

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**MESTRADO**

**Desenvolvimento e identificação de microssatélites para  
pirarara – *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes,  
Pimelodidae) - para análise de variabilidade genética**

**Caroline Araújo de Souza**

**Botucatu, SP  
2012**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

**Caroline Araújo de Souza**

**Desenvolvimento e identificação de microssatélites para  
pirarara – *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes,  
Pimelodidae) - para análise de variabilidade genética**

Dissertação apresentada ao  
Instituto de Biociências de  
Botucatu, Universidade Estadual  
Paulista – UNESP, como parte dos  
requisitos para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas.  
Área de concentração: Zoologia.

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Porto-Foresti**

**Botucatu, SP**  
**2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Souza, Caroline Araújo de.

Desenvolvimento e identificação de microsatélites para pirarara -  
*Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes, Pimelodidae) : para  
análise de variabilidade genética / Caroline Araújo de Souza. – Botucatu  
: [s.n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de  
Biotecnologia de Botucatu

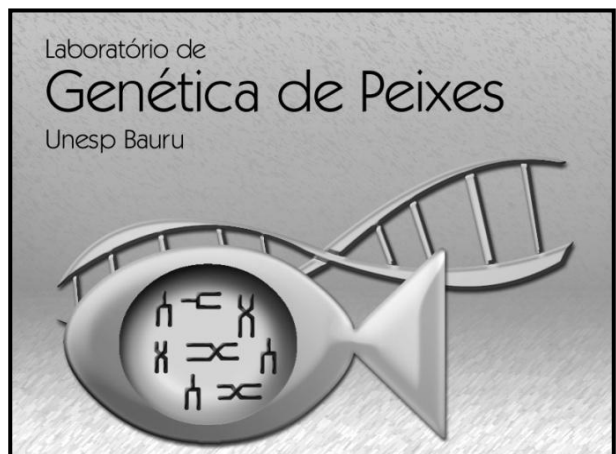
Orientador: Fábio Porto Foresti

Capes: 20204000

1. Peixe - Genética - Identificação. 2. Genética molecular.

Palavras-chave: Genética da conservação; Microsatélites;  
Pimelodidae; Variabilidade.

Laboratório de  
**Genética de Peixes**  
Unesp Bauru



*Para os meus pais, que me proporcionaram uma vida digna, ensinando-me que tudo é possível desde que sejamos honestos e íntegros de caráter. Que sonhar e concretizar os sonhos só dependerá de nossa vontade.*

*A constância é contrária à natureza, contrária à vida. As únicas pessoas completamente constantes são os mortos.*

*Aldous Huxley*

## **AGRADECIMENTOS**

*O meu agradecimento especial às instituições e pessoas que contribuíram de alguma maneira para a realização deste trabalho, em particular:*

*Ao Laboratório de Genética de Peixes (UNESP, Bauru) e ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (UNESP, Botucatu), pela estrutura fornecida para a realização deste trabalho.*

*Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de auxílio financeiro.*

*Ao Hotel Fazenda Kuryala, pela atenção e solicitude com que me atenderam e recolheram as amostras rapidamente, especialmente pela pessoa de Ingrid Ritter.*

*Aos professores e técnicos da UNESP de Bauru e de Botucatu, especialmente Renato Devidé pelas caronas, coletas e constante disposição para ajudar.*

*Aos professores Cláudio Oliveira e Fausto Foresti, pelos ensinamentos e pela amizade, que só somaram à minha formação.*

*Ao Dr. Luiz Garcia Henrique Pereira pela valiosa contribuição e horas dispensadas na elucidação de diversas dúvidas que surgiram pelo caminho. Obrigada pela paciência!*

*Ao Prof. Dr. Fábio Porto Foresti, meu orientador desde a iniciação científica, pelas oportunidades oferecidas, pelo incentivo e entusiasmo contagiantes que foram de grande valia para a minha formação. Também não poderia esquecer de agradecê-lo mais uma vez pelos chaveirinhos de Lego Star Wars mais legais deste quadrante da galáxia.*

*Aos colegas do Laboratório de Genética de Peixes que ficam e aos que já se foram: Ana, Andrea, Bruna, Camila, Daniela, Diogo, Isabela, Jake, Josi, Larissa, Maíce, Manolo, Rosângela, Sandro. Gostaria de agradecer especialmente às minhas amigas Tatiana e Fernanda, por todos os momentos de risada, de 'fofoquinha', congressos, viagens, coletas, em todos esses 6 anos. Vocês me ensinaram muito do que eu sei hoje de genética e de citogenética, sobre caráter e ética profissional, e também lhes devo parte da minha formação.*

*Aos meus amigos de Bauru, que me farão muita falta: Paloma e Tiago, Jana e Charlene, Paty, Abner, Serginho, Lauro. Muito obrigada pelas horas de risada!*

*Aos meus amigos de São Paulo, sempre presentes, apesar da distância: Héliida, Leandro, Lilian, Felipe Moranis – muito obrigada pelo apoio.*

*À minha família original de São Paulo: meus queridos pais, irmão, e bichinhos de estimação. O ano de 2011 foi especialmente difícil, mas acredito que há sempre o melhor no final de todas as histórias para as pessoas de bom coração e de boa vontade. Ainda não terminou. À vocês minha eterna gratidão pelo carinho, incentivo, compreensão e confiança na minha capacidade.*

*À família Viégas (cunhados, sobrinhos e tias) pelo carinho que sempre me acolheram, pelas boas horas de risada e de calma como só vocês sabem proporcionar. Em especial à minha querida Dona Sogra, pela ajuda prestada, por ter me recebido com todo o carinho em sua linda família, e por sempre fazer minhas comidinhas prediletas.*

*Ao meu companheiro da vida, André - pelo amor; pela nossa alegre convivência; por colorir meus dias com sua leveza de espírito; por sempre ter um*



*abraço para me acalmar; por me fazer rir de mim mesma, de tudo e de todos. Muito obrigada, você foi imprescindível nesses dois anos, não teria conseguido sem você.*

*A todos que me cercam e aos que já cruzaram meu caminho, ajudando de alguma forma minha formação pessoal e profissional, meu muito obrigada.*

## SUMÁRIO

	Pg
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>11</b>
1.1 A bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins: rio Araguaia e seu tributário Rio das Mortes	13
1.2 Considerações gerais sobre a espécie <i>Phractocephalus hemioliopterus</i>	15
1.3 Marcadores microssatélites e estudos de variabilidade genética	18
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.1 Materiais	23
3.2 Métodos	23
3.2.1 Extração de DNA	23
3.2.2 Isolamento e identificação de microssatélites	25
3.2.3 Validação dos <i>primers</i> de microssatélites	27
3.2.4 Amostras de espécies relacionadas: <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> , <i>Zungaru jahu</i> , <i>Hemisorubim platyrhynchus</i> , <i>Leiarius marmoratus</i> , <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> , <i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	29
3.2.5 Análises estatísticas	29
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>31</b>
4.1 Isolamento e caracterização dos marcadores microssatélites	31
4.2 Variabilidade genética intrapopulacional	33
4.3 Desequilíbrio de ligação	36
4.4 Análise interpopulacional	37
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
5.1 Análise intrapopulacional e variação dos microssatélites de <i>Phractocephalus hemioliopterus</i>	39

5.2 Estruturação genética em populações de <i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	42
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>50</b>
<b>8 ANEXOS</b>	<b>59</b>
8.1 Artigo publicado: Development and characterization of microsatellite loci in <i>Phractocephalus hemiliopterus</i> (Siluriformes: Pimelodidae) and their cross-species amplification in six related species.	59

## RESUMO

A pirarara (*Phractocephalus hemiliopterus*) é um bagre nativo das bacias do rio Amazonas e Tocantins-Araguaia que pode atingir na sua fase adulta cerca de 60 kg. A pirarara é comercializada como peixe ornamental e é um peixe atrativo para a pesca esportiva. A espécie pertence à família Pimelodidae e tem sido ameaçada em seu habitat devido à crescente interferência antrópica nas últimas décadas. O acesso aos dados sobre a situação destas populações constitui um importante meio para o delineamento de projetos de manejo, a fim de conservar a espécie e manter os estoques de reprodutores para piscicultura. Para este fim, os marcadores microssatélites são interessantes para estudos genéticos devido a sua natureza codominante e multialélica, características ideais para serem utilizados em estudos de mapeamento genético, identificação e elucidação de questões sobre a genética de populações de diferentes organismos. Neste contexto, o presente projeto teve por objetivo a identificação e seleção de marcadores moleculares tipo microssatélites para indivíduos da espécie *Phractocephalus hemiliopterus*, coletados nos Rios Araguaia e Rio das Mortes, e avaliar a estrutura e os níveis de diversidade genética nessas duas localidades. Inicialmente, foram seqüenciadas 67 colônias recombinantes, dos quais apenas 32 continham sequências repetitivas do tipo microssatélite. Destas, 62,5% eram repetições dinucleotídicas e o restante composto por trinucleotídeos e tetranucleotídeos repetidos de forma imperfeita. Deste total, foi possível desenhar *primers* para 26 *loci*. Após a amplificação por PCR, 9 *loci* se mostraram polimórficos e informativos, e foram testados em seis espécies próximas, para a investigação de regiões no DNA altamente conservadas, com sucesso de amplificação de 81,4%. A heterozigosidade observada variou de 0,421 a 0,947. As duas localidades apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ( $p < 0,01$ ) para alguns *locus*, o que pode ser devido à presença de alelos nulos ou problemas na amplificação. Os testes para estruturação populacional [Fst, Rst, AMOVA e análise de fluxo gênico (Nm)] foram significativos ( $p < 0,05$ ), evidenciando estruturação populacional para as duas populações analisadas.

