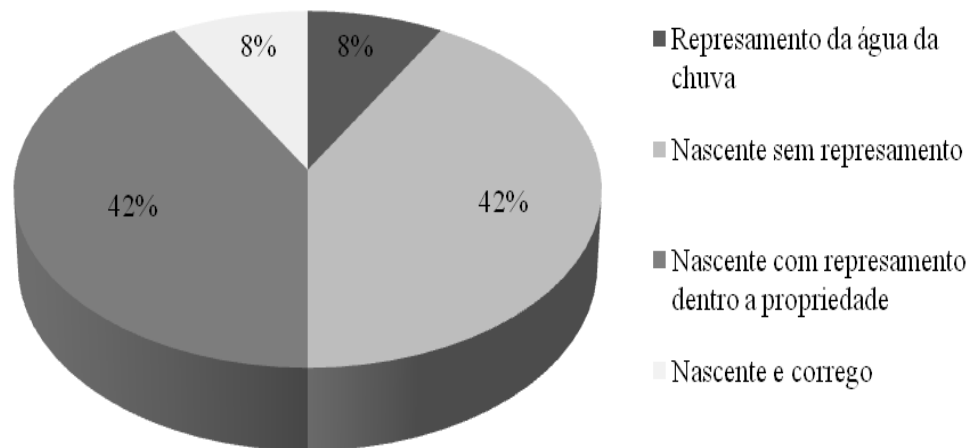


FIGURA 3 - Origem da água utilizada nas UPAs no estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011.

Fonte: dados da pesquisa

Entre as UPAs visitadas, 83% realiza algum tipo de análise para monitoramento dos parâmetros físico-químicos da água utilizada no cultivo dos viveiros; porém, nenhuma UPA realiza a análise na frequência recomendada pelas boas práticas de manejo para produção de alevinos; e apenas uma UPA realiza a análise de parâmetros preconizados pelas boas práticas de manejo para produção de alevinos. Diagnosticou-se que 50% das UPAs utilizam tanques de decantação de efluentes, mas não monitoram os parâmetros físico-químicos dos mesmos e 50% das UPAs despejam a água utilizada no cultivo diretamente na natureza.

O aparente descaso observado nas UPAs consultadas com o monitoramento dos parâmetros físico-químicos de qualidade de água, também foi observado por BARROS et al. (2011) em estudo de caracterização da piscicultura da microrregião da baixada cuiabana, onde 62,5% dos piscicultores realizam algum tipo de monitoramento, mas apenas quando algum problema é diagnosticado visualmente nos viveiros. Diante dos resultados expostos nas UPAs consultadas, observa-se que os produtores não aplicam as boas práticas de manejo a fim de monitorar e manter a qualidade da água utilizada no cultivo, o que pode trazer prejuízos econômicos em função da queda na produtividade e prejuízo ambiental, devido ao desconhecimento das condições do efluente que está sendo emitido para a natureza, o que pode gerar autuações por parte de órgãos ambientais.

Deve-se destacar ainda a importância gerencial do monitoramento da qualidade de água para as UPAs, uma vez que auxilia na obtenção de informações para a tomada de decisão, necessárias para o controle e avaliação da produção. Com tais informações, é

possível visualizar falhas nos processos e dispêndios no sistema produtivo, gerando condições ao produtor de priorizar e dirigir os esforços de melhoria destes pontos.

### 3.5 Incidência de doenças nas UPAs

A incidência de doenças na safra 2010/ 2011 relatada pelos piscicultores entrevistados foi 58% (Figura 4), sendo que dentre as principais enfermidades citadas foram a lerneose, ictiofitiríase, ataque de fungos e bacterioses. Vale destacar, que 42% dos produtores de alevinos (Figura 4) relatam a incidência de ictiofitiríase e lerneose em todas as fases (reprodutores, pós-larvas e alevinos) de desenvolvimento do jundiá (*Rhandia quelen*).

A ictiofitiríase ou popularmente conhecida como “ictio” é causada pelo protozoário ciliado *Ichthyophthirius multifiliis*, e segundo CARNEIRO et al. (2005), o estabelecimento de um pacote tecnológico para a criação desta espécie em cativeiro, passa pelo desenvolvimento de técnicas de controle do “ictio”, principalmente durante as primeiras semanas de vida do jundiá. Dentre as condições que favorecem os surtos de “ictio” estão as baixas temperaturas que ocorrem no estado do Rio Grande do Sul e as baixas concentrações de oxigênio dissolvido na água de cultivo (MORAES & MARTINS, 2004). Novamente ressalta-se a importância do monitoramento constante dos parâmetros físico-químicos de qualidade da água como aumento da eficiência produtiva dos alevinos.



FIGURA 4 – Incidência de doenças nas unidades produtoras de alevinos consultadas no estado do Rio Grande do Sul, safra 2010/2011.

Fonte: dados da pesquisa

A lerneose ocasionada pelo crustáceo copépodo *Lernea cyprinacea*, introduzido no Brasil através de aquisição de carpas da Hungria, atualmente encontra-se distribuído por todo o território brasileiro, sendo considerado um dos parasitos que maiores prejuízos trouxeram à piscicultura (MORAES & MARTINS, 2004). De todo modo, a principal forma de prevenção



para esta enfermidade é impedir a contaminação ambiental e o transporte de animais parasitados (MORAES & MARTINS, 2004), destacando a importância dos quarentenários para as unidades produtoras de alevinos.

### **3.6 Manejo reprodutivo e plantel de reprodutores e matrizes**

Todas as UPAs consultadas utilizaram o extrato bruto de hipófise (EBH) na indução à reprodução de seus reprodutores na safra 2010/2011 (exceto reprodutores e matrizes de tilápia da linhagens tailandesa e Gift), sendo que o consumo total deste insumo no período foi de 32 gramas (média:  $1,78 \pm 1,05$ g). No que diz respeito ao protocolo de indução hormonal, 100% das UPAs utilizam duas aplicações de EBH na indução hormonal nas fêmeas (4,5 mg de EBH/kg) e um nos machos (2 mg de EBH/kg). O extrato bruto de hipófise é um insumo importado de alto custo e que o valor do grama pode flutuar de acordo com a cotação do dólar (US\$), portanto necessita ter sua utilização otimizada a fim de diluir seu custo.

Durante a safra 2010/2011, as UPAs visitadas do estado Rio Grande do Sul utilizaram reprodutores e matrizes de 18 espécies (Tabela 3). Por outro lado, durante as visitas foi observado que 25% das UPAs produzem espécies ornamentais, mas devido a grande variedade de nomes populares e comerciais que estas apresentam, o presente estudo as agrupou em apenas uma categoria. Ainda, foi verificado que o número total de animais que compõe os plantéis de reprodutores e matrizes das UPAs é de 27.384 animais; excluindo-se os plantéis de lambari (*Astynax* sp.) este número reduz para 8.804 animais. Foi observado também, uma baixa taxa de utilização dos reprodutores e matrizes durante a safra 2010/2011, visto que a taxa média de animais utilizados durante este período (Tabela 3) (excluindo-se os plantéis de lambari) foi de 25,78%.

A baixa taxa de utilização dos animais disponíveis é uma prática comum das UPAs de um modo geral e pode ser confirmado pelo presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados por GUERREIRO (2012) em plantéis comerciais de reprodutores e matrizes de tambaqui (*Colossoma macropomum*) no estado de Rondônia, a subutilização dos animais do plantel, pode apresentar implicações econômicas para os produtores, segundo o autor supracitado, subutilizar o plantel resulta em dispêndios desnecessários com alimentação (ração e mão-de-obra), espaço utilizado (devido ao elevado número de animais estocados) e disponibilidade de água para a manutenção de reprodutores, que em alguns casos nunca serão utilizados.

TABELA 3 – Número total de reprodutores e matrizes/espécie, número de peixes induzidos/espécie na safra 2010/2011 e porcentagem de animais induzidos/espécie, das UPAs no estado do Rio Grande do Sul.

Espécies	Nº total de reprodutores e matrizes/espécies	Nº de peixes induzidos na safra 2010/2011	Porcentagem de animais utilizados na safra 2010/2011 /espécie (%)
Carpa Capim ( <i>Ctenopharigodon idella</i> )	780	176	23
Carpa Cabeça Grande ( <i>Aristichthys nobilis</i> )	304	51	17
Carpa Prateada ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	316	87	28
Carpa Húngara ( <i>Cyprinus carpio</i> )	719	247	34
Carpa Ornamental ( <i>Cyprinus carpio</i> )	239	153	64
Espécies ornamentais	1500	10	1,0
Tilápia linhagem tailandesa ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	400	30	8,0
Tilápia linhagem Gift ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	400	25	6,0
Jundiá ( <i>Rhamdia sp.</i> )	2360	1075	46
Traíra ( <i>Hoplias malabaricus</i> )	455	120	26
Trairão ( <i>Hoplias lacerdae</i> )	216	55	25
Lambari ( <i>Astynax sp.</i> )	18.580	11.050	59
Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	322	88	27
Grumatã ( <i>Prochilodus sp.</i> )	205	30	15
Piava ( <i>Leporinus sp.</i> )	370	80	22
Piauçu ( <i>Leporinus macrocephalus</i> )	120	25	21
Dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> )	65	10	15
Pintado ( <i>Pseudoplatystoma sp.</i> )	33	8	24
Total	27.384	13.320	-

Fonte: dados da pesquisa

No Rio Grande do Sul é comum a obtenção de alevinos e reprodutores de pisciculturas de outras regiões do Brasil (BALDISSEROTTO, 2009). Diante deste fato os produtores de alevinos foram questionados sobre a origem dos animais que compõe os plantéis, sendo

verificado que 83% dos produtores afirmam conhecer a origem dos reprodutores e matrizes. A taxa de produtores que relatam a aquisição de reprodutores e matrizes de fora de seus empreendimentos é de 81,2%, sendo que deste total, 62% dizem adquirir animais de outras regiões do estado e 38% de outros estados principalmente de Santa Catarina, Paraná e São Paulo. Esta prática de introdução de material genético autóctone pode produzir resultados desastrosos, como, por exemplo, introgressão genética (JACOMETO et al., 2010) e a introdução de parasitas não autóctones (MORAES & MARTINS, 2004).

Neste contexto, merece ser destacado que não há nenhum estudo ou levantamento sobre as características genéticas dos plantéis de reprodutores no Rio grande do Sul, desconhecendo-se o grau de homozigose ou mesmo como são montados os cruzamento dos reprodutores. Desta forma, é necessário à realização de estudos para a implementação de estratégias e medidas, tais como: Obtenção de reprodutores de procedência de bacias hidrográficas das mesmas regiões onde as pisciculturas estão localizadas; rastreabilidade dos plantéis através de transponders eletromagnéticos; e, restrição da entrada de exemplares de outros estados deve e é necessária para um bom planejamento. Deve-se destacar que estas informações são essenciais para que programas de melhoramento genético das espécies produzidas no estado do Rio Grande do Sul possam ser realizados, seja ela nativa ou exótica.

### **3.7 Larvicultura e alevinagem**

Durante a fase de larvicultura interna, todas as UPAs consultadas alimentavam as pós-larvas nas incubadoras, sendo que 87,5% oferecem gema de ovo crua e ou cozida e 12,5% plâncton. Vale ressaltar que as pós-larvas de carpas e peixes nativos, possuem o trato digestório indiferenciado, ou seja, ausência de algumas enzimas digestivas e desta forma não consegue utilizar alimentos artificiais de imediato. Estas pós-larvas necessitam ingerir organismos vivos como primeiro alimento, pois as enzimas presentes nestes organismos auxiliam a digestão do alimento ingerido e estimulam o desenvolvimento do trato digestório das pós-larvas, sendo estas espécies classificadas como altriciais (GUEVARA, 2003).

Dietas artificiais como a gema de ovo oferecida as pós-larvas pelos produtores de alevinos das UPAs consultadas, podem ser oferecidas apesar do fato do trato digestório indiferenciado, pois estimulam o desenvolvimento de microorganismos sobre as partículas orgânicas das dietas artificiais, enriquecendo o alimento ingerido (WOYNAROVICH & HORVATH, 1983). Entretanto, a utilização de dietas artificiais pode gerar um incremento de matéria orgânica nas incubadoras, favorecendo a presença de fungos, bactérias patogênicas e

protozoários parasitos (KUBITZA, 2004). Desta forma a sua utilização deve ser criteriosa e acompanhada de limpezas frequentes a fim de remover sobras destas dietas no interior das incubadoras.

A fertilização dos viveiros de alevinagem é realizada através de adubação química em 31% das UPAs, adubação orgânica em 19% e adubação mista em 50% do total visitadas. A adequada fertilização dos viveiros de alevinagem é destacada por OLIVEIRA et al. (2004) como um dos principais fatores que irão determinar o sucesso do processo. Pois irá influenciar nas condições de qualidade de água dos viveiros proporcionando a produção de fitoplâncton e zooplâncton, primeiras formas de alimento das pós-larvas.

Um indicador relevante para a piscicultura praticada de forma intensiva é a utilização de ração extrusada na alimentação dos peixes de forma racional. Este fato foi observado em 81,2% das UPAs, onde a utilização da ração extrusada é fornecida aos alevinos levando-se em consideração a biomassa de estocagem de alevinos dos viveiros, para tanto, todos os produtores informam que realizam biometrias periódicas para o reajuste do fornecimento da quantidade de ração e classificação dos alevinos. O fornecimento de ração é realizado conforme o consumo dos alevinos em 18,7% das UPAs. Muito embora sejam regiões distintas do Brasil, os resultados do presente estudo, são semelhantes aos observado por BARROS et al. (2011), onde a maioria dos produtores na microrregião da baixada cuiabana realizam o controle do fornecimento da ração através da biomassa de estocagem dos viveiros. Vale ressaltar, que o controle do arraçamento é preconizado pelas boas práticas de manejo a todos os tipos de empreendimentos piscícolas, diante da importância que a ração representa do ponto de vista ambiental e no custo de produção.