## ABSTRACT

The catfish pirarara (*Phractocephalus hemioliopus*) is a native Amazonas and Tocantins-Araguaia basin fish, which can weigh up to about 60 kg in its adult form. The pirarara is marketed as an ornamental fish and it is an attraction for sport fishing. The species belongs to the family Pimelodidae and it has been threatened in its habitat due to increasing human interference in recent decades. Access to data on the situation of these populations is an important means for the design of management projects in order to conserve the species and maintaining the stocks of fish breeding. The microsatellite markers for genetic studies are interesting because of their codominant and multiallelic nature, ideal characteristics for use in studies of gene mapping, identification and elucidation of questions about population's genetics of different organisms. In this context, this project aimed to identify and select microsatellite markers on *Phractocephalus hemioliopus* individuals, collected in the Araguaia and das Mortes Rivers, and to evaluate the structure and levels of genetic diversity. Initially, 67 recombinant colonies were sequenced, of which only 32 contained repetitive sequences of the microsatellite type. Of these, 62.5% were dinucleotide repeats, and the remainder consisted of trinucleotide and tetranucleotide imperfect repeats. Of this total, it was possible to design primers for 26 loci. After PCR amplification, nine loci showed to be polymorphic and informative, and were tested on six related species for the investigation of highly conserved DNA regions, with a successful amplification of 81.4%. The observed heterozygosity ranged from 0.421 to 0.947. The two sites showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) ( $p < 0.01$ ) for some loci, which may be due to the presence of null alleles or even problems in allele amplification. All populations tests for structuring [FST, RST, AMOVA analysis and gene flow (Nm)] were significant ( $p < 0.05$ ), indicating the existence of population structure.

# *Introdução*

---

## 1 INTRODUÇÃO

A genética da conservação utiliza ferramentas biotecnológicas em prol da preservação da biodiversidade, sendo empregada com diversos objetivos - desde a discriminação de espécies ou subespécies ameaçadas de extinção até a elaboração final de projetos de manejo estratégico e determinação de *status* de conservação de uma espécie (Frankham et al., 2002). O Brasil, apesar de ser detentor de abundantes recursos hídricos e grande biodiversidade, ainda engatinha em questões relacionadas à proteção e uso adequado de seus recursos baseando-se em novas tecnologias moleculares.

As ações antrópicas, dentre as quais podemos destacar: os assentamentos urbanos, a exploração - turística, pesqueira, mineral – sem planejamento adequado, têm causado mudanças drásticas nos habitats e nas espécies locais. Diretamente, os recursos aquáticos têm sido duramente alterados, e Tuxtill (1998) estimou que cerca de 1/3 dos organismos aquáticos encontra-se em risco de extinção devido às modificações nos habitats.

No país, segundo Godinho et al. (2006), os representantes da família Pimelodidae – e não somente eles – têm sofrido um declínio evidente nos números populacionais, e ainda Agostinho et al. (2005) relatam que esta perda é devida principalmente: à construção de barragens para a geração de energia elétrica, que modifica as condições bióticas e abióticas do meio; destruição de lagoas marginais usadas durante o período reprodutivo de muitas espécies; poluição, assoreamento e mudança do curso dos rios; a introdução indiscriminada de espécies exóticas, entre outros. Em agravamento do quadro, conforme Braga et al. (2004), grande parte das

decisões tomadas por órgãos reguladores governamentais – como a reintrodução de peixes, por exemplo – ocorrem valendo-se de informações imprecisas e sofrem com a carência de informações sistematizadas. Seguindo esta linha, os trabalhos empíricos capazes de criar indicadores confiáveis, são extremamente importantes e cruciais para dar embasamento às decisões políticas quanto à conservação dos recursos.

Sendo assim, também como proposto pela Embrapa-Aquabrazil (Edital 01/2006), o desenvolvimento de informações e tecnologias deve ser adaptado às condições de cada localidade, afim de aumentar a produção aquícola, promover a sustentabilidade da exploração, e principalmente, sob a diretriz da produção e melhoramento de espécies nativas, com a intenção de reduzir o impacto que espécies introduzidas e práticas de cultivo causam nos ecossistemas continentais nacionais. Desta forma, a aquicultura aparece como uma forma de proteger os estoques naturais contra a exaustão provocada pela pesca excessiva ou predatória, já que o fato de cultivar peixes para consumo e não extraí-los indiscriminadamente do meio ambiente conferem um alto valor de proteção ambiental.

A piscicultura está presente em todos os estados do Brasil, e vem assumindo um importante papel, aparecendo como uma alternativa, tanto no que se refere à diversificação dos negócios agropecuários, quanto na otimização dos recursos disponíveis. Ceccarelli et al. (2000) preconizam que esta cultura zootécnica é economicamente viável e o país têm grande potencial de desenvolvimento nesta área, graças a fatores como clima, diversidade de espécies, disponibilidade de água, tipo e extensão do solo, além de facilidade de acessos aos locais de produção.

Considerando-se a grande diversidade da ictiofauna neotropical, a



importância de algumas espécies para a pesca e o decréscimo dos embarques pesqueiros, a utilização de marcadores genéticos moleculares pode ser de grande auxílio na elaboração de programas de conservação dos recursos pesqueiros, podendo atuar na identificação, caracterização e monitoramento genético das espécies de peixes utilizados como matrizes ou produzidos em estações de reprodução (Marques, 2002).

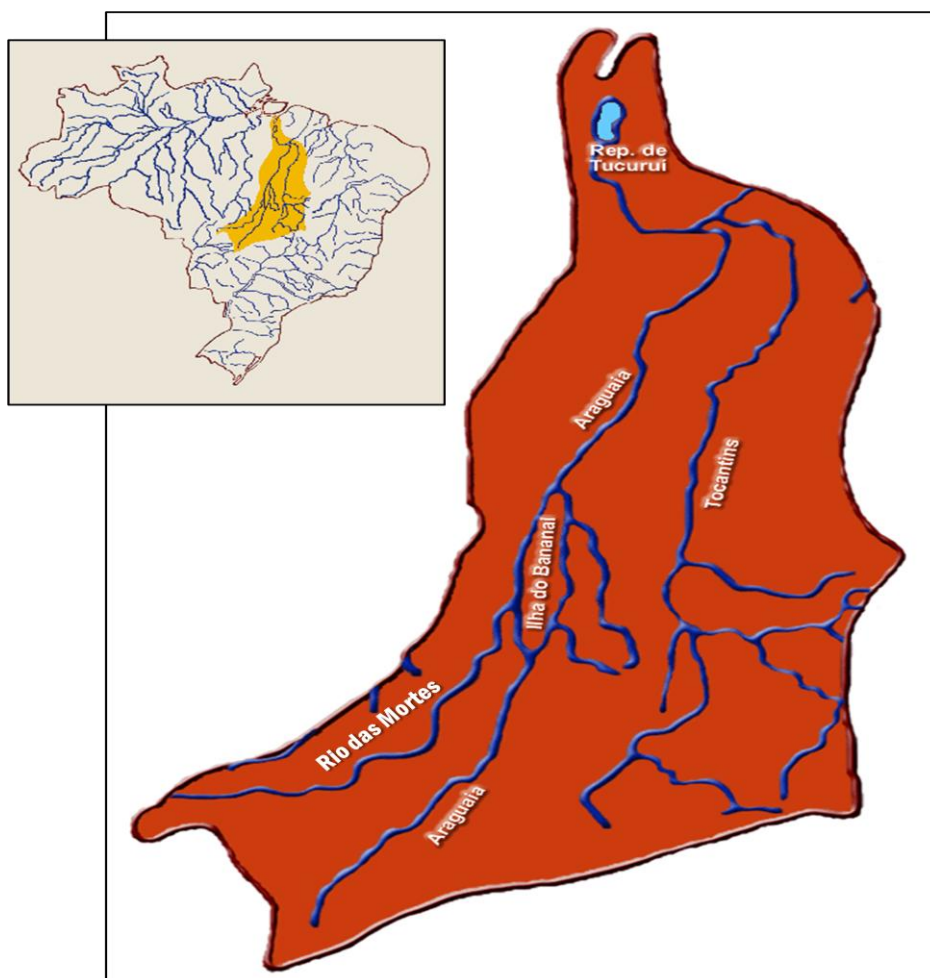
A atividade de monitoração genética dos estoques pesqueiros é necessária, sendo recomendada sua inclusão nos programas de conservação, a fim de evitar o declínio deste recurso. Neste sentido, a biologia molecular, como ferramenta, têm sido utilizada de forma rápida e apropriada, principalmente devido à especificidade de seus resultados que permite desde a formulação de estimativas do grau de variabilidade de uma dada população até a construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco (Marques, 2002).