O tempo médio entre as biometrias é 28,33 dias ( $\pm 10,37$ ). Verificou-se, que algumas UPAs realizam biometrias e classificação dos alevinos com frequência abaixo da recomendada pelas boas práticas de manejo, sendo que CECCARELLI, SENHORINI & VOLPATO (2000) preconizam uma frequência com intervalo entre 20 a 30 dias dependendo da espécie e tamanho dos alevinos.

Dentre os produtores entrevistados 93,75% afirmam utilizar rações com teor de proteína bruta acima de 40% durante a alevinagem, esta prática é considerada adequada por PEZZATO et al. (2004) visto que nas fases iniciais de vida dos peixes, a exigência de níveis mais elevados de proteína em suas dietas são preconizadas.

### 3.8 Produção e comercialização de alevinos

A produção total de alevinos na safra 2010/2011 (Tabela 4) foi 13.570.000, sendo que o peso médio dos alevinos comercializados pelas UPAs foi de 9,36 gramas ( $\pm 8,39$ ), porém, deve-se destacar que 37,5% das UPAs consultadas não sabem informar o número de alevinos produzidos. Este fato pode ser considerado uma grave falha gerencial destes empreendimentos, visto que as informações de produção total de alevinos e de cada espécie comercializada são essenciais para o planejamento e gerenciamento destes empreendimentos. Estes valores passam a ser cruciais, pois auxilia na obtenção dos custos de produção, receita bruta e líquida de todo o empreendimento e dos alevinos comercializados de cada espécie durante as safras. Em função desta realidade, no presente estudo optou-se por não calcular a relação de quilo de pescado produzido no estado do Rio Grande do Sul na safra 2010/2011 por alevino. Todavia, esta informação é um importante indicador da demanda de alevinos exigida pela cadeia produtiva no estado.

A produção de alevinos do estado do Rio Grande do Sul informada por POLI et al. (2000), era 38 milhões. Entretanto, estes autores afirmam que este número estimado foi levantado em função da inexistência do acompanhamento oficial e/ou privado (associações) de um importante segmento da cadeia produtiva da piscicultura. Esta observação reforça a importância da realização de levantamentos estatísticos oficiais, constantes e específicos para cadeia produtiva da piscicultura no estado do Rio Grande do Sul. Neste mesmo contexto, SCORVO-FILHO et al. (2010), alertam para ausência de informações atualizadas sobre o número de unidades produtoras de alevinos no Brasil, e que a publicação dos dados obtidos com o Censo Aquícola, que vem sendo realizado pelo Ministério da Pesca e Aquicultura, poderão trazer a luz estas tão importantes informações.

TABELA 4 – Espécies produzidas, estimativa de unidades de alevinos produzidos/espécie (Uni), porcentagem de produção de alevinos/espécie, preço médio do milheiro (R\$) e desvio padrão (R\$ ±) da safra 2010/2011 no estado do Rio Grande do Sul.

Espécies produzidas	Nº alevinos produzidos safra 2010/2011 (Uni)	Total de alevinos produzidos (%)	Nº de UPAs que produzem	Preço médio do milheiro R\$	Desvio Padrão (R\$ ±)
Carpa Capim ( <i>Ctenopharigodon idella</i> )	4.580.000	33,7	10	222,00	115,45
Carpa Cabeça Grande ( <i>Aristichthys nobilis</i> )	990.000	7,3	9	188,89	85,76
Carpa Prateada ( <i>Hypophthalmichthys</i> )	1.120.000	8,2	9	188,89	85,76
Carpa Húngara ( <i>Cyprinus carpio</i> )	1.130.000	8,3	9	188,00	61,61
Carpa Ornamental ( <i>Cyprinus carpio</i> )	220.000	1,6	6	400,00	312,66
Espécies ornamentais	140.000	1,0	4	610,00	326,98
Tilápia linhagem tailandesa ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	850.000	6,2	3	86,25	26,23
Tilápia linhagem Gift ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	650.000	4,7	2	123,75	28,30
Jundiá ( <i>Rhamdia sp.</i> )	2.300.000	16,9	10	234,00	132,93
Traíra ( <i>Hoplias malabaricus</i> )	160.000	1,18	5	425,00	274,51
Trairão ( <i>Hoplias lacerdae</i> )	105.000	0,77	6	541,67	348,91
Lambari ( <i>Astynax sp.</i> )	775.000	5,7	7	138,57	59,87
Pacu ( <i>Piaractus mesopotamicus</i> )	330.000	2,4	5	280,00	168,08
Grumatã ( <i>Prochilodus sp.</i> )	70.000	0,52	4	172,50	98,41
Piava ( <i>Leporinus sp.</i> )	90.000	0,66	2	250,00	154,11
Piauçu ( <i>Leporinus macrocephalus</i> )	40.000	0,29	2	215,00	109,08
Dourado ( <i>Salminus brasiliensis</i> )	15.000	0,11	2	5500,00	2559,99
Pintado ( <i>Pseudoplatystoma sp.</i> )	5.000	0,04	1	6000,00	-
Total	13.570.000	100	-	-	-

Fonte: dados da pesquisa

Entre as espécies produzidas pelas UPAs, a carpa capim e o jundiá merecem destaque por representarem 33,7% e 16,9% da produção total, respectivamente (Tabela 4), sendo que juntas correspondem a 50,7% da produção de alevinos das UPAs visitadas. No que diz respeito à produção de carpas, sendo três espécies (carpa capim, carpa cabeça grande e carpa prateada) e duas variedades (carpa húngara e carpa ornamental), estas juntas correspondem a 59,1% da produção de alevinos. Estes dados denotam a importância destas espécies para a cadeia produtiva da piscicultura do Rio Grande do Sul, já que de acordo com POLI, GRUMANN & BORGHETTI (2000) e BALDISSEROTTO (2009), o Estado é o maior produtor brasileiro de carpas. Vale ressaltar ainda, que BALDISSEROTTO (2009) relata que o jundiá é a espécie nativa do Rio Grande do Sul com significativa importância, possui grande interesse econômico para pesca artesanal, sendo a segunda espécie nativa mais capturada no estado no ano de 2004, com 395 toneladas (BRASIL, 2005), fato que justifica a sua produção em cativeiro.

Neste estudo, evidenciou-se que o número médio de espécies comercializadas pelas UPAs é de 10,3 ( $\pm 2,26$ ). Neste cenário de produção com várias espécies observado nas UPAs do estado do Rio Grande do Sul, condiz com os dados apresentados por SUPPLY (2007) no ano de 2005 em 175 laboratórios de reprodução de peixes consultados em todo o Brasil. Neste caso, a produção conjunta foi 617,5 milhões de alevinos sendo que deste total 42,3% (261 milhões) representaram alevinos de 35 diferentes espécies de peixes.

Sabe-se que o estado do Rio Grande do Sul é produtor de tilápias (*Oreochromis* sp.) e bagre americano (*Ictalurus punctatus*), apesar de liminar solicitada pelo Ministério Público Federal no ano de 2004, suspendendo portarias do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), e da Secretaria Estadual do Meio Ambiente do Rio Grande do Sul (SEMA) que liberavam a produção destas espécies. Deste modo, oficialmente a criação destas espécies está proibida na bacia do Rio Uruguai (BALDISSEROTTO, 2009). Este evento pode ter gerado receio em muitos produtores em informar a produção destas espécies durante as entrevistas do presente estudo, o mesmo foi observado por PIEDRAS & BAGER (2007), em estudo de caracterização da aquicultura da região sul do estado do Rio Grande do Sul. Atualmente a produção da tilápia está permitida em todo o estado Rio Grande do Sul, pois o Superior Tribunal de Justiça da União através de um recurso extraordinário publicado em novembro de 2011 autorizou novamente a produção da espécie.

Diante dos dados de preços médios (R\$/milheiro) dos milheiros dos alevinos na safra 2010/2011 (Tabela 4), observa-se que o milheiro dos alevinos de carpa ornamental é o que apresenta o maior preço médio (R\$ 400,00/milheiro) em relação aos demais alevinos de carpas destinados à produção de pescado, indicando o maior valor agregado de alevinos ornamentais. O mesmo ocorre para alevinos das espécies ornamentais produzidas pelas UPAs visitadas onde o preço médio do milheiro foi o terceiro maior (R\$ 610,00/milheiro) entre todas as espécies comercializadas no estado durante a safra 2010/2011.

Entre os alevinos de carpa destinados à produção de pescado, verifica-se que o milheiro de carpa capim é o que apresenta o maior preço médio de venda (R\$ 220,00/milheiro), confirmando novamente a importância desta espécie para a piscicultura do Rio Grande do Sul. BARROS (2005), avaliando a tecnologia e os custos de produção de uma unidade produtora de alevinos do estado do Mato Grosso do Sul no ano 2003, relata que o preço de venda do milheiro de alevinos de carpa capim era R\$ 170,00, sendo que a venda dos alevinos da espécie foram responsáveis pelo terceiro maior lucro do empreendimento que na ocasião comercializava alevinos de nove espécies.

Os alevinos das duas linhagens de tilápia produzidas (tailandesa e Gift) pelas UPAs na safra de 2010/2011, apresentaram os menores preços médios de venda em relação aos demais alevinos comercializados, sendo que os preços médios dos milheiro da linhagem tailandesa e Gift foram R\$ 86,25 e R\$123,75, respectivamente (Tabela 4). Segundo FIRETTI SALES & GARCIA (2007), o preço dos alevinos de tilápia no Brasil reduziram 26,42%. O valor do milheiro, que era praticado a R\$ 126,11, em 1996 passou para R\$ 92,76 em 2006. Os autores relatam que as possíveis causas desta desvalorização são a maturidade tecnológica do processo produtivo, a competitividade entre fornecedores e o aumento da oferta. SCORVO-FILHO et al. (2010), acrescentam ainda a estes fatores, o menor preço pago pelos pescadores particulares (pesque-pagues) e pelos frigoríficos, forçando a redução do custo de produção.

Observa-se ainda uma grande discrepância entre os preços médios (R\$) dos alevinos de dourado e pintado comercializados na safra 2010/2011 pelas UPAs (Tabela 3) em relação aos demais alevinos produzidos, sendo que os preços dos alevinos de dourado e pintado são 20 e 22 vezes, respectivamente, em média mais elevados que o preço dos alevinos das outras espécies comercializadas. Entre as causas desta discrepância no caso do dourado, está as reduzidas taxas de sobrevivência da espécie devido ao canibalismo inerente, o que eleva os custos de produção do alevino. Este fato foi observado por BARROS (2005), onde os altos custos inviabilizaram a produção de alevinos da espécie na unidade produtora de estudada. No



caso do pintado, um dos fatores que elevam os custos e limitam a produção de seus alevinos são o alto nível tecnológico e de capital exigidos na produção (INOUE et al., 2009) que assim como o dourado também possuem hábito alimentar piscívoro. Entretanto, a espécie pode ser condicionada a alimentar-se de ração através de procedimentos de treinamento alimentar de larvicultura e alevinagem intensiva.

O principal destino dos alevinos comercializados na safra 2010/2011 (Figura 5) informados pelos produtores entrevistados, são prefeituras municipais do estado do Rio Grande do Sul que distribuem e fornecem alevinos aos produtores com até 50% de subsídio. Esta característica pode estar relacionada com pequenas propriedades de agricultura familiar do centro até o norte do estado do Rio Grande do Sul. Outros destinos são produtores dos estados de Santa Catarina e Rio Grande do Sul. A comercialização de alevinos pelos produtores do estado de Santa Catarina é favorecida pela distribuição geográfica das UPAs no estado do Rio Grande do Sul (Figura 1), localizadas próximo a fronteira entre os dois estados.

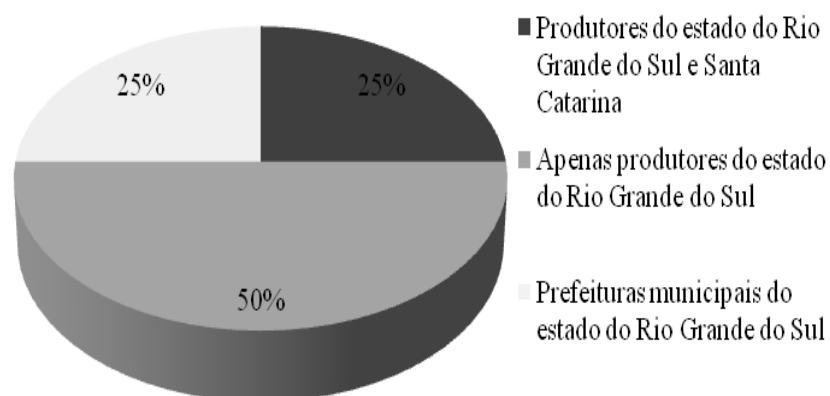


FIGURA 5 – Principais destinos dos alevinos produzidos nas UPAs do estado do Rio Grande do Sul em 2010/2011.

#### 4 CONCLUSÕES

A partir do cenário apresentado fica evidente que a produção de alevinos é um importante elo da cadeia produtiva da piscicultura do estado do Rio Grande do Sul, gerando renda e emprego. Entretanto, verificou-se que inúmeras unidades produtoras de alevinos apresentam falhas na gestão e manejo empregados na qualidade de água e reprodução. Isto reforça a implementação de trabalhos em conjunto entre produtores, instituições de pesquisa, extensão e fomento; visando difundir entre os produtores a importância do monitoramento e controle dos parâmetros físico-químicos de qualidade de água na produção de alevinos, além de desenvolver programas de melhoramento genético e tecnologias de planejamento e gestão

que busquem a redução dos custos de produção e considerem a realidade local dos empreendimentos.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUOZANI, L.L.; REDIN, E.; HÖFLER, C.E. **Plano estratégico de desenvolvimento da aquicultura e pesca 2007- 2017**. Ijuí: Unijuí, 2007. 134 p.

BALDISSEROTTO, B. Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 39, n. 1, p. 291-299, 2009. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782008005000046>>. Acesso em: 02 mar. 2013.

BARROS, A.F. **Tecnologia, custo e rentabilidade da produção de larvas e juvenis de peixes em piscicultura do Mato Grosso do Sul: estudo de caso**. 2005. 121f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

BARROS, A.F.; ESPAGNOLI, M.I.; MARTINS, G.; SOUZA, O.M. **Caracterização da piscicultura na microrregião da baixada cuiabana, Mato Grosso, Brasil**. São Paulo: Instituto de Pesca, 2011.13p. (Boletim Técnico, 3, v. 37).

BRASIL. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Estatística da pesca 2004. Brasil. Grandes regiões e unidades da federação**. Brasília: IBAMA, 2005.136p. (Boletim Técnico)

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. **Produção pesqueira e aquícola, Boletim Estatístico 2010**. Brasília: MPA, 2012. 129p. (Boletim Técnico).

CARNEIRO, P.C.F.; SCHORER, M.; MIKOS, J.D. Tratamentos terapêuticos convencionais no controle de ectoparasita *Ichthyophthirius multifiliis* em Jundiá (*Rhamdia sp.*). **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, n. 1, p. 99-102, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2005000100015>>. Acesso em: 04 nov 2012.

CECCARELLI, P.S.; SENHORINI, J.A.; VOLPATO, G. **Dicas em piscicultura** (perguntas e respostas). Botucatu: Santa Gráfica, 2000. 247p.

FIRRETTI, R.; SALES, D.S.; GARCIA, S.M. **Lucro com tilápia é para profissionais Anualpec 2007. Anuário da Pecuária Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2007. 2p.

GUEVARA, M.J.P. **Enriquecimento de zooplâncton com óleo de peixe na larvicultura do**

**pacu, *Piaractus mesopotamicus curimbatá Prochilodus lineatus*.** 2003. 184 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GUERREIRO, L. R. J. **Custos de produção, análise econômica e gerencial em unidade de produção de alevinos de peixes reofílicos: estudo de caso em Rondônia.** 2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Programa de Pós Graduação em Zootecnia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

GUERREIRO, L.R.J.; DIAS DIAS, J.A.; FORNARI, D.C.; RIBEIRO, R.P.; ZANONI, M.A. Incubação de ovos e larvas de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) em incubadoras do tipo israelense e woynarovich. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 2, p. 781-794, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2011v32n2p789>> Acesso em: 08 jun 2012.

INOUE, L.A.K.A. HISANO, H.; ISHIKAWA, M.M.; ROTTA, M.A.; SENHORINI, J.; **Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (pintado e cachara).** Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; Corumbá: Embrapa Pantanal, 2009. 26p. (Documentos / Embrapa Agropecuária Oeste, ISSN 1516-845X; 99; Documentos / Embrapa Amazônia Ocidental; ISSN 1517-3135; 68; Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973; 100).

JACOMETO, C.B.; BARRERO, N.M.L.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; GOMES P.C.; POVH, J.A.; STREIT JR, D.P.; VARGAS, L.; RESENDE, E.K.; RIBEIRO, R.P. Variabilidade genética em tambaquis (Teleostei: Characidae) de diferentes regiões do Brasil. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v.45, n.5, p.481-487, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2010000500007>> Acesso em: 02 fev 2013.

JOMORI, R.K.; CARNEIRO, D.J.; M.I.E.G.; MARTINS, M.C. PORTELLA. Economic evaluation of *Piaractus mesopotamicus* juvenile production in different rearing systems. **Aquaculture**, Amsterdã, v. 243, n. 5, p.175-183, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.09.034>> Acesso em: 04 mar 2012.

KUBITZA, F. **Reprodução, larvicultura e produção de alevinos de peixes nativos.** Jundiaí: Acqua e imagem, 2004. 74 p.

KUINCHTNER, A.; BURIOL, G.A. Clima do Estado do Rio Grande do Sul segundo a classificação climática de Köppen e Thornthwaite. **Disciplinarum Scientia**, Santa Maria, v.

2, n. 1, p. 171-182, 2001. Disponível em: <  
<http://sites.unifra.br/Portals/36/tecnologicas/2001/clima.pdf>> Acesso em 28 jun 2011.

MORAES, F.R.; MARTINS, M.L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva, In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M. et al. (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p.343-383.

OLIVEIRA, A. M. B.; CONTE, M. S. L.; CYRINO, J. E. P. Produção de Characiformes autóctones. In: CYRINO, J. E. URBINATI, E. C.; FRACALOSSI, D. M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 75-169.

PEZZATO, L.E.; BARROS, M.M.; FRACASOLI, D.M.; CYRINO, J.E.P. Nutrição de peixes. In: CYRINO, J.E.P.; URBINATI, E.C.; FRACALOSSI, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Edc). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. São Paulo: TecArt, 2004. p. 75-169.

PIEDRAS, S.R.N.; BAGER, A. Caracterização da aquicultura desenvolvida na região sul do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira Agrociência**, Pelotas, v. 13, n. 3, p. 403-407, 2007. Disponível em: < <http://www2.ufpel.edu.br/faem/agrociencia/v13n3/artigo19.pdf>> Acesso em: 02 mar 2012.

POLI, C.R.; GRUMANN, A.; BORGHETTI, J.R. Situação atual da aquicultura na região Sul. In: VALENTI, W.C. et al. **Aquicultura no Brasil: bases para um desenvolvimento sustentável**. Brasília: CNPq e Ministério da Ciência e Tecnologia, 2000. p.321-351.

RIBEIRO, R.P. Construção de tanques. In: MOREIRA, H.L.M.; VARGAS. L.; RIBEIRO, R. P.; ZIMMERMANN, S. **Fundamentos da Moderna Aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001. p. 83-89.

RIO GRANDE DO SUL. Departamento de planejamento governamental do estado do Rio Grande do sul, **Atlas socioeconômico Rio Grande do Sul**, 2006. Acesso em: 10 de Novembro de 2012. Online. Disponível em: <<http://www.seplag.rs.gov.br/atlas/atlas.asp?menu=26>>

ROTTA, M. A. **Aspectos gerais da fisiologia e estrutura do sistema digestivo dos peixes relacionados à piscicultura**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2003. 48p. (Documentos / Embrapa Pantanal, ISSN 1517-1973; 53).

SCORVO FILHO, J.D.; FRASCÁ-SCORVO, C.M.D.; ALVES, J.M.C.; SOUZA, F.R.A.A. Tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 39, n. esp. p.112-118, 2010. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982010001300013>> Acesso em: 02 mar 2012.

SENHORINI, J.; LANDINES, M.. Generalidades sobre manejo y selección de reproductores de peces reofílicos. In: **Reproducción de peces en el trópico**. Bogotá: Imprenta Nacional de Colômbia, 2005. 90p.

SUPLICY, F.M. Freshwater fish seed resources in Brazil, in: BONALD-REAMTASO, M.G. (Ed.), **Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture**. FAO Fisheries Technical Paper, N°. 501, FAO: Rome, 2007 p.129-143.

URBINATI, E.C.; CARNEIRO, P.C.F. Práticas de Manejo e Estresse dos Peixes em Piscicultura Intensiva. In CYRINO, J. E. URBINATI, E.C.; FRACALOSSO, D.M.; CASTAGNOLLI, N. (Eds.). **Tópicos Especiais em Piscicultura Tropical**. São Paulo: TecArt. p. 171-193, 2004.

WOYNAROVICH, E.; HORVÁTH, L. **A propagação artificial de peixes de águas tropicais: manual de extensão**. Brasília: CNPq, 1983. 216 p.

## 5. Artigo Submetido à revista *Neotropical Ichthyology*

### Desenvolvimento de marcadores microssatélites para uso no melhoramento genético de jundiá, *Rhamdia sp.* (Quoy & Gaimard, Pimelodidae)

<sup>1\*</sup>Marília Danyelle Nunes Rodrigues, <sup>2</sup>Heden Luiz Marques Moreira.

<sup>1\*</sup>Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, S/N, Pelotas/RS, Brasil.  
[nunes.mdnunes@gmail.com](mailto:nunes.mdnunes@gmail.com)

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas, Campus Capão do Leão, S/N, Pelotas/RS, Brasil.  
[heden.luiz@gmail.com](mailto:heden.luiz@gmail.com)

#### Resumo

Através do sequenciamento de próxima geração (NGS) objetivou-se desenvolver marcadores microssatélites para jundiá, *Rhamdia sp.* (Quoy & Gaimard, Pimelodidae), espécie nativa e promissora para produção intensiva na região Sul do Brasil, visou-se compreender a genética e a estrutura populacional da espécie. Uma biblioteca shotgun paired-end foi preparada a partir de DNA genômico de jundiá. O sequenciamento da biblioteca foi conduzida em um sequenciador HiSeq (Illumina) com leituras paired-end de 100 pares de bases e agrupada com outras espécies. A partir de uma única corrida cinco milhões de leituras obtidas foram analisadas com o programa PAL\_FINDER\_v0.02.03. Para cada loci um dos *primers* teve a incorporação da sequência M13 e um grupo de doze loci foi escolhido e amplificado para posterior obtenção dos fragmentos microssatélites. Do total das leituras obtidas, 6.331 loci microssatélites potencialmente amplificáveis (PALs) foram encontrados, dos quais 4.755 eram dinucleotídeo, 728 trinucleotídeo, 729 tetranucleotídeo, 117 pentanucleotídeo e 2 eram hexanucleotídeo. Doze loci microssatélites foram escolhidos para amplificação e sequenciados. O conhecimento das sequências microssatélite desenvolvidas se deu através de sequenciamento pelo método de Sanger, com fragmentos entre 140 e 200pb. A partir da genotipagem observou-se um número médio de alelos por locus de 6,14. As populações apresentaram variação genética e os marcadores microssatélites desenvolvidos apresentam polimorfismo. Contudo, podemos definir que a estratégia de sequenciamento através de biblioteca shotgun paired-end da plataforma HiSeq (Illumina) apresentou-se eficaz,

além de ser rápida e de baixo custo para desenvolver marcadores microssatélites para espécies não modelo como o jundiá.

**Palavras-chave:** NGS, SSR, *Rhamdia sp.*.

### **Abstract**

Through next-generation sequencing (NGS) aimed to develop microsatellite markers for catfish, *Rhamdia sp.* (Quoy & Gaimard, Pimelodidae), native and promising species for intensive production in southern Brazil, was aimed at understanding the genetics and population structure species. A shotgun paired-end library was prepared from genomic DNA of catfish. The sequencing was carried out on a library HiSeq sequencer (Illumina) with paired-end reads of 100 base pairs and grouped with other species. From a single race five million readings obtained were analyzed with the program PAL\_FINDER\_v0.02.03. Each of the primers had loci embedding sequence M13 and a group of twelve loci and was chosen for further amplified microsatellite fragments obtained. Of all readings obtained, 6.331 microsatellite loci potentially amplifiable (PALs) were found, of which 4.755 were dinucleotide, 728 trinucleotide, 729 tetranucleotide, 117 pentanucleotídeo and 2 were hexanucleotídeo. Twelve microsatellite loci were chosen for amplification and sequenced. Knowledge of the developed microsatellite sequences was through sequencing by the Sanger method, with fragments between 140 and 200bp. From the observed genotyping an average number of alleles per locus of 6.14. The populations showed genetic variation and developed microsatellite polymorphism markers present. However, we can define the shotgun paired - end HiSeq platform (Illumina) sequencing strategy through effective library is presented, as well as being quick and inexpensive to develop microsatellite markers for species not model like the catfish.

Keywords: NGS, SSR, *Rhamdia sp.*.

### **Introdução**

A aquicultura brasileira tem expandido sua produção nos últimos anos baseada em espécies exóticas, entre elas a tilapicultura. No entanto, recentemente há um interesse em incorporar espécies de peixes nativos do Brasil neste sistema de produção. Como exemplo pode-se citar as espécies tambaqui (*Colossoma macropomum*) e cachara (*Pseudoplatystoma corruscans*) que estão sendo alvos de desenvolvimentos de linhagens no projeto Aquabrazil. Contudo, as espécies citadas anteriormente não são de aplicação na piscicultura do Rio Grande do Sul (RS), seja por restrições de legislação ou mesmo ambiental. Cabe salientar

ainda que a piscicultura do RS se baseia na sua quase totalidade em espécies exóticas, incluindo carpas (*Ctenopharyngodon idella*, *Cyprinus carpio*, *Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis*) e tilápia (*Oreochromis niloticus*) (Brasil, 2012).

O jundiá (*Rhamdia sp.*) é a espécie nativa de maior representatividade no estado do RS, apresentando uma produção superior a 2.000.000 alevinos (Brasil, 2012). Pesquisas consideram a espécie nativa mais promissora para produção intensiva no estado, devido a características como facilidade em adaptar-se a diferentes ambientes, condições climáticas e dietas artificiais, apresentando fácil manejo e boa aceitação comercial (Baldisserotto, 2004; Pouey *et al.*, 2011).

Embora estudos na área de citogenética venham sendo desenvolvidos para jundiá (Huerigo & Zaniboni-Filho, 2006; Silva *et al.*, 2007 e 2011), atualmente não se conhece geneticamente os plantéis de reprodutores de *Rhamdia sp.* na região Sul e Sudeste do Brasil. O conhecimento sobre a variabilidade genética e os padrões de estrutura das populações são pré-requisitos para o desenvolvimento de estratégias para futuros programas de melhoramento genético. No entanto, estudos de variabilidade genética em jundiá requerem o desenvolvimento de marcadores moleculares.

Dentre os marcadores disponíveis atualmente, os marcadores microssatélites (SSR - *Simple Sequence Repeats*) por ser uma ferramenta satisfatoriamente utilizados em estudos de estrutura de populações, conservação de espécies e gestão de recursos genéticos (An *et al.*, 2012). Os microssatélites se caracterizam por apresentar codominância e alto polimorfismo, permitindo estudar a diferença genética entre populações estreitamente relacionadas (Nan-Nakorn *et al.*, 2010) sendo assim considerados como uma ferramenta valiosa para genética populacional.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites proveniente de espécies modelos outrora exigia um dispendioso esforço técnico, com procedimentos demorados e caros. Estes procedimentos incluem técnicas como a criação de bibliotecas enriquecidas para loci SSR, clonagem, hibridização para detectar clones positivos, isolamento de plasmídeo e sequenciamento de Sanger (Castoe *et al.*, 2012). Entretanto avanços na tecnologia de sequenciamento de DNA vêm proporcionando métodos mais eficientes e de baixo custo para desenvolver marcadores moleculares para espécies que não possuem dados disponíveis (Buschiazzo & Gemmell, 2006), atualmente conhecidos como sequenciamento de próxima geração (NGS - *Next Generation Sequencers*).