### **1.1 A bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins: rio Araguaia e seu tributário Rio das Mortes**

O Brasil possui em seu território os maiores rios do continente sul americano. Nas regiões Norte e Centro-Oeste, podemos destacar a bacia hidrográfica do Rio Amazonas com descarga média anual de 1750 mil m<sup>3</sup>/seg e a bacia dos rios Araguaia-Tocantins com 11 mil m<sup>3</sup>/seg, cobrindo uma área de aproximadamente 7,1 x 10<sup>6</sup> km<sup>2</sup> (Junk e Melo, 1987).

A bacia hidrográfica Araguaia-Tocantins (Figura 1) é considerada um dos

sistemas fluviais de grande importância na América do Sul, uma vez que em toda sua extensão, concentram-se regiões fitogeográficas de grande biodiversidade, sendo limitada ao norte pela floresta amazônica e ao sul pelo cerrado (Latrubesse e Stevaux, 2006).



**Figura 1.** Bacia Araguaia-Tocantins em destaque no mapa hidrográfico do Brasil e curso dos rios Araguaia e seu tributário Rio das Mortes.

O rio Araguaia, que em tupi-guarani significa *rio das araras*, nasce nas Serras do Caiapó e tem uma extensão total de 2.115km (Silva, 2002). Segundo Latrubesse (2006), por toda a extensão do rio Araguaia o desmatamento e o uso descontrolado da terra têm afetado as características abióticas do rio, causando erosão,

sedimentação e destruição de lagoas marginais sazonais. O turismo na região é baseado no ecoturismo e na pesca esportiva, sendo esta última a mais atrativa (Carvalho e Medeiros, 2005).

Segundo Melo et al (2007), o Rio das Mortes é o maior afluente da margem esquerda do Rio Araguaia e um dos principais cursos d'água do estado de Mato Grosso, desembocando no Araguaia 7 km a montante de São Félix do Araguaia. Os tributários - Rio Vermelho, Rio Crixás e Rio das Mortes - aumentam consideravelmente a área de drenagem no baixo Araguaia, onde na estação chuvosa, entre dezembro e maio, a planície do Bananal alaga e o rio Araguaia e seus tributários ficam interligados (Ribeiro et al., 1995), e durante a seca formam-se praias de areia ao longo das margens e na calha central, principalmente durante a estiagem de máxima que se dá em setembro e/ou outubro.

Melo et al. (1995) enfatizam em seu trabalho que há pouco conhecimento sistematizado disponível sobre a ictiofauna desta região, e destacam a importância de novos estudos para esta região no intuito de promover o cruzamento de dados para que se tenha um panorama da diversidade de espécies desta localidade e como elas se relacionam, além de determinar áreas prioritárias de preservação.

## **1.2 Considerações gerais sobre a espécie *Phractocephalus hemiliopterus***

A espécie *Phractocephalus hemiliopterus* (Bloch and Schneider, 1801), conhecida popularmente por pirarara, é um peixe de couro que pode atingir na fase adulta em ambiente natural, mais de 1,10m e superar os 50kg. A espécie habita as bacias Amazônica e Araguaia-Tocantins, e é caracterizada pela cabeça grande,

fortemente ossificada, e uma placa óssea localizada antes da nadadeira dorsal (Goulding, 1980). Sua coloração é considerada a mais bonita dentre os peixes da família Pimelodidae, sendo o dorso castanho esverdeado, os flancos amarelados e o ventre esbranquiçado, com as nadadeiras dorsal e caudal alaranjadas (Figura 2).

Este peixe se alimenta de caranguejos (Goulding, 1980), frutos de espécies arbóreas que habitam a várzea dos rios (Maia e Chalco, 2002) e pequenos peixes.



**Figura 2.** A pirarara, *Phractocephalus hemiliopterus*. Acima, espécime adulto e abaixo forma juvenil para comercialização.

Os peixes da família Pimelodidae, ou “família dos grandes bagres” ou “dos peixes lisos” são conhecidos pela presença em grandes e importantes bacias

hidrográficas nacionais, realizando migrações durante o período reprodutivo (Barthem and Goulding, 1997). Geralmente, possuem grande potencial de consumo, sendo representativos na produção pesqueira de águas interiores em algumas localidades, devido às suas grandes proporções e qualidade da carne (Reid, 1983).

Nas áreas de ocorrência, a espécie tem importância econômica, sendo comercializada como peixe ornamental, devido a sua beleza e porte; sendo um atrativo para a pesca esportiva (Carvalho e Medeiros, 2005), devido ao seu tamanho e força, além de prover alimento e renda às populações ribeirinhas (Maia e Chalco, 2002; Isaac, 1996). Também, em algumas regiões da Amazônia, a gordura e couro extraídos destes peixes é utilizada na medicina popular no tratamento de doenças respiratórias (Pinto e Maduro, 2003).

Este bagre pode ser artificialmente reproduzido e as formas juvenis de 5-10 gramas podem ser facilmente alimentadas com ração (Lovshin e Cyrino, 1998). Entretanto, esta espécie não sobrevive em águas onde a temperatura seja inferior a 14,5°C, o que dificultaria seu cultivo em algumas regiões do país. Infelizmente, os dados genéticos, morfológicos e ecológicos ainda são escassos, para *Phractocephalus hemiliopterus*.

Considerando que toda a informação científica tem um papel estratégico, não somente referente a preservação das espécies, como também à manutenção da sustentabilidade dos ecossistemas, é de fundamental importância que haja um melhor entendimento sobre a dinâmica populacional desta espécie, possibilitando o fornecimento de subsídios para projetos a serem desenvolvidos tanto em pisciculturas, para repovoamento ou comercialização, como para o estabelecimento de diretrizes de manejo adequado e conservação desta espécie.

### **1.3 Marcadores microssatélites e estudos de variabilidade genética**

Os usos de segmentos específicos de DNA satélite nas investigações de variabilidade genética têm crescido consideravelmente, utilizando-se principalmente de marcadores do tipo microssatélites, e isto, graças aos altos níveis de variabilidade observados e à possibilidade de investigar esta variação utilizando a tecnologia de PCR. Microssatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs) são segmentos genômicos identificados por repetições em tandem que variam de 2 a 6 unidades de pares de base, e podem ser caracterizados e investigados através de bibliotecas genômicas, com auxílio de sondas compostas por repetições de oligonucleotídeos (Parker et al., 1998). Segundo Ferreira & Grattapaglia (1995) os marcadores microssatélites possuem o mais elevado conteúdo de polimorfismos; são co-dominantes e mostram-se neutros em relação a efeitos fenotípicos, com efeito epistático mínimo ou nulo, características consideradas ideais para que possa ser utilizado em estudos de mapeamento genético, identificação e discriminação de genótipos e genética de populações em diferentes organismos.

O tamanho do genoma e a abundância dos microssatélites tendem a apresentar correlação positiva nos animais. Contudo, este fenômeno parece não ocorrer em plantas, fato que indica que a distribuição das repetições de microssatélites pode apontar variações interespecíficas nos mecanismos de mutação ou reparo destas repetições específicas (Ellegren, 2004).

A aplicabilidade da tecnologia de microssatélites em peixes têm se mostrado promissora, visto a quantidade de artigos disponíveis na literatura referentes ao isolamento e caracterização destes marcadores nesse grupo. Todavia, a quantidade

de trabalhos produzidos ainda está muito aquém da diversidade e do grande número de espécies que compõem a ictiofauna brasileira (Calcagnotto et al., 2001).

Segundo Chistiakov et al. (2006) os microssatélites são marcadores importantes para serem utilizados na aquicultura, sendo muito úteis para a caracterização de populações, seleção de gerações, mapeamento de características quantitativas economicamente importantes a partir da identificação dos genes responsáveis por estas e para sua aplicação de programas de criação assistidos por marcadores. Além disso, os microssatélites têm aplicação e utilização crescente em estudos de populações de peixes, com ênfase nos programas de conservação e manejo de espécies; nos estudos de migração e diferenciação dos estoques cultivados em relação às populações selvagens; nos estudos sobre os sistemas reprodutivos; nos efeitos da fragmentação dos habitats entre os grupos, apenas para citar algumas das aplicações.