Estudos indicam que esta nova tecnologia conduz para substituição de protocolos convencionais de isolamento de microssatélites (Abdelkrim *et al.*, 2009), e existem cada vez mais relatos empregando marcadores microssatélites NGS em estudos de espécies não modelos (Saarinen & Austin, 2010; Yu *et al.*, 2011). Este estudo através do NGS tem o objetivo de desenvolver marcadores microssatélites para jundiá visando compreender a genética desta espécie.

## **Materiais e Métodos**

### **Animais e extração do DNA**

Como fonte de DNA genômico total, amostras de sangue foram coletadas de jundiás provenientes da Estação de Piscicultura do Chasqueiro, localizado entre as coordenadas 32°02'15'' e 32°11'07'' de latitude sul e 52°57'46'' e 53°11'18'' de longitude oeste, pertencente à Universidade Federal de Pelotas, no município de Arroio Grande - RS, Brasil. Para extração de DNA utilizou-se o Kit Blood Genomic DNA Miniprep, de acordo com as instruções do fabricante (Axygen Bioscience, USA). A qualidade da extração foi checada em gel de agarose 1%, corado com Gelgreen (Biotium, USA) e visualizado em transluminador de luz branca (Clare chemical, USA). A concentração de DNA total foi medida através de espectrofotômetro utilizando NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, EUA).

### **Preparação da biblioteca genômica**

Uma única biblioteca shotgun paired-end foi preparada a partir de DNA genômico de jundiá de acordo com o protocolo padrão do Kit Illumina Nextera DNA Library Kit com duplo índice (Illumina, USA). Um total de 200ng de DNA genômico de cadeia dupla foi fragmentado aleatoriamente. O sequenciamento da biblioteca foi conduzido em um sequenciador HiSeq (Illumina, USA) com leituras paired-end de 100 pares de bases e agrupada com outras espécies. A partir de uma única corrida dez milhões (cinco milhões forward e cinco milhões reverse) de leituras obtidas foram analisadas com o programa PAL\_FINDER\_v0.02.03 para extrair as leituras que continham microssatélites em tandem com dinucleotídeos (2 di), trinucleotídeos (3 tri), tetranucleotídeos (4 tetra), pentanucleotídeos (5 penta) e hexanucleotídeos (6 hexa). Uma vez que as leituras fossem identificadas com o PAL\_FINDER elas foram agrupadas para um subdiretório local do programa Primer3 (versão 2.0.0) (Rozen & Skaletsky, 2000) para o desenho dos *primers*. Para calcular o conteúdo de GC, alocação de base ("N"), nível de sequências duplicadas e a qualidade da sequência utilizou-se o programa FASTQC v0.10.0.

## Desenho dos primers

Com o objetivo de evitar problemas com o número de cópias da sequência do *primer* no genoma, loci para o qual a sequência dos *primers* ocorreram somente uma ou duas vezes nos 5 milhões de leituras foram selecionadas. Foram utilizados alguns critérios para o desenho dos *primers*: 1) conteúdo de GC maior que 30%; 2) temperaturas de melting de 58°C - 65°C com um máximo de 2°C de diferença entre os *primers*; 3) os últimos dois nucleotídeos na extremidade 3' sendo G ou C e 4) máximo poli-N de 4 nucleotídeos. Se todos os outros critérios forem atingidos, um único par de *primer* é escolhido apresentando o maior escore assinalado pelo Primer3, além do maior tamanho da região de amplificação da sequência repetida. Para cada loci, um dos *primers* teve a incorporação da sequência M13 (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT 3'). A adição desta sequência permite a identificação indireta dos tamanhos dos alelos facilitando a subsequente genotipagem (Brownstein *et al.*, 1996).

## PCR e Amplificações SSR

A partir dos loci potencialmente amplificáveis (PALs) obtidos, um grupo de doze loci foi escolhido e amplificado para posterior obtenção dos fragmentos microssatélites através de sequenciamento do tipo Sanger. As amplificações foram realizadas num volume total de 25 µl incluindo 7,5 pmol de cada *primer*, ~30–50 ng de DNA template, 0,2 mM dNTP, 1 unidade de Dream Taq polymerase (Fermentas), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 1 × PCR buffer. A temperatura de anelamento foi testada para cada um dos loci por gradiente em um termociclador Eppendorf Mastercycler Gradient (Eppendorf, Alemanha). Os produtos de PCR foram verificados por eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados por coloração com GelGreen (Biotium, USA). Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando kit MegaBace sequencing (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) em um sequenciador MegaBace 1000 por capilaridade (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden). As sequências foram analisadas através do software Finch TV 1.4.1 (Geospiza, Inc, USA).

Para confirmar o polimorfismo dos loci microssatélites, quatro tetranucleotídeos (Rq68040, Rq137981, Rq164109 e Rq51373) e um dinucleotídeo (91253) foram escolhidos e testados em seis populações de reprodutores de jundiá, localizadas nos municípios de São João do Polêsine, Cruzeiro do Sul, Passo do Sobrado, Três de Maio, Seberi e Mato Leitão no estado do Rio Grande do Sul (RS). Um total de cento e setenta e dois animais (172) foram genotipados. As amostras foram submetidas à genotipagem em gel de poliacrilamida 10% por 3 horas a 100 V/cm. As bandas de DNA foram coradas com nitrato de prata (Qu *et al.*, 2005)

e os genótipos individuais foram definidos de acordo com os padrões da bandas. Número de alelos de cada loci, heterozigidade observada ( $H_o$ ) e índice de endogamia ( $F_{is}$ ), foram analisados usando software GENEPOP versão 4.0 (Rousset, 2008).

## Resultados e Discussão

Gerar grandes quantidades de sequências genômicas para espécies não modelo hoje é possível graças ao desenvolvimento de novas tecnologias, entre elas sequenciamento de próxima geração. Para jundiá, espécie nativa e promissora o desenvolvimento de marcadores microsatélites possibilitou disponibilizar dados em grande escala, auxiliando no avanço de pesquisas para a espécie.

Através do sequenciador HiSeq (Illumina), foram obtidos cinco milhões de leituras pareadas (paired-end), todos os escores de qualidade por base apresentaram valores acima de Q28 e a qualidade média por leitura (read) foi excelente, Q38. Do total das leituras, foram encontrados 6.331 loci microsatélites potencialmente amplificável (PALs) em jundiá, dos quais 4.755 eram dinucleotídeo, 728 trinucleotídeo, 729 tetranucleotídeo, 117 pentanucleotídeo e 2 eram hexanucleotídeo (Figura 1).

Em comparação com outros genomas, o jundiá apresenta números de loci microsatélite próximo ao encontrado para humanos (5.264 microsatélites) (Dib *et al.*, 1996) e discrepante de zebrafish, *Danio rerio* (116.915 microsatélites) (Rouchka, 2010) demonstrando a oscilação nas sequências microsatélites.

Para *Henichorynchus siamensis*, um teleósteo de água doce de grande importância econômica na bacia do rio Mekong (China), 65.954 sequências foram obtidas com a plataforma Roche 454 GS-FLX, dentre o total de sequências obtidas, 1.837 eram SSRs (Iranawati *et al.*, 2012). Embora seja um teleósteo, o número de sequências obtidas apresentou-se efetivamente menor do que as encontradas para jundiá, divergência que pode ser devido ao tamanho do genoma de cada espécie ou por diferenças nas plataformas utilizadas e suas características peculiares, como cobertura do genoma, número de sequências e tamanho de leituras.

Semelhantemente a Iranawati *et al.* (2012) e utilizando a mesma plataforma para *Megalobrama Pellegrini*, peixe nativo da China, foram obtidas 257.497 leituras brutas, sendo 49.811 PALs microsatélites (Wang *et al.*, 2012) e quando comparado ao jundiá um número

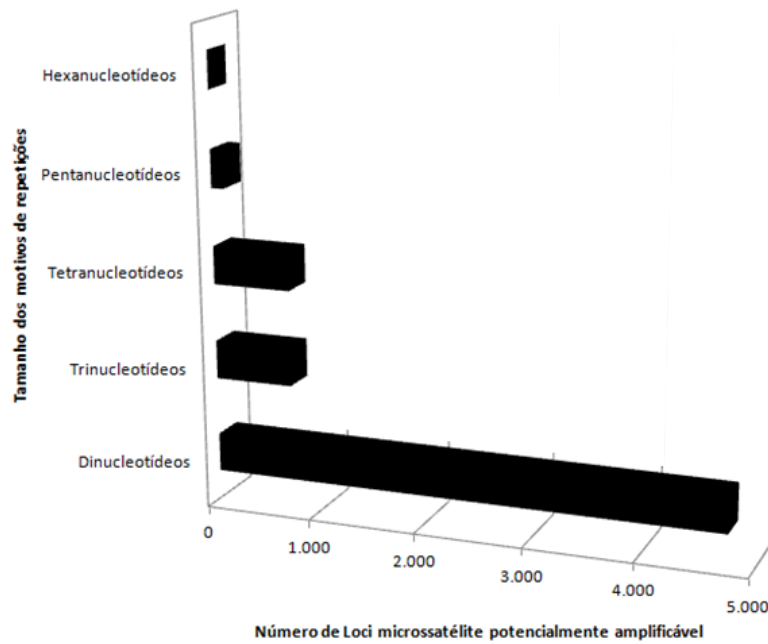
quase vinte vezes menor de leituras e quase nove vezes maior de PALs; diferenças estas podem de fato estar relacionada às diferenças entre as plataformas.

O conteúdo de GC por leitura foi equivalente ao da distribuição teórica esperada para jundiá 41%, um resultado positivo, já que o real conteúdo de GC no genoma é desconhecido. Um valor semelhante foi encontrado para *Parus major*, 40,7% (Santure *et al.*, 2011). Para a maioria dos animais a porcentagem de GC é variável, no entanto, os valores geralmente se apresentam entre 35% e 45% dos genomas (Megléczy *et al.*, 2012). Já os dinucleotídeos GC se apresentam raros em todos os genomas estudados (Tóth *et al.*, 2000; Katti *et al.*, 2001), incluindo animais aquáticos (Edwardsa *et al.*, 1998; Somridhivej *et al.*, 2008; Saarinen & Austin, 2010). Segundo Schorderet & Gartler (1992), as baixas frequências de dinucleotídeos GC encontradas em genomas de vertebrados têm sido atribuídas a metilação da citosina, que, por sua vez, aumenta as probabilidades de mutação de timina por desaminação.

Quanto ao comprimento das sequências, o valor médio para jundiá foi 100 bases como esperado. No em torno das análises não foi observado nenhum erro de alocação de base ("N") em qualquer posição da leitura, o que é normal ocorrer no final das leituras nas últimas posições. O nível de sequências duplicadas ficou ao redor de 9,56%, significando que a biblioteca parcial teve uma boa cobertura.

Do total de 6.331 PALs obtidos, o motivo mais frequente encontrado para jundiá (75,1%) foram os dinucleotídeos também obtidos em *Schizothorax biddulphi* (Luo *et al.*, 2012) e *Henichorynchus siamensis* (Iranawati *et al.*, 2012), respectivamente 77,08% e 74,41%. Para *Henichorynchus siamensis* 9,53% das sequências eram trinucleotídeos, 16,06% tetranucleotídeos e repetições do tipo penta- e hexa- não foram detectadas (Iranawati *et al.*, 2012). No caso de *Schizothorax biddulphi*, semelhante ao jundiá, penta- e hexa- apresentaram-se em baixa frequência 0,65% e 0,22%, respectivamente (Luo *et al.*, 2012).

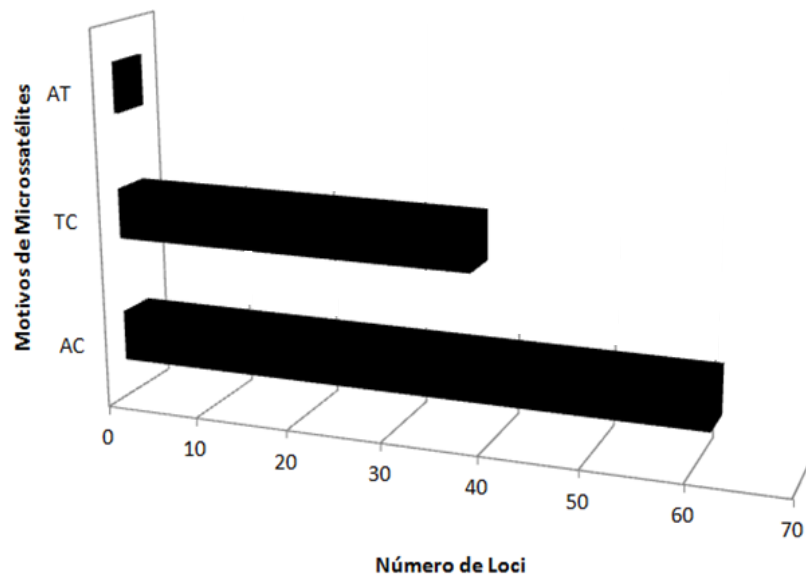
Em contraste, para o peixe *Raja pulchra* do total de PALs obtidos (312.236) 18% eram repetições dinucleotídeos e 0,11% do tipo trinucleotídeos (Kang *et al.*, 2012); embora os autores não tenham apresentado os resultados obtidos para tetra-, penta- e hexanucleotídeos, é possível observar que as repetições do tipo dinucleotídeo não se apresenta como a mais frequente.



**Figura 1** - Loci potencialmente amplificáveis de microssatélites em jundiá (*Rhamdia sp.*) de acordo com o tamanho do motivo. Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101 pb).

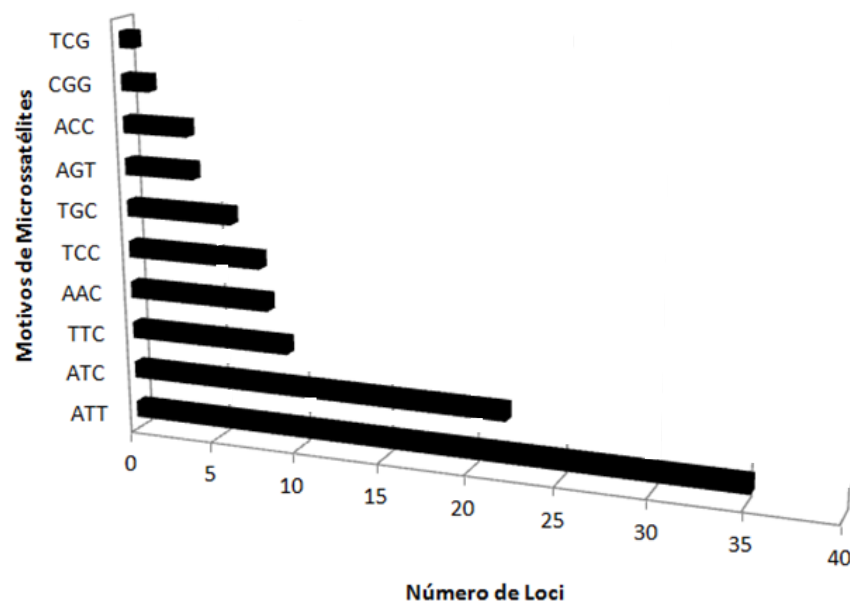
Efetivamente o motivo mais encontrado nas repetições do tipo dinucleotídeo para jundiá foi TC e AC (Figura 2), similar aos resultados obtidos para *Fugu rubripes* (Edwardsa *et al.*, 1998), *Ictalurus punctatus* (Somridhivej *et al.*, 2008), *Etheostoma okaloosae* (Saarinen & Austin, 2010), *Raja pulchra* (Kang *et al.*, 2012), *Schizothorax biddulphi* (Luo *et al.*, 2012), mas diferente em partes de *Argopecten irradians* (TA) (Zhan *et al.*, 2005), *Cyprinus carpio* (AC/TG) (Wang *et al.*, 2007), *Crassostrea virginica* (Wang & Guo, 2007) e *Perca flavescens* (Zhan *et al.*, 2009) (AG/TC).

Ainda neste contexto, de acordo com Megléczy *et al.* (2012), os motivos mais comuns de dinucleotídeos em Chordata dependendo da espécie são AC e TC, condizendo com os resultados obtidos para alguns peixes, aves e plantas.



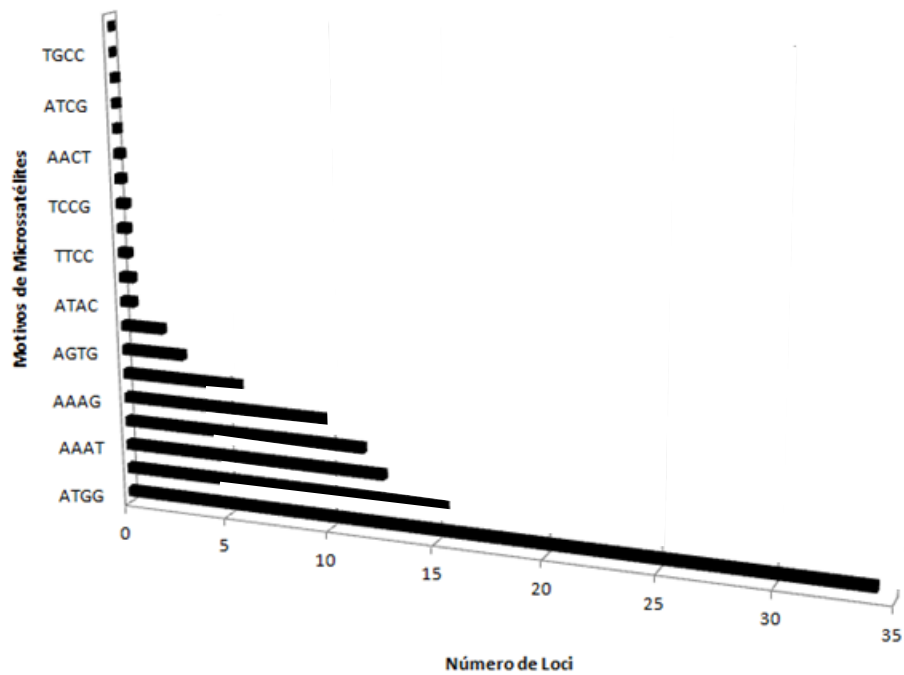
**Figura 2** - Motivos SSR mais comuns de dinucleotídeos (2di) em *Rhamdia sp.*. Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101 pb).

Em relação aos trinucleotídeos, o motivo de SSR mais frequente encontrado no sequenciamento para jundiá foi ATT (Figura 3). Similarmente, segundo Calabuig *et al.* (2012) o motivo ATT foi o mais frequente também em aves (*Coscoroba coscoroba*) e diferente para outros peixes como *Raja pulchra* (AAT) (Kang *et al.*, 2012), *Cyprinus carpio* (AAT/ATC) (Wang *et al.*, 2007) e *Coreoperca whiteheadi* (CCT/GGA) (Tian *et al.*, 2012). Segundo Meglécz *et al.* (2012) em estudos com mais 130 espécies de eucariontes o motivo de trinucleotídeos AAT foi o mais frequente. Apesar do jundiá também ser um Chordata, não apresentou a mesma tendência, pois alguns fatores podem influenciar na composição dos microsatélites em cada espécie, tais como mecanismos de mutação, tipos de microsatélites (comprimento do alelo, unidade de comprimento de repetição, composição), contexto genômico e a seleção natural (Buschiazzo & Gemmell, 2006).



**Figura 3** – Motivos SSR mais comuns de trinucleotídeos (3tri) em *Rhamdia sp.*. Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101pb).

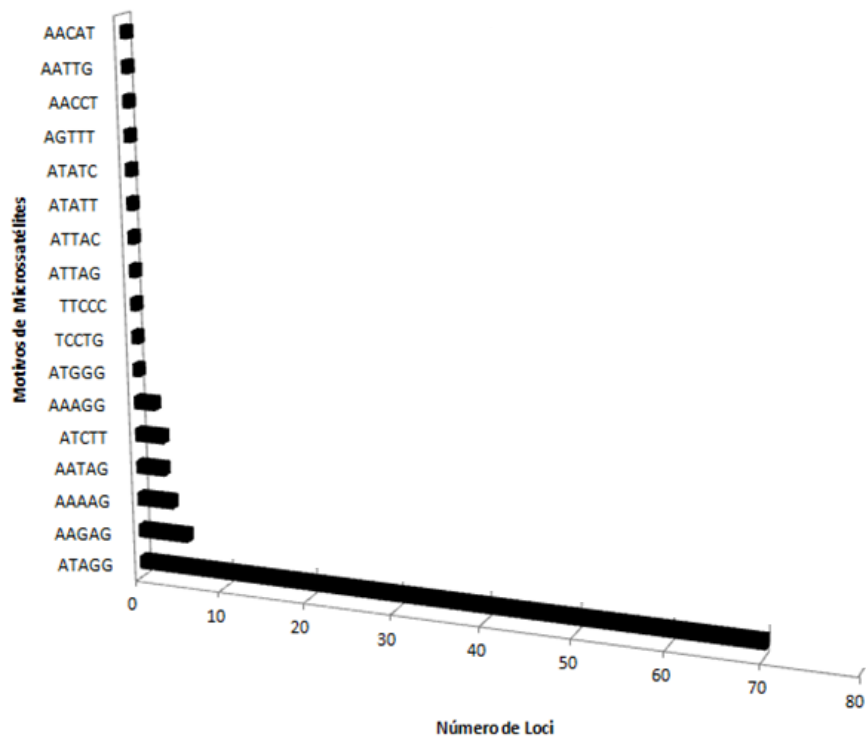
Para tetranucleotídeos, o motivo de SSR mais frequente encontrado foi ATGG (Figura 4), diferentemente dos motivos observados por Calabuig *et al.* (2012) com *Coscoroba coscoroba* e Castoe *et al.* (2012) com *Centrocerus minimus* e *Columbiana Nucifraga*. Segundo Megléczy *et al.* (2012), para Chordata em geral o motivo mais comum encontrado para tetranucleotídeo é AGAT e em plantas AAAT, resultados distintos em ambos estudos e grupos de espécies o que sugere a vasta variação que pode ser encontrada dentre as repetições de loci microsatélites.



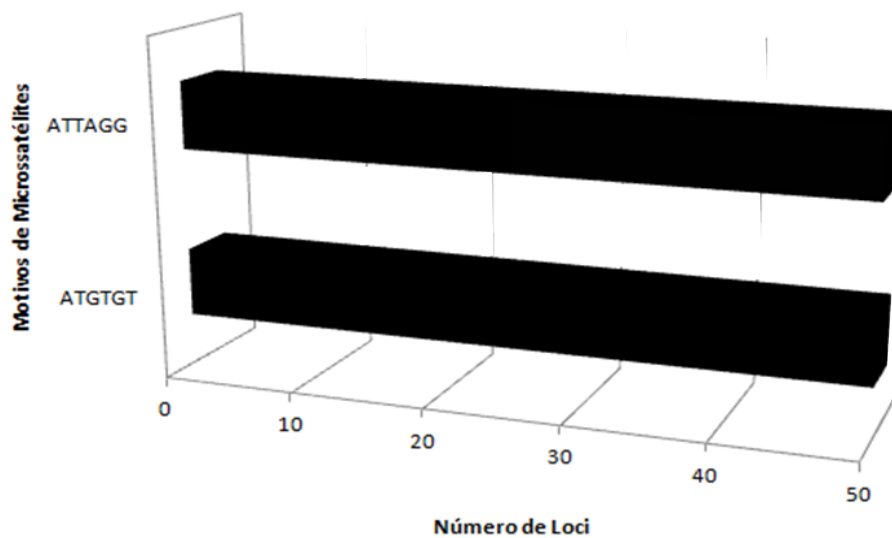
**Figura 4** - Motivos SSR mais comuns de tetranucleotídeos (4tetra) em *Rhamdia sp.*. Resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina (100-101 pb).

O número de motivos com repetições do tipo pentanucleotídeos e hexanucleotídeos apresentou-se relativamente baixo (Figura 1), com variação quanto ao número de repetições, para pentanucleotídeo foram 17 repetições apresentando o motivo mais comum ATAGG (Figura 5) e para repetições do tipo hexanucleotídeos foram obtidos apenas dois diferentes motivos ATGTGT e ATTAGG (Figura 6).





**Figura 5** - Motivos SSR mais comuns de pentanucleotídeos (5penta) em *Rhamdia sp.*. Resultados com base em cinco milhões Illumina long (100-101 pb) leituras paired-end.

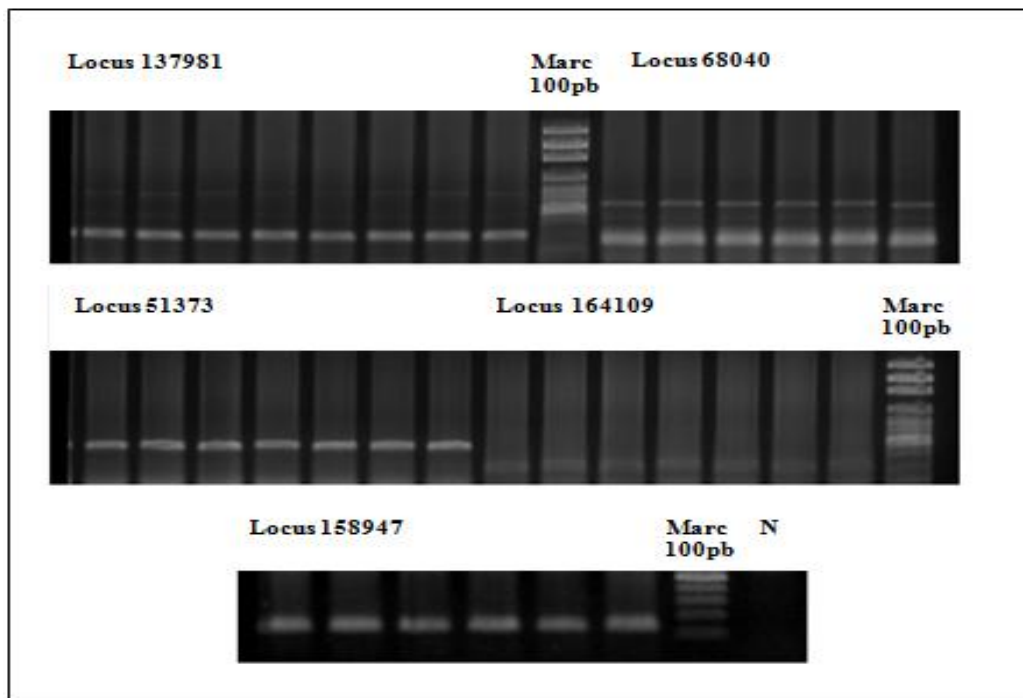


**Figura 6** - Motivos SSR mais comuns de hexanucleotídeos (6 hexa) em *Rhamdia sp.*. Resultados com base em cinco milhões Illumina long (100bases) leituras paired-end.

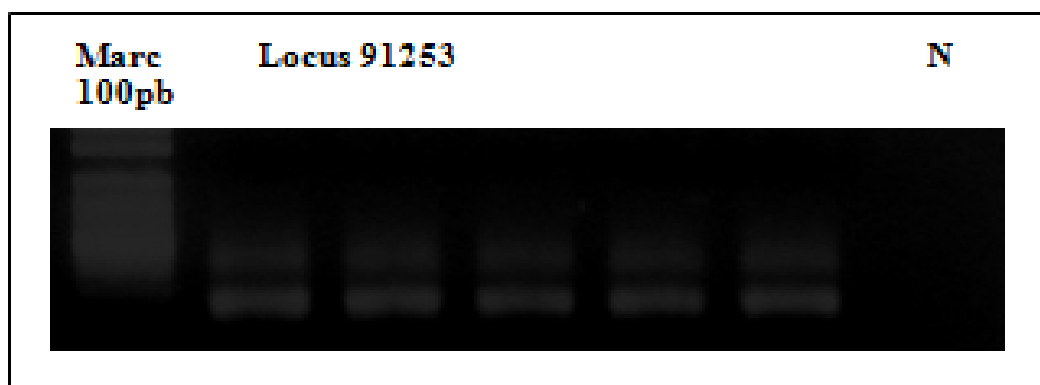
Os dados obtidos com mais de 130 espécies de Chordata também demonstram um baixo número de motivos de penta- e hexanucleotídeos, tornando difícil fornecer uma boa estimativa das suas proporções (Megléc *et al.*, 2012). Segundo os autores nenhum padrão surgiu nas frequências relativas dos motivos, tanto para plantas como para o grupo dos Chordata, salientando ainda que embora estes motivos apresentem-se ricos em CG, não parece haver outras relações entre eles.