Ainda, é preciso considerar que a variabilidade genética é uma condição necessária, tanto para a ocorrência das mudanças evolutivas nos organismos, como para a manutenção das espécies e populações nos ambientes em constante modificação. As variações gênicas são introduzidas nas populações pela ocorrência de mutações ou como resultado do fluxo gênico, determinado pelos cruzamentos entre indivíduos nativos ou introduzidos (Benites, 2008). Conforme Chambers e Macavoy (2000), a variabilidade herdável de características adaptativas, confere aos organismos uma flexibilidade fenotípica que seria a capacidade de adaptação às novas mudanças ambientais, como a introdução de um predador, uma repentina proliferação de patógenos ou poluentes, entre outros. O surgimento de novos alelos na população se dá, portanto, tanto através de mutações aleatórias como pela

migração de indivíduos provenientes de outras populações. A variabilidade pode ser reduzida pelos efeitos da deriva genética e endocruzamentos, o que resultaria na perda de alelos e declínio da heterozigose, fatores que afetam diretamente a capacidade adaptativa dos organismos (Ferguson et al., 1995).

A identificação da estrutura genética de uma população é possível mediante a utilização de marcadores moleculares (Benites, 2008) e marcadores do tipo microsatélite têm sido empregados para o monitoramento genético em peixes, através de estudos do fluxo gênico e da estrutura genética dos estoques nos sistemas de cruzamento. Estes marcadores podem auxiliar tanto no entendimento de questões evolutivas como na elaboração de programas de manejo para uso em programas de conservação, no manejo eficiente dos estoques cultivados em pisciculturas, assim como nos programas de melhoramento de características como crescimento e ganho de peso (Marques, 2002).

No caso da espécie alvo deste estudo, a obtenção de microsatélites é de extrema importância devido à problemática da falta de dados sobre as características genéticas das matrizes utilizadas nas diversas pisciculturas que a utilizam para reprodução, além da questão da situação das populações selvagens desta espécie. Segundo Sousa et al. (2006), os produtores têm se valido de populações nativas para obtenção de matrizes, e normalmente, são utilizados poucos casais na obtenção dos alevinos (Norris et al., 1999), fato que leva, invariavelmente a longo prazo, estes plantéis à endogamia e posterior declínio na produção. A pirarara ainda se encontra na fase inicial de produção em escala comercial, e sua reprodução e desenvolvimento ainda se mostram pouco rentáveis e de baixo retorno aos incrementos conforme estudo de Pereira et al. (2005) sobre o



desempenho da espécie em tanques-rede, de modo que muito provavelmente, as matrizes de plantéis comercializados ainda estejam sendo retirados da natureza para um melhor resultado reprodutivo.

Portanto, este estudo com o uso de marcadores microssatélites, vem reforçar os esforços no monitoramento e manejo desta espécie na natureza, quanto ao seu uso em pisciculturas e estações de reprodução.

*Objetivos*

---

## 2 OBJETIVOS

Tendo em vista a problemática da exploração intensiva dos estoques pesqueiros e o controle genético das matrizes em condições de cultivo, há a necessidade da proposição de ferramentas que permitam o estabelecimento de programas de manejo e conservação da espécie *Phractocephalus hemioliopterus* (pirarara). O presente projeto teve como objetivo:

- Desenvolver, isolar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites na espécie *Phractocephalus hemioliopterus*;
- Acessar a diversidade genética da espécie, na região do Rio Araguaia e de seu tributário Rio das Mortes, através do uso dos *loci* de microssatélites isolados;
- Verificar a ocorrência de estruturação nas duas populações estudadas;
- Produzir conhecimento que contribua para a conservação da espécie.

# *Material e métodos*

---

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

Foram obtidas amostras de 45 indivíduos da espécie *Phractocephalus hemioliopterus* (pirarara) no rio Araguaia e no rio das Mortes nas proximidades de São Félix do Araguaia, MT. As coletas foram efetuadas durante a prática de pesca esportiva com soltura, no período de abril a junho/2010. No momento da captura foram retirados fragmentos de nadadeira caudal, que foram armazenadas em álcool 100%, para posterior purificação do DNA visando estudos moleculares. Sempre que possível, exemplares representantes de espécies coletadas são fixados inteiros e depositados na coleção na coleção do LaGenPe – Laboratório de Genética de Peixes, alocado na Universidade Estadual Paulista, campus Bauru e na coleção credenciada localizada no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, alocado na Universidade Estadual Paulista, campus Botucatu.

#### **3.2 Métodos**

Inicialmente, nas análises moleculares foram utilizados os métodos de extração e purificação do DNA total dos exemplares, obtido a partir das amostras de tecido sólido (nadadeira).

##### **3.2.1 Extração de DNA**

Para extração de DNA foi utilizado protocolo do kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit – Promega”, com algumas modificações de acordo com o tecido utilizado. A integridade e a quantidade das amostras de DNA foram analisadas através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio e visualizadas sob luz ultravioleta. Para quantificação do DNA foram utilizadas comparações diretas com um marcador padrão de peso molecular e concentração conhecida (Low DNA Mass Ladder - Invitrogen). As amostras de DNA obtidas serão mantidas no Laboratório de Genética de Peixes do Departamento de Ciências Biológicas de Bauru - UNESP, formando um banco de tecidos e de moléculas, para posterior processamento das análises genético-moleculares.

- 1** Numerar duas séries de tubos de microcentrífuga (1,5 ml).
- 2** Retirar uma pequena quantidade de tecido, adicionar nos tubos de microcentrífuga e colocar na estufa por aproximadamente 10 minutos.
- 3** Adicionar 600 µl de “Cell Lysis Solution”.
- 4** Adicionar 5 µl de “Proteinase K” e vortexar.
- 5** Levar ao banho-maria a 60°C por aproximadamente 2 horas; Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos.
- 6** Adicionar 3 µl de “RNase” e colocar no banho-maria a 37°C por 30 minutos. Esperar voltar a temperatura ambiente e continuar os procedimentos.
- 7** Adicionar 200 µl de “Protein Precipitation Solution” e misturar rapidamente no vórtex.
- 8** Levar ao gelo por 5 minutos.
- 9** Centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm.

- 10 Remover o sobrenadante com cuidado e transferi-lo para outro tubo com 600 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- 11 Inverter os tubos gentilmente até que os filamentos de DNA tornem-se visíveis.
- 12 Centrifugar por 4 minutos a 13.000 rpm e remover o sobrenadante invertendo o tubo cuidadosamente.
- 13 Adicionar 600 µl de etanol 70% (com a ponteira voltada para parede do tubo para não soltar o pellet do fundo do tubo). Não é necessário homogeneizar a amostra.
- 14 Centrifugar por 4 minutos a 13000 rpm.
- 15 Deixar secar em temperatura ambiente ou na estufa a 37° C, por 1 hora.
- 16 Adicionar 75 µl de “DNA Rehydration Solution” por 1 hora a 65°C ou 24 horas a 4°C.

### 3.2.2 Isolamento e identificação de microssatélites

Após a extração do DNA e purificação, construiu-se uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites segundo Billot et al. (1999). Para tanto, realizou-se a digestão enzimática do DNA genômico com a enzima *RsaI* (GT / AC); após o processo, foram ligados adaptadores nas extremidades dos fragmentos de restrição e realizou-se uma pré-amplificação via PCR, utilizando Rsa21 (5' CTCTTGCTTACGCGTGGACTA 3') como *primer*.

Na reação de PCR foi utilizado um programa de 95°C por 4 minutos, seguido de 20 ciclos de 30 segundos a 94°C, 1 minuto a 60°C e 1 minuto a 72°C e 8 minutos a 72°C para uma extensão final. Os produtos obtidos após a pré-amplificação foram purificados com o Kit *Quiaquick PCR purification* (QIAGEN). A seleção de

fragmentos contendo microssatélites foi feita através de *beads* e purificação do DNA. O produto final desta seleção foi amplificado para gerar fragmentos de fita dupla em maior quantidade, utilizando o *primer* Rsa21 em um programa a 95°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos de 94°C por 40 segundos, 60°C por 1 minuto e 72°C por 2 minutos, seguida de uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os fragmentos obtidos posteriormente foram clonados com vetor pGEM-T (Promega) para inserção de DNA exógeno e produção de clones recombinantes. Após a transformação em *Escherichia coli* XL1- Blue, estocou-se os clones, que foram mantidos em freezer a -70°C. O DNA plasmidial foi isolado e os clones positivos submetidos a PCR de sequenciamento, utilizando Big Dye com ciclos de 96°C por 2 minutos, seguido de 26 ciclos de 96°C por 45 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos.

Após o seqüenciamento, verificou-se a natureza das sequências flanqueadoras dos microssatélites no programa *Microsat* (Minch et al 1996) e, com a identificação dos microssatélites de interesse entre as sequências de adaptadores, foram desenhados *primers* utilizando-se o programa *Primer3* (Rozen e Skaletsky 2000) via internet.

Os *primers* direto e reverso de cada microssatélite foram desenhados observando-se os seguintes critérios: não conter bases redundantes, estar a uma distância adequada dos microssatélites (de 10 a 50pb), ser constituídos por 18 a 20 nucleotídeos sem sequências repetitivas, conter uma porcentagem de C e G de 50 e 55%, e com temperatura de anelamento ente 50 e 65° C.

O primeiro marcador desenvolvido foi nomeado utilizando-se o nome científico da espécie de origem, abreviando-se o nome do gênero, seguido de número



correspondente a ordem dos clones de origem da biblioteca. Os marcadores foram classificados conforme suas repetições, segundo a classificação de Weber (1990), onde microssatélites com um único tipo de repetição sem seqüências intervenientes ao acaso são chamados de microssatélites perfeitos, aqueles com um único tipo de repetição com seqüências intervenientes são chamados de imperfeitos e aqueles com tipos de repetição diferentes são chamados compostos.

### **3.2.3 Validação dos *primers* de microssatélites**

Inicialmente foram feitos testes para adequação e otimização do PCR dos *primers* para os microssatélites obtidos, através de alterações nas concentrações de DNA, *primers*, dNTP, temperatura de anelamento e tempo de execução de cada passo da reação de PCR, além das quantidades de produto de PCR a serem aplicadas no gel. As condições de PCR foram padronizadas para 20 µL de volume total contendo 10.9 µL H<sub>2</sub>O miliQ, 2.75 µL PCR buffer 10X, 1.25 µL MgCl<sub>2</sub> 50 mM, 1.5 µL dNTP 1.25 mM (Invitrogen), 1 µL de cada primer a 10 µM, 0.1 µL Taq DNA polymerase (Invitrogen) 5U/µL e 1.5 µL de DNA genômico. As condições de amplificação foram determinadas em 5 min a 95°C, seguidos de 35 de ciclos 30s a 95°C, 30s na temperatura de anelamento com pequenas modificações para cada primer (Tabela 1), 5s a 72°C, e tempo de extensão final de 5 min a 72°C. Completada a padronização na concentração dos parâmetros da reação e na temperatura de hibridização dos *primers*, foram efetuadas reações de PCR para a análise populacional de *Phractocephalus hemiliopterus* visando a detecção de polimorfismos.

Os produtos da amplificação foram aplicados em gel de poliacrilamida a 6% com mais 5µl de tampão de carregamento (Invitrogen). As corridas foram realizadas em cuba vertical para eletroforese usando um tampão TBE 1X.

Para visualização da amplificação, o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata e processado da seguinte maneira:

1. Misturar a solução fixadora e de nitrato de prata, deixar o gel mergulhado nessa solução por cerca de 10 minutos.
2. Descartar a solução anterior e lavar levemente o gel com água destilada, para retirar o excesso de solução fixadora.
3. Acrescentar a solução reveladora sobre o gel e observar o mesmo até chegar a coloração desejada.
4. Descartar o revelador e lavar o gel com água destilada.
5. Prosseguir com a fotodocumentação do gel.

### **Solução fixadora**

- 15 ml de álcool etílico absoluto
- 1 ml de ácido acético glacial
- Completar com água destilada para 150 ml

### **Solução de nitrato de Prata**

- 0,3g de nitrato de prata
- Dissolver em 150 ml de água destilada.

### **Solução reveladora**

- 10 ml de NaOH 30%
- 3 ml de formaldeído 100%
- Completar com água destilada para 300 ml

Após o tratamento os géis foram fotografados e analisados utilizando-se o programa *Kodak Digital Science*. O tamanho dos alelos foi determinado através de comparação direta com um marcador de peso molecular e concentração conhecida, no caso o DNA Ladder 10 pb (Invitrogen).

#### **3.2.4 Amostras de espécies relacionadas: *Pseudoplatystoma reticulatum*, *Zungaru jahu*, *Hemisorubim platyrhynchus*, *Leiarius marmoratus*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Brachyplatystoma filamentosum***

Amostras de nadadeira e sangue de espécies próximas de *Phractocephalus hemiliopterus*, ao todo seis (cachara, jaú, jurupoca, jundiá, pintado e piraíba), todas pertencentes à família Pimelodidae, foram utilizadas para testar a habilidade dos marcadores desenvolvidos em amplificar os *loci* ortólogos nestas espécies. Estas amostras pertencem ao banco de tecidos do Laboratório de Genética de Peixes (LaGenPe), alocado na Universidade Estadual Paulista, campus Bauru.

#### **3.2.5 Análises estatísticas**

Os números de freqüências alélicas, número de alelos efetivos e privados foram obtidos através do programa *PopGene v3.3* (Raymond e Rousset, 1995), sendo as mesmas utilizadas para o cálculo de outras estimativas de variabilidade

genética. O mesmo programa foi utilizado para os cálculos de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ).

A estruturação genética das populações foi acessada utilizando-se os índices  $F_{st}$  de Weir e Cockerham (1984) que assume o modelo de mutação de alelos infinitos (IAM) e  $R_{st}$  de Slatkin (1995) que assume o modelo de mutação stepwise (SMM) para todos os locos entre as duas populações utilizando-se o programa GenAlEx 6.1 (Peakall e Smouse, 2007). A significância das estatísticas F e R foi determinada pelos testes de permutação (1000 permutações), com correção seqüencial de Bonferroni, utilizando também intervalos de confiança de 95% de *bootstrap* sobre os loci, já disponível como parâmetro no programa utilizado.

*Resultados*

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento e caracterização dos marcadores microssatélites

Foi construída uma biblioteca genômica enriquecida em microssatélites [(AC) $n$  e (AG) $n$ ] das amostras obtidas de nadadeiras de indivíduos da espécie *Phractocephalus hemiliopterus*, que resultou em 67 colônias recombinantes. Estas colônias foram seqüenciadas, e foi possível encontrar sequências repetitivas do tipo microssatélite em 32 clones (47,8%), sendo a maioria de repetições de dinucleotídeos (62,5%) e o restante composto por tri e tetranucleotídeos em repetições imperfeitas.

Deste montante, foi possível desenhar *primers* para 29 destes *loci* que, após testes em gradiente de temperatura e determinação da temperatura ótima de anelamento, apenas nove se mostraram polimórficos, cerca de 31%, e o restante dos *loci* se mostrou monomórfico ou não se conseguiu amplificação satisfatória.

**Tabela 1.** Descrição dos loci microssatélites e sequências de primers em *P. hemiliopterus*: **Ta**, temperatura de anelamento.

	<b>Primer (5'-3')</b>	<b>Repetição</b>	<b>Tamanho (pb)</b>	<b>Ta (°C)</b>
<b>Phrac 1</b>	GTCCAGTCCTGCTGCCTAAA GACTTTTGGGGGTATATGTCTAT	(CA) <sub>18</sub>	174-192	60
<b>Phrac 2</b>	GGTTCTCTGCAGTATATTCAAGA ACCCTCCGGTTACAAGACC	(CA) <sub>12</sub>	158-188	60
<b>Phrac 4</b>	TCCTCCCTCTTTGTGTTTGTGACA TTTCTGACAGACATGCGCCTACAC	(TC) <sub>12</sub>	178-204	60
<b>Phrac 6</b>	AAAGAATTCCTCGCTGGTAGTAA GTGGGGCAAACATAAGAACAAA	(AC) <sub>16</sub>	182-198	60
<b>Phrac 7</b>	CAAAACAAAACAAAAGGGGAAGG CCAAGCAAGGGAAGTGTGAGC	(GT) <sub>11</sub> A(TG) <sub>10</sub>	218-232	55
<b>Phrac 9</b>	ACCGGCACCTAGCGTATGT GCCGGAAGGGGAAAATG	(TG) <sub>21</sub> (AG) <sub>15</sub>	206-218	60
<b>Phrac 14</b>	TTAGGGGAAGTGAACAAGGGAGTG TTGATGAAGGTGATGGTGGTGAAG	(GA) <sub>21</sub>	258-272	60
<b>Phrac 15</b>	ACACAATTAAGACCAAACCTACTG GTTTGAACACGTGAGCTTGATGAC	(TG) <sub>20</sub>	254-280	60
<b>Phrac 19</b>	ACATTCAGGCCTGCATACACTCAC TCTGCTTGGGTTTTCTCCTACACA	(TG) <sub>16</sub>	218-252	60

O teste de transferibilidade revelou que em espécies taxonomicamente próximas, a amplificação heteróloga desses loci em seis espécies da família Pimelodidae (cachara, jaú, jurupoca, jundiá, pintado e piraíba), houve alto nível de amplificação (81,4%) o que sugere que os locos isolados sejam muito característicos e conservados nesta família de peixes (Tabela 2).

**Tabela 2.** Amplificação cruzada dos loci microssatélites em espécies relacionadas com *P. hemioliopterus*. **P:** polimórfico, **M:** monomórfico, **-:** não amplificou.

Espécies	Primers								
	1	2	4	6	7	9	14	15	19
<b>Cachara</b> <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	P	P	P	M	M	P	-	P	M
<b>Jaú</b> <i>Zungaru jahu</i>	-	-	-	M	M	-	P	-	P
<b>Jurupoca</b> <i>Hemisorubim platyrhynchus</i>	P	P	P	M	P	M	M	P	P
<b>Jundiá</b> <i>Leiarius marmoratus</i>	M	P	M	M	P	P	M	M	M
<b>Pintado</b> <i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	M	M	M	M	P	P	M	P	P
<b>Piraíba</b> <i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	M	-	M	M	-	-	-	P	M

#### 4.2 Variabilidade genética intrapopulacional

Para todas as amostras foi obtido um total de 91 alelos, com média de 5,05 alelos/locus, com variação nas populações analisadas de 4 alelos (Phrac2, Phrac9 e Phrac 19 - pop. Araguaia) a 7 alelos (Phrac 1 - pop. Rio das Mortes). A média de alelos efetivos, aqueles que são passados à geração seguinte, foram similares, de 3,83 para a população do Rio Araguaia e de 3,96 para a população do Rio das Mortes.