Segundo Buschiazzo & Gemell (2006) dois dos principais mecanismos têm sido propostos para explicar a formação de microssatélites: formação espontânea de sequências únicas por substituição de inserção (Dieringer & Schlötterer, 2003) criando proto-microssatélites, em seguida microssatélites de alongamento ou a propagação de proto-ou completa ou por elementos transponíveis (Wilder & Hollocher, 2001). Para Megléc *et al.* (2012) a formação de proto-microssatélites é menos provável para motivos mais longos do que para os mais curtos, o que explicaria porque motivos dinucleotídicos são os mais frequentes na maioria dos táxons, e porque motivos do tipo pentanucleotídeos e hexanucleotídeos são raros. Dados de Megléc *et al.* (2012), demonstram que além das variações entre as frequências dos microssatélites e os tipos de repetições entre táxons, uma especificidade pode ser explicada, em parte, pela interação de mecanismos evolutivos através da seleção diferencial em regiões do genoma e em diferentes espécies, o que sugere que os motivos microssatélites podem ser de fato específicos e característicos conforme a espécie e sua suposta evolução genômica.

A partir dos 6.331 PALs obtidos para jundiá através da plataforma HiSeq (Illumina), um grupo de doze (10 tetra e 2 dinucleotídeos) loci foram selecionados com critérios semelhantes a Castoe *et al.* (2012) e *primers* específicos foram desenhados para obtenção dos fragmentos e posterior sequenciamento. Destes doze loci cinco tetranucleotídeos (Figura 7) e um dinucleotídeo (Figura 8) foram amplificados com êxito na avaliação inicial dos *primers*. O restante dos iniciadores não geraram os produtos de amplificação desejada sob as condições de PCR testadas. As sequências dos iniciadores, nome do locus, motivos das repetições, temperaturas de anelamento e o tamanho do produto de PCR para os doze loci microssatélite para jundiá encontram-se resumidos na tabela 1.



**Figura 7** - Amplificações de microssatélites tetranucleotídeos desenvolvidos para *Rhamdia sp.*, visualização em gel de agarose 1%. Microssatélites obtidos a partir de resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina long (100-101 pb).



**Figura 8** - Amplificações de microssatélite dinucleotídeo desenvolvido para *Rhamdia sp.* visualização em gel de agarose 1%. Microssatélites obtidos a partir de resultados com base em cinco milhões de leituras paired-end Illumina long (100-101 pb).

**Tabela 1-** Primers microssatélites desenvolvidos para *Rhamdia sp.* (jundiá), através do programa Primer3 (versão 2.0.0) (Rozen & Skaletsky, 2000).

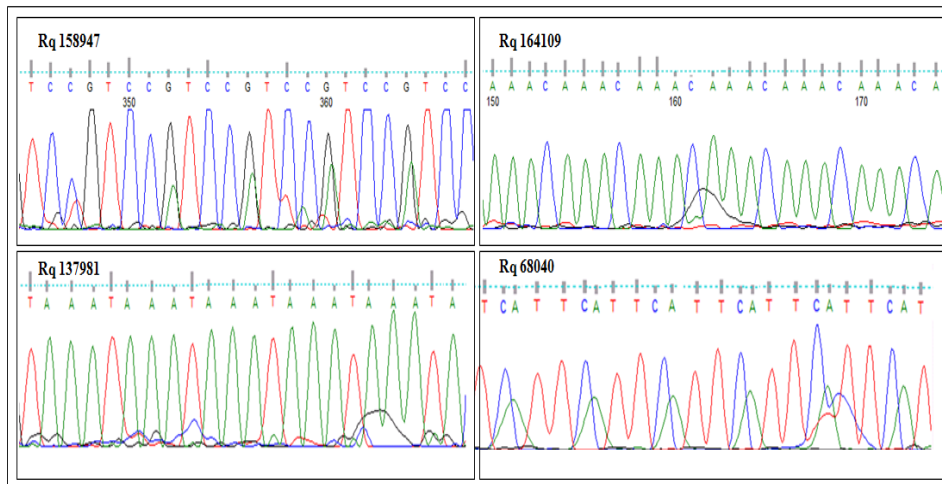
Locus	Sequência do primer (5' – 3')	Motivo de Repetição	T <sub>a</sub> (°C)	Tamanho do produto (pb)
Rq 158947	F: TGATAAACGACGGCCAGTCCTGCACTGTGCCAGAAGG R: ATCCATGCGTTTGTCCATGC	(TCCA) <sub>6</sub>	54,6°C	170 - 190
Rq 164109	F: TGATAAACGACGGCCAGTTGATACACTGGTGCGAATCC R: CAATGTCTTACATGCAGGTTCC	(AAAC) <sub>7</sub>	56,4°C	190 - 200
Rq 137981	F: TGACAATAAAGCAAGGTCATTTCCG R: TGATAAACGACGGCCAGTGGGTCTGAATCACCAGTTGC	(AAAT) <sub>5</sub>	56,4°C	150-170
Rq 68040	F: TGATAAACGACGGCCAGTGGTTAAAGTGAGCTCAGGCAGG R: GGCGGAGGAGAGAAAGGG	(AATG) <sub>6</sub>	68,5°C	140 - 150
Rq 91253	F: ACA ATT AAC CCG GCT CAGTCC R: CTG ACA GCA GCG GAA CGC	(AC) <sub>13</sub>	64,2°C	120 - 130
Rq 51373	F: TGATAAACGACGGCCAGTCACTCCATTGCAGCTTCTTCC R: ATC GAG TGA AAT GCA GCA GG	-	52°C	-
Rq 43102	F: TGATAAACGACGGCCAGTCTCCCACTCACTCACACATACG R: AACCGTTCCATGATGTTCCC	-	-	-
Rq 105923	F: TGATAAACGACGGCCAGTCACACGCAGATTTAATGAGGC R: CCACTGGATCACCGACTTACC	-	-	-
Rq 23018	F: TGATAAACGACGGCCAGTAAGGAACCGTCTTGTGACCG R: TTCATATGTAGAAACAACAACACTATTGGG	-	-	-
Rq 155485	F: TGATAAACGACGGCCAGTCTTCATGGTCAGCTGTGAGG R: GTGATGCGTTGCTTTCGG	-	-	-
Rq 193810	F: TTAATGATGATCGATATTATTGACG R: TGATAAACGACGGCCAGTAAAGGATGGATAGTCTCGCC	-	-	-
Rq 193399	F: TGCTGAACCTCCAAACGTTCC R: GACTAAAGCCGGGACCTTCC	-	-	-

T<sub>a</sub> °C: temperatura de anelamento.

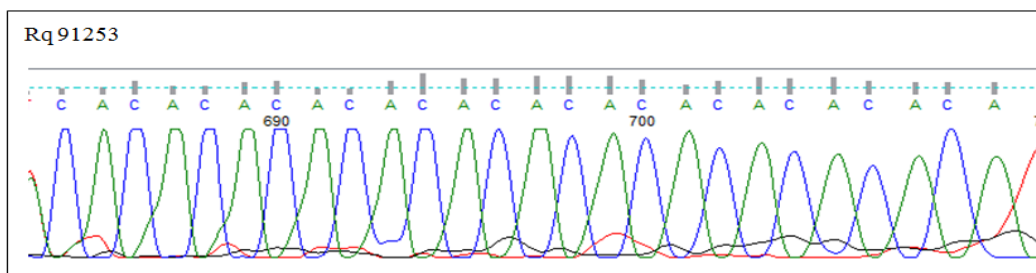
Para posterior análise, os fragmentos de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) obtidos a partir dos loci microssatélites desenvolvidos foram sequenciados pelo método de Sanger, o que possibilita o conhecimento da sequência completa dos microssatélites resultantes do sequenciamento de próxima geração através da plataforma HiSeq (Illumina).

Cinco loci de tetranucleotídeos e um dinucleotídeo foram testados, os fragmentos purificados com kit MiniPrep PCR Clean-up Axygen (United States) foram sequenciados em triplicatas. As amplificações obtidas a partir de PCR foram sequenciadas com o kit MegaBace sequencing (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) em um sequenciador MegaBace 1000 por capilaridade (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden).

Os loci microssatélites desenvolvidos para jundiá foram nomeados para posterior publicação no Gene Bank: Rq 158947, Rq 164109, Rq 137981, Rq 68040, Rq 51373 e Rq 91253. Como apresentado nas figuras 9 e 10, é possível observar que quatro dos cinco loci tetranucleotídeos e um dos dois loci dinucleotídeos escolhidos para análise apresentaram as sequências repetidas com os motivos obtidos através da plataforma HiSeq (Illumina).

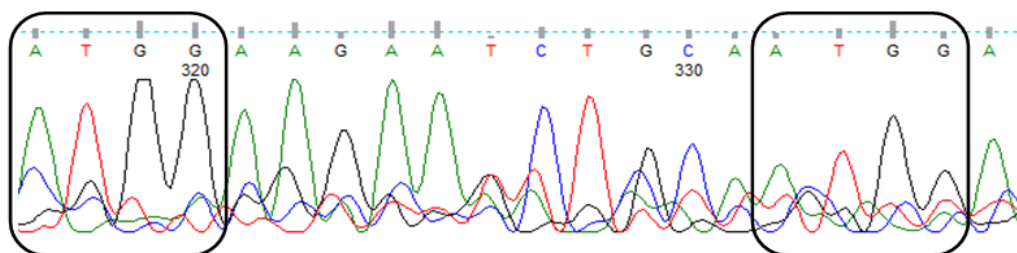


**Figura 9** – Sequências de tetranucleotídeos obtidas por sequenciamento do tipo Sanger a partir de loci microssatélites desenvolvidos para *Rhamdia sp.* (jundiá) através de sequenciamento de próxima geração.



**Figura 10** – Sequência de dinucleotídeo obtida por sequenciamento do tipo Sanger a partir de loci microssatélites desenvolvidos para *Rhamdia sp.* (jundiá) através de sequenciamento de próxima geração.

Contudo, o locus Rq 51373 apresentou um resultado distinto dos demais loci tetranucleotídeos sequenciados. A sequência de nucleotídeos não apresentou nenhum microssatélite, entretanto é possível que a região onde encontrava-se a sequência repetida SSR o sequenciamento não realizou a leitura (Figura 11). Análises posteriores deverão ser realizadas para este locus, a fim de verificar com maior acurácia a existência do microssatélite.

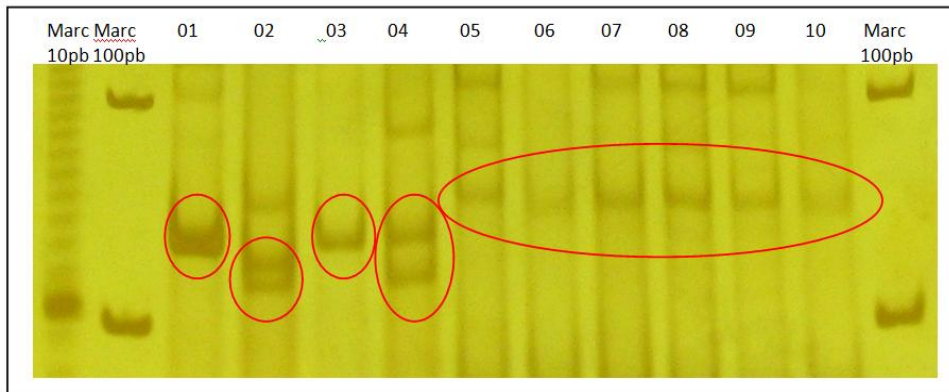


**Figura 11** – Locus Rq 51373. Sequência de tetranucleotídeos obtidas por sequenciamento do tipo Sanger a partir de loci microssatélites desenvolvidos para *Rhamdia sp.* (jundiá) através de sequenciamento de próxima geração.

Para avaliar o polimorfismo dos loci microssatélites, quatro tetranucleotídeos (Rq68040, Rq137981, Rq164109 e Rq51373) e um dinucleotídeo foram escolhidos e testados em seis populações de reprodutores de jundiá localizados em diferentes regiões do estado do Rio Grande do Sul. Um total de 172 indivíduos foi analisado. As amostras foram submetidas à genotipagem em gel de poliacrilamida 10% e corados com nitrato de prata (Qu *et al.*, 2005) (Figura 12).

O número médio de alelos por locus foi 6,14. O índice de endogamia com valores positivos sugere um déficit de heterozigotos para todos os *loci* analisados nas populações (Tabela 2). Entretanto, no locus 164109 duas populações apresentaram valores de Fis negativos evidenciando que não houve ocorrência de endocruzamentos nestas populações. A

partir de então, pode-se inferir que as populações apresentaram variação genética e que os marcadores microssatélites desenvolvidos apresentam polimorfismo (Figura 12).



**Figura 12** – Padrões de bandas dos loci microssatélites desenvolvidos para *Rhamdia sp.* (jundiá). Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata. Marcador de 10pb; Marcador de 100pb; Padrões de bandas dos diferentes loci (01 a 10).

Os loci Rq 51373 e Rq 158947 embora ambos tenha apresentado variações dentro das populações analisadas, os padrões de bandas não foram satisfatórios. Para tanto, o locus Rq 51373 algumas amostras não puderam ser genotipadas ocasionando, portanto, um valor de  $H_o$  (Heterozigidade observada) igual a zero e um  $F_{is}$  igual 1 (Tabela 2).