Quarenta e um eram alelos privados, ou seja, encontrados apenas em uma localidade, sendo 21 alelos na população do Rio Araguaia e 20 alelos na população do Rio das Mortes (tabela 3).



**Tabela 3.** Alelos privados por população e sua frequência relativa (em parênteses) para cada locus analisado.

	<b>Rio Araguaia</b>	<b>Rio das Mortes</b>
<b>Phrac 1</b>	172 (0,043)	188(0,111)
		190 (0,028)
<b>Phrac 2</b>	158 (0,300)	144(0,036)
		160 (0,143)
<b>Phrac 4</b>	178 (0,368)	182 (0,133)
	188 (0,105)	190 (0,500)
	194 (0,026)	198 (0,300)
	204 (0,421)	202 (0,067)
	214 (0,079)	
<b>Phrac 6</b>	176 (0,175)	160 (0,100)
	182 (0,075)	170 (0,500)
	198 (0,425)	188 (0,067)
	202 (0,100)	
<b>Phrac 7</b>	220 (0,211)	212 (0,222)
	228 (0,184)	238 (0,167)
	230 (0,079)	
<b>Phrac 9</b>	218 (0,357)	220 (0,281)
		232 (0,063)
<b>Phrac 14</b>	258 (0,310)	276 (0,286)
<b>Phrac 15</b>	262 (0,182)	278 (0,158)
	270 (0,045)	288 (0,105)
	272 (0,227)	
<b>Phrac 19</b>	252 (0,029)	204 (0,063)
		210 (0,344)
		212 (0,188)

As heterozigosidades observadas ( $H_o$ ) e esperadas ( $H_e$ ) variaram respectivamente, de 0,421 (Phrac4-pop. Rio Araguaia) a 0,947 (Phrac15-pop.Rio das Mortes) e de 0,604 (Phrac19-pop.Rio Araguaia) a 0,843 (Phrac7-pop. Rio das Mortes).

As duas localidades apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ( $p < 0,01$ ) para alguns locus, após correção de Bonferroni. Dois locus - Phrac 2 e Phrac 6 na população do Rio Araguaia, e cinco locus - Phrac1, Phrac 2, Phrac7, Phrac15 - na população do Rio das Mortes. As análises utilizando o MICRO-CHECKER versão 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) sugerem a presença de alelos nulos nestes locus, que podem ser resultado de amostragem não-aleatória, sistemas de acasalamento ou endogamia. O índice de endogamia  $F_{is}$  sugere a existência de déficit de heterozigotos, manifestados pelos valores positivos deste índice.

Os resultados das análises intrapopulacionais realizadas com as duas populações de pirarara encontram-se relacionados na tabela 4, para fins comparativos.

**Tabela 4.** Localidade com n amostral (A: Rio Araguaia e B: Rio das Mortes) e aspectos da diversidade genética em *P. hemiliopterus*: **Na**, número de alelos; **Nap**, número de alelos privativos; **Ne**, número efetivo de alelos; **Ho**, heterozigosidade observada; **He**, heterozigosidade esperada; **F<sub>is</sub>**, coeficiente de endocruzamento. No equilíbrio de Hardy-Weinberg (**HWE**) – **ns**, não significativo; **\*\*** significativo ( $p < 0,01$ ).

		<b>Locus</b>								
		<b>Phrac 1</b>	<b>Phrac 2</b>	<b>Phrac 4</b>	<b>Phrac 6</b>	<b>Phrac 7</b>	<b>Phrac 9</b>	<b>Phrac 14</b>	<b>Phrac 15</b>	<b>Phrac 19</b>
<b>A</b> <b>n= 26</b>	<b>Na</b>	6	4	5	5	6	4	5	6	4
	<b>Nap</b>	1	1	5	4	3	1	1	4	1
	<b>Ne</b>	4,787	3,089	3,021	3,604	5,388	3,231	3,769	5,176	2,418
	<b>Ho</b>	0,782	0,631	0,421	0,722	0,818	0,571	0,619	0,818	0,705
	<b>He</b>	0,820	0,677	0,687	0,734	0,843	0,705	0,748	0,843	0,604
	<b>F<sub>is</sub></b>	0,024	0,042	0,370	-0,010	0,007	0,169	0,152	0,007	-0,203
	<b>HWE</b>	ns	**	Ns	**	ns	ns	ns	ns	ns
<b>B</b> <b>n=19</b>	<b>Na</b>	7	5	4	4	5	5	5	5	6
	<b>Nap</b>	2	2	4	3	2	2	1	1	3
	<b>Ne</b>	4,985	3,439	2,761	2,663	4,947	3,793	4,215	4,570	4,303
	<b>Ho</b>	0,722	0,933	0,611	0,533	0,888	0,812	0,666	0,947	0,875
	<b>He</b>	0,788	0,724	0,693	0,623	0,820	0,760	0,788	0,809	0,776
	<b>F<sub>is</sub></b>	0,058	-0,333	0,093	0,114	-0,114	-0,103	0,125	-0,202	0,163
	<b>HWE</b>	**	**	Ns	ns	**	ns	ns	**	ns

### 4.3 Desequilíbrio de ligação

Não houve nenhuma significância estatística para associações não aleatórias entre os genótipos dos nove *loci* para as duas localidades, o que sugere que as análises poderiam ser realizadas assumindo-se a independência estatística entre os *loci*.

#### 4.4 Análise interpopulacional

A diferenciação genética entre as duas populações de *Phractocephalus hemioliopterus* foi estimada através do índice  $F_{ST}$  para detecção de variação dentro e entre as populações, considerando-se cada localidade como uma população. Para este cenário, a análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a maior variância se encontrava dentro das populações  $F_{ST} = 92\%$  (Tabela 5) e  $R_{ST} = 97\%$  (Tabela 6), e os valores de variabilidade entre as populações foram de  $F_{ST} = 8\%$  e  $R_{ST} = 3\%$ , valores altamente significativos ( $p < 0,0001$ ), demonstrando que há estruturação genética nessas populações.

**Tabela 5.** Análise de variância molecular (AMOVA), aplicando o índice  $F_{ST}$  para as duas populações analisadas.

Tipo de Variação	Soma dos quadrados	Porcentagem de variação
Entre populações	17,906	8%
Dentro das populações	316,583	92%

Índice de Fixação  $F_{ST} = 0,083$

**Tabela 6.** Análise de variância molecular (AMOVA), aplicando o índice  $R_{ST}$  para as duas populações analisadas.

Tipo de Variação	Soma dos quadrados	Porcentagem de variação
Entre populações	135699	3%
Dentro das populações	5548249	97%

Índice de Fixação  $R_{ST} = 0,026$

O valor do índice de fixação  $F_{ST}$  para todos os loci, foi de 0,083, estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Considerando a faixa de valores para diferenciação genética entre as populações, proposta por Wright (1965), segundo a

qual os valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada, e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação, observou-se através dos resultados que existe moderada diferenciação na estrutura populacional para as duas localidades analisadas. O índice  $R_{ST}$  para todos os loci foi de 0,026 o que não foi estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ).

O valor de fluxo gênico histórico ( $N_m$ ) foi obtido a partir do valor médio de  $F_{st}$  ( $N_m = [(1 / F_{st}) - 1] / 4$ ). O fluxo médio foi de 2,98 indicando que alguns alelos estão distribuídos nas duas populações amostradas.

*Discussão*

---

## 5 DISCUSSÃO

A capacidade de adaptação de uma espécie às constantes mudanças no meio depende também da sua variabilidade genética, que é o conjunto de variações que podem existir entre os membros de uma população. O modo como a variabilidade genética está organizada nos permite inferir sobre a estruturação genética de uma população e a partir daí, propor planos de manejo e conservação, reintroduções, e subsidiar programas de controle de localidades degradadas (Hartl e Clark, 2010).

### **5.1 Análise intrapopulacional e variação dos microssatélites de *Phractocephalus hemiliopterus***

Os locos microssatélites isolados e utilizados nas análises das populações naturais de *Phractocephalus hemiliopterus* mostraram um alto grau de polimorfismo, com média de 5,05 alelos/locus, número similar a média de alelos observada em outras espécies de peixes (DeWoody e Avise, 2000). Quarenta e um alelos privados foram encontrados nas duas populações estudadas, dados demonstrados na tabela 3 onde vemos que em 26 deles a frequência foi maior que 10%. Abreu et al. (2009), estudando a espécie *Pseudoplatystoma reticulatum*, observaram 26 alelos privados com 10 deles com frequência superior a 10%, conforme visto no presente trabalho.

O desvio significativo do equilíbrio de Hardy Weinberg observado em seis loci dentro das duas amostragens estudadas (Tabela 4) pode ter sido causado por

diversos fatores, entre eles, sendo o mais provável, o déficit de heterozigotos demonstrados através do índice de endogamia  $F_{IS}$  no qual os valores variam de +1 a -1, sendo que os valores positivos indicam que há déficit de heterozigotos conforme Wrigth (1978). Segundo García de León et al. (1997), comumente em microssatélites, os principais responsáveis por deficiência de heterozigotos, são: (i) a existência de alelos nulos, (ii) acasalamentos preferenciais, (iii) efeito Wahlund e (iv) amostragem não randômica. Provavelmente para este trabalho, a combinação de existência de alelos nulos seja a causa mais plausível pelo déficit de heterozigotos e conseqüentemente dos desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Segundo Dakin e Avise (2004), desvios significativos podem ser explicados por uma baixa eficiência de amplificação dos primers utilizados na amplificação, com posterior aumento da quantidade de alelos nulos, talvez por alguma mutação simples em uma ou duas regiões de anelamento dos primers no DNA (Callen et al., 1993); ou mesmo a competição nas reações de PCR, onde normalmente, há uma amplificação diferencial de alelos de tamanhos diferentes. Também poderíamos considerar externamente, como agente influenciador dos resultados, um atual efeito de queda de variabilidade, causada por efeitos de deriva genética e endocruzamentos nestas populações, o que resultaria diretamente na perda de alelos e declínio da heterozigose.

Com relação às médias das heterozigosidades observada ( $H_o=0,726$ ) e esperada ( $H_e=0,746$ ) para as populações estudadas, os resultados mostraram que foram próximas ao trabalho de Revaldaves et al. (2005), onde a média de heterozigosidades observada foi de 0,751 e a da esperada foi de 0,814. Para ambos



os trabalhos, os valores de heterozigosidades observadas foram inferiores aos das esperadas, indicando um aumento no número de homozigotos.

A análise do desequilíbrio de ligação foi corrigida por Bonferroni e mostraram-se não significativas para todos os pares de *locus*, similarmente ao trabalho de Revaldaves et al. (2005), onde não foram encontrados *locus* ligados em 43 indivíduos de uma população selvagem de surubim da bacia do Paraná.

O desenvolvimento de marcadores microssatélites é uma etapa necessária para isolar locos microssatélites eficientes que permitam estimar a variabilidade genética entre as populações, o fluxo gênico e a estrutura genética populacional de uma espécie. Entretanto, outra característica importante é sua transferabilidade, que permite a aplicação desses marcadores desenvolvidos em uma espécie para outras espécies geneticamente relacionadas (Ferreira e Grattapaglia, 1995).

Para os testes de transferabilidade neste trabalho, a amplificação de cruzamento de seis espécies da família Pimelodidae foi investigada, onde observamos 81,4% de sucesso de amplificação, sendo 38% dos locos polimórficos nestas espécies, principalmente nos peixes: cachara, jundiá, pintado e jurupoca. Isso poderia ser explicado por uma proximidade genética entre essas espécies, uma suposição que pode ser feita de forma prática, pela facilidade de hibridização entre algumas delas, prática muito freqüente na piscicultura nacional e facilitada pelo usual número cromossômico de  $2n=56$  encontrado dentro da família (Swarça et al., 2000).

Os dados corroboram com os resultados de Revaldaves et al. (2005), onde há um número maior de amplificações entre as espécies dentro de Pimelodidae, sugerindo que os locos isolados sejam muito característicos e conservados nessa

família. Similarmente em Lima et al. (2008), porém em Characidae, locos testados de *Piaractus mesopotamicus* foram transferidos com sucesso para *Colossoma macroponum*, resultado justificado pela proximidade evolutiva entre as duas espécies, que pertencem a grupo taxonômicos próximos.

Em genomas animais, a ocorrência de conservação de sítios genéticos em espécies relacionadas, facilita a transferência de marcadores entre espécies ou de mesmo gênero ou família (Mia et al., 2005). Trabalhos com aves e bovinos sugerem uma taxa de sucesso de 50% na amplificação cruzada e na detecção de polimorfismos entre espécies que divergiram de 10 a 20 milhões de anos (Zane et al., 2002), e a presença de regiões altamente conservadas entre espécies tem sido relatada em alguns *loci* microssatélites em cetáceos, tartarugas e peixes, permitindo a amplificação cruzada.

Assim como em Zucoloto et al. (2006), este estudo forneceu o primeiro conjunto de dados de amplificação heteróloga de microssatélites com grande potencial de transferabilidade de uma espécie ainda não estudada. Os microssatélites relatados podem auxiliar trabalhos futuros com estas espécies, economizando tempo e dinheiro de pesquisa, que seriam empregados em clonagem, construção de biblioteca genômica e seqüenciamento.

## **5.2 Estruturação genética em populações de *Phractocephalus hemiliopterus***

Neste estudo, os nove marcadores microssatélites utilizados revelaram a existência de estruturação genética significativa nas duas populações analisadas, considerando-se os diferentes testes utilizados e os seus resultados. Denomina-se

de estrutura genética populacional a maneira como a variabilidade genética está organizada entre e dentro das populações (Lima, 2010). Segundo Hartl e Clark (2010), alguns fatores interferem na variação genética, moldando a estrutura genética populacional, sendo os principais: a deriva genética, o fluxo gênico, a mutação e seleção. Quanto maior a deriva, a mutação e a seleção, maior a estruturação da variação genética. Quanto mais intenso for o fluxo gênico, menor a probabilidade de estruturação populacional.

Os resultados referentes ao  $F_{ST}$  total foi de 0,083 entre as populações estudadas no presente trabalho. De acordo com Wright (1965), valores entre 0 e 0,05 indicam baixo nível de diferenciação genética, valores entre 0,05 e 0,25 indicam diferenciação genética moderada, e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação, então, podemos afirmar no dados observados que existe moderada diferenciação na estrutura populacional para as duas localidades analisadas, porém a maior parte da diferença entre as populações se deve a variações intrapopulacionais. Este fato pode ser confirmado pela AMOVA, que demonstrou variação dentro das populações de 92% e entre as populações de 8%. Resultados similares para variações dentro e entre populações naturais de peixes são vistos respectivamente, em Benites (2008) de 89,24% e 10,76% para *Pseudoplatystoma corruscans*; Abreu et al. (2009) de 77,10% e 22,90% em *Pseudoplatystoma reticulatum*; Moreira et al. (2007) de 87,25% e 12,75% em *Oreochromis niloticus*, Povh et al. (2008) de 84,2% e 15,8% em *Piaractus mesopotamicus*. Estudos com populações cultivadas, sem acompanhamento genético durante a formação do plantel, demonstram uma queda nos níveis de diferenciação genética, como no estudo de Perales-Flores et al. (2007), em que a análise de plantéis de *Ictalurus*

*punctatus*, um bagre do México, demonstraram valores de diferenciação dentro das populações de 16,56% e entre as populações de 3,83%. Este baixo nível de diferenciação é justificado por uma primeira e única introdução desta variedade de bagre na cidade de Tamaulipas, México, a 25 anos atrás, sem nenhum acompanhamento genético relacionado.

Estes valores dos índices  $F$ , associados ao número de alelos e o tamanho deles (Tabela 1), favorecem uma análise de diferenciação genética intrapopulacional ou de desvio de panmixia ( $F_{IS} > F_{ST}$ ) baseado nos nove locos microsatélites, em que o valor total para as populações foi de  $F_{IS} = 0,273$  e de  $F_{ST} = 0,083$ , e portanto, demonstram que as populações compartilham os mesmos alelos em sua maioria, indicando tratar-se de uma população panmítica ou em outras palavras, apresentam variação intrapopulacional muito maior que entre as populações amostradas. Entretanto, no trabalho de Laikre et al. (2005), os autores alertam que deve se ter cuidado com a terminologia panmítica, interpretada através do índice  $F_{ST}$ , no que concerne a conservação, já que é mais aconselhável considerar a existência de subpopulações e prevenir uma depleção da variação genética.

A análise e constatação da estruturação genética de uma população permitem a definição de unidades de manejo (Moritz, 1994), que representarão a subdivisão de populações de uma espécie em unidades locais. Cada uma dessas unidades locais resultarão do equilíbrio dinâmico entre forças que favorecem os processos de diferenciação em cada área, e também sofrerão influências de processos homogeneizantes – como migração e seleção balanceadora- que serão uniformes em cada área (Hartl e Clark, 2010). Para os dados apresentados neste trabalho, é razoável afirmar que cada população pode ser tratada como uma óssea

unidade de conservação inicial, já que a maior variação genética se encontra dentro das populações com pouca variação entre elas, sendo os processos semelhantes a que estão submetidas, haja vista os resultados apresentados.

O índice  $R_{ST}$  total foi de 0,026 e não se mostrou estatisticamente significativo ( $p > 0,05$ ), diferentemente dos resultados de outros trabalhos em que este índice apresentou números significativos (Benites, 2008; Abreu et al., 2009; Moreira et al., 2007).