**Tabela 2-** Caracterização genética dos cinco loci microssatélites desenvolvidos para *Rhamdia sp.* (jundiá) em seis populações.

Locus	Motivo de Repetição	População	N	Na	Ho	Fis
Rq 164109	(AAAC) <sub>7</sub>	1	30	8	0,166	0,656
		2	30	7	0,400	0,343
		3	31	8	0,774	-0,036
		4	30	6	0,400	0,003
		5	30	5	0,633	-0,068
		6	21	7	0,333	0,290
Rq 137981	(AAAT) <sub>5</sub>	1	30	7	0,433	0,359
		2	30	7	0,600	0,210
		3	31	7	0,580	0,222
		4	30	4	0,300	0,291
		5	30	5	0,133	0,390
		6	21	4	0,380	0,209
Rq 68040	(AATG) <sub>6</sub>	1	30	5	0,200	0,647
		2	30	4	0,000	1,000
		3	31	6	0,645	0,063
		4	30	5	0,100	0,625
		5	30	3	0,166	0,444
		6	21	6	0,095	0,629
Rq 51373	(ATGG) <sub>24</sub>	1	30	4	0,000	1,000
		2	31	5	0,000	1,000
		3	30	1	0,000	-
		4	21	4	0,190	-
Rq 91253	(AC) <sub>13</sub>	1	30	10	0,133	0,794

Nome do Locus, Motivo de Repetição, N (número de indivíduos genotipados), Na (número de alelos), Ho (Heterozigosidade observada), Fis (Coeficiente de endogamia).

Analisando variabilidade genética em dois estoques de reprodutores de jundiá em Santa Catarina, Virmond *et al.* (2013) obteve elevado índice de polimorfismo em três loci microssatélites, com 63 alelos genotipados em um total de 71 indivíduos, o coeficiente de



endogamia com valores negativos nas duas populações evidenciando que não houve ocorrência de cruzamentos consanguíneos e as populações apresentaram diferenciação gênica e genotípica significativa.

Diferenças entre os valores encontrados por Virmond *et al.* (2013) e os dados encontrados nas populações do RS se deve ao fato principalmente de serem estoques de reprodutores reunidos de diferentes regiões do estado de Santa Catarina, com o objetivo de reunir a maior variabilidade genética possível para montar as famílias. No RS, segundo informações da EMATER e dos próprios produtores, existe troca de matrizes, ou seja, troca de reprodutores entre as propriedades que produzem alevinos de jundiá; ocasionando assim uma provável ocorrência de consanguinidade entre as populações e reduzindo a variabilidade genética existente.

### **Conclusão**

Através dos dados que foram gerados neste estudo, podemos definir que a estratégia de sequenciamento através de biblioteca shotgun paired-end da plataforma HiSeq (Illumina) apresentou-se eficaz para jundiá (*Rhamdia sp.*), gerando 6.331 loci microssatélites potencialmente amplificáveis. Os marcadores microssatélites desenvolvidos apresentaram variação dentro das populações, portanto, o sequenciamento de última geração apresentou-se como uma forma rápida e de baixo custo para desenvolver marcadores microssatélites para espécies não modelos, como o jundiá; disponibilizando dados em grande escala, possibilitando o avanço de pesquisas para a espécie.

### **Referências Bibliográficas**

- Abdelkrim, J., B. Robertson, J. A. Stanton & N. Gemell. 2009. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biotechniques*, 46: 185-192.
- An, H. S., J. W. Lee & S. W. Hong. 2012. Application of Novel Polymorphic Microsatellite Loci Identified in the Korean Pacific Abalone (*Haliotis diversicolor supertexta* (Haliotidae)) in the Genetic Characterization of Wild and Released Populations. *International Journal of Molecular Science*, 13: 10750-10764.
- Baldisserotto, B. 2004. Criação de Jundiá. Santa Maria, Editora UFSM, 232p.

Brasil. 2012. Ministério da Pesca e Aquicultura, Produção pesqueira e aquícola, Boletim Estatístico 2010. 129p. Disponível em <<http://www.mpa.gov/publicidade/publicacoes>> Acesso em: 12 de setembro de 2013.

Brownstein, M. J., J. D. Carpten & J. R. Smith. 1996. Modulation of nontemplated nucleotide addition by TAQ DNA polymerase: primer modifications that facilitate genotyping. *Biotechniques*, 20: 1004-1010.

Buschiazzo, E. & N. J. Gemmell. 2006. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. *Bioessays*. 28: 1040-1050.

Calabuig, C., M. D. N. Rodrigues, C. G. A. Moreira, D. B. Almeida, M. Katzenberger, A. Santos Júnior & H. L. M. Moreira. 2012. Genome-wide identification and characterization of microsatellite loci in coscoroba swan (*Coscoroba coscoroba*). *Genomics and Quantitative Genetics*, 5: 14-19.

Castoe, T. A., A. W. Poole, A. P. J. de Koning, K. L. Jones, D. F. Tomback, S. J. Oyler-McCance, J. A. Fike, S. L. Lance, J. W. Streicher, E. N. Smith & D. D. Pollock. 2012. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS ONE*, 7(2): e30953.

Dib, C., S. Fauré, C. Fizames, D. Samson, N. Drouot, A. Vignal, P. Millasseau, S. Marc, J. Kazan, E. Seboun, M. Lathrop, G. Gyapay, J. Morissette & J. Weissenbach. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*, 380: 152-154.

Dieringer, D. & C. Schlötterer. 2003. Two distinct modes of microsatellite mutation processes: Evidence from the complete genomic sequences of nine species. *Genome Research*, 13: 2242-2251.

Edwardsa, Y. J. K., G. Elgara, M. S. Clarka & M. J. Bishop. 1998. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: Perspectives in functional and comparative genomic analyses. *Journal of Molecular Biology*, 278: 843-854.

Huergo, G. M. & E. Zaniboni-Filho. 2006. Triploidy induction in jundiá *Rhamdia sp.*, through hydrostatic pressure shock. *Journal of Applied Aquaculture*, 18: 45-57.

Iranawati, F., H. Jung, V. Chand, D. A. Hurwood & P. B. Mather. 2012. Analysis of Genome Survey Sequences and SSR Marker Development for Siamese Mud Carp, *Henicorhynchus*

- siamensis*, Using 454 Pyrosequencing. International Journal of Molecular Science, 13: 10807-10827.
- Kang, J. H., J. Y. Park & H. S. Jo. 2012. Rapid Development of Microsatellite Markers with 454 Pyrosequencing in a Vulnerable Fish, the Mottled Skate, *Raja pulchra*. International of Journal Molecular Science, 13: 7199-7211.
- Katti, M. V., P. K. Ranjekar & V. S. Gupta. 2001. Differential distribution of simple sequence repeats in eukaryotic genome sequences. Molecular Biology and Evolution, 18: 1161-1167.
- Luo, W., Z. Nie, F. Zhan, J. Wei, W. Wang & Z. Gao. 2012. Rapid Development of Microsatellite Markers for the Endangered Fish *Schizothorax biddulphi* (Günther) Using Next Generation Sequencing and Cross-Species Amplification. International Journal of Molecular Science, 13: 14946-14955.
- Megléczy, E., G. Nève, E. Biffin & M. G. Gardner. 2012. Breakdown of Phylogenetic Signal: A Survey of Microsatellite Densities in 454 Shotgun Sequences from 154 Non Model Eukaryote Species. PLoS ONE, 7(7): e40861.
- Na-Nakorn, U., R. Yashiro, A. Wachirachaikarn & W. Prakoon. 2010. Novel microsatellites for multiplex PCRs in the Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828), and applications for broodstock management. Aquaculture, 306: 57-62.
- Pouey, J. L. O. F., S. R. N. Piedras, C. B. Rocha, R. A. Tavares, J. D. M. Santos & A. C. P. Britto. 2011. Desempenho produtivo de juvenis de jundiá (*Rhamdia* sp.) submetidos a diferentes densidades de estocagem. ARS Veterinária, 27(4): 241-245.
- Qu, L. J., X. Y. Li, G. Q. Wu & N. Yang. 2005. Efficient and sensitive method of DNA silver staining in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 26:99-101.
- Rozen, S. & H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. pp. 365-386. In: Krawets, S & Misener, S. (Eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, USA.
- Rouchka, E.C. 2010. Database of exact tandem repeats in the Zebrafish genome. BMC Genomics, 11(347): 1-11.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. Molecular Ecology Resources, 8: 103-106.

- Saarinen, E. V. & J. D. Austin. 2010. When technology meets conservation: Increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered okaloosa darter (*Etheostoma okaloosae*). *Journal of Heredity*, 101: 784-788.
- Santure, A. W., J. Gratten, J. A. Mossman, B. C. Sheldon & J. Slate. 2011. Characterisation of the transcriptome of a wild great tit *Parus major* population by next generation sequencing. *BMC Genomics*, 12(283): 1-18.
- Schorderet, D. F. & S. M. Gartler. 1992. Analysis of CpG suppression in methylated and nonmethylated species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89: 957-961.
- Silva, M., D. A. Matoso, L. A. M. Ludwig, E. Gomes, M. C. Almeida, M. R. Vicari & R. F. Artoni. 2011. Natural triploidy in *Rhamdia sp.* identified by cytogenetic monitoring in Iguaçú basin, southern Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, 91: 361-366.
- Silva, F. S. D., R. G. Moreira, C. R. Orozco-Zapata & A. W. S. Hilsdorf. 2007. Triploidy induction by cold shock in the South American catfish, *Rhamdia sp.* (Siluriformes) (Quoy and Gaimard, 1824). *Aquaculture*, 27: 110-114.
- Somridhivej, B., S. Wang, Z. Sha, H. Liu, J. Quilang, P. Xu, P. Li, Z. Hu & Z. Liu. 2008. Characterization, polymorphism assessment, and database construction for microsatellites from BAC end sequences of channelcatfish (*Ictalurus punctatus*): A resource for integration of linkage and physical maps. *Aquaculture*, 275: 76-80.
- Tian, C. X., X. F. Liang, M. Yang, H. Z. Zheng, Y. Q. Dou & L. Cao. 2012. Isolation and Characterization of Novel Genomic and EST-SSR Markers in *Coreoperca whiteheadi* Boulenger and Cross-Species Amplification. *International Journal of Molecular Sciences*, 13: 13203-13211.
- Tóth, G., Z. Gáspári & J. Jurka. 2000. Microsatellites in different eukaryotic genomes: Survey and analysis. *Genome Research*, 10: 967-981.
- Virmond, M. B., Junior, H. A., Conceição, D., Petersen, R. L. Utilização de marcadores microsatélites para análise da variabilidade genética de duas populações de jundiá (*Rhamdia sp.*). VI Workshop sobre jundiá, 2013. Florianópolis, 2013.
- Wang, Y. & X. Guo. 2007. Development and Characterization of EST-SSR Markers in the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *Marine Biotechnology*, 9: 500-511.

- Wang, D., X. Liao, L. Cheng, X. Yu & J. Tong. 2007. Development of novel EST-SSR markers in common carp by data mining from public EST sequences. *Aquaculture*, 3: 558-574.
- Wang, J., X. Yu, K. Zhao, Y. Zhang, J. Tong & Z. Peng. 2012. Microsatellite Development for an Endangered Bream *Megalobrama pellegrini* (Teleostei, Cyprinidae) Using 454 Sequencing. *International Journal of Molecular Science*, 13: 3009-3021.
- Wilder, J. & H. Hollocher. 2001. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 384-392.
- Yu, J. N., C. Won, J. Jun, Y. W. Lim & M. Kwak. 2011. Fast and cost-effective mining of microsatellite markers using NGS technology: An example of a Korean Water Deer. *Hydropotes Inermis Argyropus*. *PLoS One*, 6: e26933.
- Zhan, A. B., Z. M. Bao, X. L. Wang & J. J. Hu. 2005. Microsatellite markers derived from bay scallop *Argopecten irradians* expressed sequence tags. *Fisheries Science*, 71: 1341-1346.
- Zhan, A., Y. Wang, B. Brown & H. P. Wang. 2009. Isolation and Characterization of Novel Microsatellite Markers for Yellow Perch (*Perca flavescens*). *International Journal of Molecular Science*, 10: 18-27.

## 6. Conclusões

A produção de alevinos é um importante elo da cadeia produtiva da piscicultura do estado do Rio Grande do sul, gerando renda e emprego. Entretanto, verificou-se que inúmeras unidades produtoras de alevinos apresentam falhas na gestão e manejo empregados na qualidade de água e reprodução. Isto reforça a implementação de trabalhos em conjunto entre pesquisa, extensão e governo; visando difundir entre os produtores a importância do monitoramento e controle dos parâmetros físico-químicos de qualidade de água na produção de alevinos, além de desenvolver programas de melhoramento genético e tecnologias de planejamento e gestão que busquem a redução dos custos de produção e considerem a realidade local dos empreendimentos.

Através dos dados que foram gerados neste estudo, pode-se definir que a estratégia de sequenciamento através de biblioteca shotgun paired-end da plataforma HiSeq (Illumina) apresentou-se eficaz para jundiá (*Rhamdia sp.*), gerando 6.331 loci microssatélites potencialmente amplificáveis. Os marcadores microssatélites desenvolvidos apresentaram variação dentro das populações. O sequenciamento de última geração apresentou-se como uma forma rápida e de baixo custo para desenvolver marcadores microssatélites para espécies não modelos, como o jundiá; disponibilizando dados em grande escala, possibilitando o avanço de pesquisas para a espécie.

## 7. Referências Bibliográficas

ABDELKRIM, J.; ROBERTSON, B. C.; STANTON, J. A. L.; GEMMELL, N. J. Fast, cost-effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. **BioTechniques**, v. 46, p. 185-192, 2009.

ALVES, R. M.; SEBBERN, A. M.; ARTERO, A. S.; FIGUEIRA, A. Microsatellite loci transferability from *Theobroma cacao* to *Theobroma grandiflorum*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 2, p. 1219-1221, 2006.

AMARAL JR, H.; CECHINEL, K. C.; GARCIA, S.; ROCHA, D. J.; BOANINI, A. Definição de protocolo na produção de mono sexo de jundiá *Rhamdia sp.*, através do uso de estrógenos. In: AMARAL JR, H.; GARCIA, S. **O jundiá: relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce mais promissor da região sul do Brasil**. Camburiú: Rede jundiá, 2013. p. 18-31.

AUOZANI, L. A. Aquicultura no Brasil: aspectos históricos e políticas de desenvolvimento. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas**. Passo Fundo: UPF Editora, 2013. p. 27-42.

BALDISSEROTTO, B. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. 232p.

BALDISSEROTTO, B. **Effect of dietary calcium on growth and survival of silver catfish fingerlings, *Rhamdia sp.* (Heptapteridae), exposed to different water pH**. *Aquaculture Nutrition*, v.11, p. 345-350, 2005.

BARCELLOS, L. J. G. Introdução. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas**. Passo Fundo: UPF Editora, 2013. p. 9-22.

BEIGUELMAN, B. **Genética de Populações humanas**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 235 p.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura, Produção pesqueira e aquícola, Boletim Estatístico 2010 (2012). Disponível em <<http://www.mpa.gov/publicidade/publicacoes>> Acesso em: 15 de março de 2012.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura, Produção pesqueira e aquícola, Boletim Estatístico 2008/2009 (2010). Disponível em <<http://www.mpa.gov/publicidade/publicacoes>> Acesso em: 15 de março de 2012.

BUSCHIAZZO, E.; GEMMELL, N. J. The rise, fall and renaissance of microsatellites in eukaryotic genomes. **BioEssays**, v. 28, p. 1040-1050, 2006.

CALABUIG, C.; RODRIGUES, M. D. N.; MOREIRA, C. G. A.; ALMEIDA, D. B.; KATZENBERGER, M.; SANTOS JÚNIOR, A.; MOREIRA, H. L. M. Genome-wide identification and characterization of microsatellite loci in coscoroba swan (*Coscoroba coscoroba*). **Genomics and Quantitative Genetics**, v. 5, p. 14-19, 2012.

CAMACHO, J. P. M. **Polymorphisms and geographic distribution**. In: Firt B – Chromosome conference. Universidade Autonoma de Madrid, Spain, 1993.

CARNEIRO, P. C. F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J. D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P. R. C. Resultados preliminares sobre o jundiá, *Rhamdia* sp., como espécie importante para a piscicultura na região Sul do Brasil. SIMPÓSIO BRASILEIRO DE AQUICULTURA, 12, 2002, Goiânia. **Anais do Simpósio Brasileiro de Aquicultura**. Curitiba:CAUNESP/ESALQ, 2002. 403p.

CASTOE, T. A.; POOLE, A. W.; DE 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(2), p. e30953, 2012.

EMATER/ASCAR. **Diagnóstico da piscicultura (regional Ijuí)**. Ijuí, 2006. 10p. (Boletim técnico).



ESQUIVEL, B. M. **Produção do jundiá (*Rhamdia sp.*) em áreas de entorno do Parque Estadual da Serra do Tabuleiro em Paulo Lopes – SC.** 2005. 102f. Tese de Doutorado (Tese em Engenharia de Produção) – Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Produção, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FAO - The State of World Fisheries and Aquaculture 2012. Disponível em: <http://www.fao.org/fishery/statistics/en>> Acesso em: 25 de setembro de 2013.

FERREIRA, M. E. GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** 2. ed. Brasília: Embrapa Cenargen, 1998. 220p.

GARCIA, S.; AMARAL JR, H.; SOUTO, L. I. M.; WARMLING, P. F.; SILVA, N. R.; BERNARDES JR, J. J. Cultivo de mono sexo de jundiá *Rhamdia sp.*. In: AMARAL JR, H.; GARCIA, S. **O jundiá: relatos de avanços no cultivo do peixe de água doce mais promissor da região sul do Brasil.** Camburiú: Rede jundiá, 2013. p. 32-41.

GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia sp.* (Teleostei, Pimelodidae). **Ciência Rural**, v. 30, p.170-185, 2000.

GRODZICKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. Physical mapping of temperatures-sensitive mutations of adenoviruses. In: **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, p. 439-446, 1974.

GUEDES, D. S. **Contribuição ao estudo da sistemática e alimentação de jundiás (*Rhamdia spp*) na região central do Rio Grande do Sul (Pisces, Pimelodidae).** 1980. 99f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G. **Princípios de Genética de Populações.** 4. ed. Porto Alegre: ArtMed Editora, 2010. 660p.

HOFFMAN, G. L. Ciliates of freshwater fishes. In: KREIER, J. P. **Parasitic protozoa: Intestinal flagellates, histomonads, trichomonads, amoeba, opalinids, and ciliates**. London: Academic Press, 1978, p. 583-632.

HUNTER, R. L.; MARKET, C. L. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. **Science**, v. 125, p. 1294-1295, 1957.

IRANAWATI, F.; JUNG, H.; CHAND, V.; HURWOOD, D. A.; MATHER, P. B. Analysis of Genome Survey Sequences and SSR Marker Development for Siamese Mud Carp, *Henicorhynchus siamensis*, Using 454 Pyrosequencing. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 10807-10827, 2012.

JEFFREYS, A. J.; WILSON, V.; THEIN, S. L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, v. 314, p. 67-73, 1985.

LIDANI, K. C. F.; LIMA, J. R.; TORRES, R. A.; GABRIEL, J. E.; MADEIRA, H. M. F.; CARNEIRO, P. C. F. Genetic Variability of Jundiá (*Rhamdia* sp.) in Captivity. **Revista Acadêmica**, v.4, n. 3, p. 47-53, 2006.

LITT, M.; LUTY, L. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, n.3, p. 398-401, 1989.

LOPES, J. M. **Influência do pH da água na sobrevivência e crescimento de larvas de jundiá *Rhamdia* sp. ( QUOY & GAIMARD, 1824, PISCES, PIMELODIDAE) em duas épocas de desovas**. 1998. 60f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia), Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

LUCHINI, R., SALAS, T. Cria de larvas de *Rhamdia sapo* (Val.) Eig. en estanques primeros ensayos. **Revista de La Asociacion de Ciencias Naturales del Litoral**, v. 14, n. 1, p. 79-86, 1983.

LUCHINI, L.; SALAS, T. A. Primer alevinaje de bagre sudamericano, *Rhamdia sapo* (Val.) Eig. en condiciones controladas. **Revista de la Asociacion de Ciências Naturales del Litoral**, v. 16, n. 2, p. 137-147, 1985.

MARCHIORO, M. I. **Sobrevivência de alevinos de jundiá (*Rhamdia sp.* Quoy & Gaimard, 1824, Pisces, Pimelodidae) à variação de pH e salinidade da água de cultivo.** 1997. 87f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

MARTINS, M. L.; MARCHIORI, N. C.; GARCIA, P. Doenças parasitárias do jundiá. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas.** Passo Fundo: UPF Editora, 2013. p. 184-221.

MARTINS, M. L.; MARCHIORI, N. C.; NUNES, G.; RODRIGUES, M. P. First record of *Trichodina heterodentata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 637-644, 2010.

MATTEWS, R. A. *Ichthyophthirius multifiliis* fouquet e ichthyoftitiosis in freshwater teleosts. **Advances in Parasitology**, v. 59, p. 159-241, 2005.

MEURER, S.; ZANIBONI FILHO, E. Hábito alimentar do jundiá *Rhamdia sp.* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae), na região do alto rio Uruguai. XII ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, São Paulo, SP, 1997. **Anais do XII Encontro Brasileiro de Ictiologia.** São Paulo: SBI, 1997. 420 p.

MEYER, G.; FRACALLOSSI, D. M. Protein requirement of jundia fingerlings, *Rhamdia sp.*, at two dietary energy concentrations. **Aquaculture**, v. 240, p.331-343, 2004.

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

MORAES, F. R.; MARTINS, M. L. Condições predisponentes e principais enfermidades de teleósteos em piscicultura intensiva, In: CYRINO, J. E. P.; URBINATI, E. C.; FRACALLOSSI, D. M. **Tópicos especiais em piscicultura de água tropical intensiva.** São Paulo: TecArt, 2004. p. 343-383.

OLIVEIRA, C. A. L.; OLIVEIRA, S. N.; STREIT-JÚNIOR, D. P.; RIBEIRO, R. P. Perspectivas do melhoramento genético de jundiá – *Rhamdia sp.*. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas**. Passo Fundo: UPF Editora, 2013. p. 164-183.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

PARK, L. K.; MORAN, P. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. In: CARVALHO, G. R.; PITCHER, T. J. (Eds.). Molecular genetics in fisheries. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 4, p. 272- 299, 1994.

PEREIRA, C. R.; BARCELLOS, L. J. G.; KREUTZ, L. C.; QUEVEDO, R. M.; RITTER, F.; SILVA, L. B. Embryonic and larval development of jundiá (*Rhamdia sp.*, Quoy & Gaimard, 1824, 56 Pisces, Teleostei), a South American catfish. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 1057-1063, 2006.

PIAIA, R.; RADÜNZ NETO, J. Avaliação de diferentes fontes protéicas sobre o desempenho inicial de larvas do jundiá *Rhamdia sp.*. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 319-323, 1997.

PIAIA, R.; TOWNSEND, C. R.; BALDISSEROTTO, B. Growth and survival of fingerlings of *Rhamdia sp.* exposed to different light regimes. **Aquaculture International**, v. 7, p. 201-205, 1999.

RADÜNZ NETO, J.; VEIVERBERG, C. A.; LAZZARI, R. Nutrição do jundiá. In: BARCELLOS, L. J. G.; FAGUNDES, M.; FERREIRA, D. **Workshop sobre jundiá: história e perspectivas**. Passo Fundo: UPF Editora, 2013. p. 239-252.

RODRIGUES, M. D. N.; MOREIRA, C. G. A.; CALABUIG, C. P.; GUTIERREZ, H. J. P.; DUARTE, R. T.; ALMEIDA, D. B.; STREIT JR, D. P.; MOREIRA, H. L. M. Desenvolvimento de marcadores microsatélites para uso no melhoramento genético de jundiá (*Rhamdia sp.*). In: Aquaciência 2012, Palmas. Anais do Aquaciência 2012, Palmas: Aquabio, 2012.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STROFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzyme amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p. 487-491, 1988.

SAARINEN, E. V.; AUSTIN, J. D. When technology meets conservation: Increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered okaloosa darter (*Etheostoma okaloosae*). **Journal of Heredity**, v. 101, p. 784-788, 2010.

SCHMALE, M. C.; VICHA, D.; CACAL, S. M. Degranulation of eosinophilic granule cells in neurofibromas and gastrointestinal tract in the bicolor damselfish. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 17, p. 53-63, 2004.

SCORVO-FILHO, J. D.; FRASCÁ-SCORVO, C. M. D.; ALVES, J. M. C.; SOUZA, F. R. A. A tilapicultura e seus insumos, relações econômicas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p.112-118, 2010.

SHAMA, S. **Identificação de bactérias patogênicas em cultivo semi-intensivo de Jundiá (*Rhamdia sp.*), Pisces, Pimelodidae**. 1997. 57f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

SILFVERGRIP, A. M. C. **A systematic revision of the Neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 1996. 156f. Thesis (PhD in Zoology) - Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Meseum of Natural History, Stockholm University.

SILVA, L. V. F.; RADÜNZ NETO, J.; BALDISSEROTTO, B. Reprodução de jundiá. In: BALDISSEROTTO, B.; RADÜNZ NETO, J. **Criação de Jundiá**. Santa Maria: Editora UFSM, 2004. p. 95-106.

TOSTAIN, S.; AGBANGLA, C.; SCARCELLI, N.; MARIA, C. C.; DAINOU, O.; BERTHAUD, J.; PHAM, J. L. Genetic diversity analysis of yam cultivars (*Dioscorea rotundata* Poir) in Benin using simple sequence repeat (SSR) markers. **Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization**, v. 5, n. 2, p. 71-81, 2007.

VAZ, B. S.; CERQUEIRA, G. M.; SILVA, J. C.; MANZKE, V. H. B.; MOREIRA, C. G. A.; MOREIRA, H. L. M. Sequence analysis of the growth hormone gene of the South American catfish *Rhamdia sp.*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9 (4), p. 2184-2190, 2010.

VEIVERBERG, C. A. **Alimentos convencionais na engorda e qualidade de pescado do jundiá (*Rhamdia sp.*)**. 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

VOLOBUJEV, V. T. The B-chromosome system of mammals. **Cryologia**, v. 34, p. 1-23, 1981.

WANG, D. G.; FAN, J. B.; SIAO, C. J.; BERNO, A.; YOUNG, P.; SAPOLSKY, R.; GHANDOUR, G.; PERKINS, N.; WINCHESTER, E.; SPENCER, J.; et al. Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. **Science**, v. 280, p. 1077-1082, 1998.

WANG, J.; YU, X.; ZHAO, K.; ZHANG, Y.; TONG, J.; PENG, Z. Microsatellite Development for an Endangered Bream *Megalobrama pellegrini* (Teleostei, Cyprinidae) Using 454 Sequencing. **International Journal of Molecular Science**, v. 13, p. 3009-3021, 2012.

WATSON, D. E. Digenea of Fishes from Lake Nicaragua. Investigations of the Ichthyofauna of Nicaraguan. Lincoln: University of Nebraska, p. 252-260, 1976.

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

YU, H.; XIE, W.; WANG, J.; XING, Y.; XU, C.; LI, X.; XIAO, J.; ZHANG, Q. Gains in QTL detection using an ultra-high density SNP map based on population sequencing relate to traditional RFLP/SSR markers. **PLoS One**, v. 6, p. e17595, 2011.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C. R.; POLI, A. T. B.; ANDREATTA, E. R.; BELTRAME, E. **Aquicultura:**

**experiências brasileiras.** 1. ed. Santa Catarina: Multitarefa, 2004. cap. XIV, p.337-368.

ZABEAU, M; VOS, P. **Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting.** European Patent Application, Publication # 0534858-A1, Office européen des brevets, Paris. 1993.