Devido aos modelos de mutação em que se baseiam, normalmente há diferenças entre os resultados dos índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ , sendo o primeiro baseado no Modelo de Alelos Infinitos (IAM) e o segundo no modelo Stepwise Mutation Model (SMM) ou “modelo passo a passo”, sendo o mais indicado para comparações utilizando dados de microssatélites (Benites, 2008).

Segundo Slatkin (1995) seria esperado que os valores de  $R_{ST}$  que seguissem estritamente o modelo stepwise como padrão, seriam mais altos que os valores de  $F_{ST}$ . Entretanto, no presente trabalho o valor de  $F_{ST}$  é maior em relação ao  $R_{ST}$ , e isto poderia ser explicado pelo fato de que, provavelmente, nem todos os *loci* microssatélite evoluem estritamente de acordo com o modelo stepwise (SMM) (Balloux e Lugon-Moulin, 2002), que pressupõe a adição ou subtração de uma única unidade de repetição no microssatélite antes ou depois do trecho conhecido. Este tipo de comportamento de locos microssatélites estritamente dentro deste padrão seria muito improvável (Balloux e Lugon-Moulin, 2002), o que explicaria a diferença de números para este índice neste trabalho. Do mesmo modo que em Abreu et al. (2009), os resultados do presente trabalho saem do modelo SMM, o que poderia ser

relacionado ao fato de que dois dos nove locos estudados, eram repetidos de forma imperfeita (Phrac 7 e Phrac 9).

Segundo Leão (2009), alguns trabalhos realizados com alguns animais da bacia amazônica, mostraram um padrão de elevados níveis de variabilidade genética para a calha principal da bacia Amazônica (Batista et al., 2005; Santo et al., 2007; Machado et al., 2009), enquanto para a bacia Araguaia-Tocantins há um histórico de baixa variabilidade genética, o que difere dos dados apresentados no presente trabalho. Para algumas espécies anteriormente estudadas, como o peixe *Arapaima gigas* (Leão, 2009) e a tartaruga, *Podocnemis expansa* (Pearse et al., 2006), a baixa variabilidade genética se deve principalmente à sobre exploração histórica dessas espécies ou a uma colonização recente desta bacia.

Os dados apresentados neste trabalho para a espécie *P. hemiliopterus* demonstram que há uma estruturação moderada para as populações analisadas com alta variabilidade genética dentro das populações, o que sugere que estas populações ainda não sofreram grandes mudanças no seu pool gênico devido à sobre pesca e as mudanças no ambiente. Entretanto, nas localidades amostradas, há relatos na queda da abundância desta espécie e também na diminuição do tamanho e peso médio dos peixes capturados (Ingrid Ritter, comunicação pessoal).

O dado referente ao fluxo gênico obtido no presente estudo foi de  $Nm = 2,98$  indicando que alguns alelos ocorrem no genoma das duas populações. É consenso que o fluxo gênico gera novos polimorfismos nas populações (Ballooux e Lugon-Moulin, 2002), e é um dos fatores que determina a evolução entre duas populações: se o fluxo é alto, as populações evoluem de maneira conjunta, mas se for baixo, as

populações começam a divergir, o que poderia contribuir para o isolamento reprodutivo e o estabelecimento de linhagens independentes (Slatkin, 1995).

Considerando que os peixes da família Pimelodidae são conhecidos por realizar migrações sazonais de reprodução, seria completamente plausível a ocorrência de fluxo gênico mesmo entre populações distantes (Benites, 2008). Entretanto há alguns limites específicos para algumas espécies que podem impedir este fluxo, que vai desde a uma capacidade máxima de deslocamento de cada espécie até a diferença nos períodos reprodutivos, causados pelas condições ambientais locais que podem favorecer ou inibir a reprodução.

Todavia, para *Phractocephalus hemiliopterus*, diferente de outros peixes pimelodídeos amplamente estudados, como o cachara e o pintado, não há estudos publicados sobre detalhes de sua reprodução, prejudicando possíveis inferências a serem feitas sobre o fluxo gênico observado. Concordando com o estudo feito por Costa (2006) em *Prochilodus costatus*, são necessários estudos diretos demográficos como estudos de marcação-recaptura, dispersão, e outros, para servirem de complemento às análises da estrutura populacional de uma espécie. O sucesso de um programa de manejo depende de conhecimento integrado, de variáveis ecológicas, comportamentais e ecológicas da espécie em questão, que são importantes na determinação de como uma dada população sobrevive e se reproduz em diferentes ambientes (Danzmann et al., 1991).

Considerando a importância econômica e ecológica de *Phractocephalus hemiliopterus* nas áreas de ocorrência, e seu potencial para o cultivo extensivo, os dados apresentados representam um avanço no que se refere a produção de ferramentas genéticas. O desenvolvimento de marcadores se torna importante, a

partir do momento que são utilizados em programas de manejo e monitoramento específicos para cada espécie e delineado a partir do status de conservação destas populações, a fim de conservar a diversidade genética vista.



*Conclusões*

---

## 6 CONCLUSÕES

- ✓ O presente trabalho disponibiliza nove *primers* microssatélites polimórficos obtidos em *Phractocephalus hemiliopterus*, com a possibilidade de serem utilizados na amplificação heteróloga em outras seis espécies da família Pimelodidae (cachara, jaú, jurupoca, jundiá, pintado e piraíba), todas importantes tanto do ponto de vista econômico quanto ecológico nas áreas onde ocorrem.
  
- ✓ As duas populações estudadas apresentaram níveis elevados de variabilidade genética.
  
- ✓ Os índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  indicaram baixa diferenciação genética entre as populações, e mostraram que a maior variabilidade é intrapopulacional.
  
- ✓ Os dados apresentados podem fornecer subsídios para o estabelecimento de políticas em programas de manejo e conservação desta espécie na região, prevenindo a depleção dos estoques naturais e estabelecendo ferramentas para o manejo adequado das matrizes para a piscicultura.

# *Bibliografia*

---

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, MM; Pereira, LHG; Vila, VB; Foresti, F; Oliveira, C (2009) Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, n.32, v.4, p. 868-873.
- Agostinho, AA; Thomaz, SM; Gomes, LC (2005) Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, nº1.
- Balloux, F; Lugon-Moulin, N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, n.11, p. 155-165.
- Barthem, R & Goulding, M (1997) **The catfish connection: ecology, migration, and conservation of Amazon predators**. New York: Columbia University Press. 144 pp.
- Benites, C (2008) **Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares tipo microsatélite**. Tese de doutorado – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura da Unesp.
- Billot, N; Lagoda, PJL; Risterucci, AM e Baurena, FC (1999) Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR marked in tropical crops. **Fruits** v. 54 (4) 277-288.
- Braga, TM; Freitas, APG; Duarte, GS; Carepa Sousa, J (2004) Índices de sustentabilidade municipal: o desafio de mensurar. **Nova Economia**, Belo Horizonte, 14(3): 11-33.

Calcagnotto, D; Russello, M e DeSalle, R (2001) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, n.4, v. 1, p. 245-247.

Callen, DF; Thompson, AD; Shen, Y; Phillips, HA; Richards, RI; Mulley, JC; Sutherland, JR (1993) Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. **American Journals of Human Genetics**, n.52, p. 922-927.

Ceccarelli, PS; Senhorini, JA e Volpato, G (2000) **Dicas em piscicultura: perguntas e respostas**. Santana gráfica editora, Botucatu, SP, p.9-10.

Chambers, GK & Macavoy, ES (2000) Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, v.126, p. 455-476.

Chistiakov, DA; Hellemans, B e Volckaert, FAM (2006) Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special references to fish genetics. **Aquaculture**, n.255, p. 1-29.

Costa, LFC (2006) **Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (TELEOSTEI: CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) na bacia do Rio São Francisco, região de Três Marias (MG)**. Tese de mestrado – Universidade Federal de São Carlos, 74pp.

Dakin, EE e Avise, JC (2004) Microsatellite nulls alleles in parentage analysis. **Heredity**, n.93, p. 504-509.

DeWoody, JA e Avise, JC (2000) Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromus fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, n.56, p.

461-473.

Ellegren, H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution.

**Nat.Rev.Genet.** v.5, p.435-445.

Ferguson, A; Taggart, JB; Prodohl, PA; McMeel, O; Thompson, C e Stone, C (1995)

The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference to *Salmo*. **Journal Fish Biology.**, n.47, v. A, p.102-126.

Ferreira, M & Grattapaglia D (1995) **Introdução ao uso de marcadores**

**moleculares em análise genética.** EMBRAPA – CENARGEM, 2ª edição, Brasília (DF), 220p.

Frankham, R; Ballou, JD; Briscoe, DA (2002) **Conservation Genetics.** Cambridge

University Press: Cambridge UK. 617pp.

García de León, FJ; Chikhi, L e Bonhomme, F (1997) Microsatellite polymorphism

and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). **Molecular Ecology**, n.6, p.51-62.

Godinho, AL; Kynard, B e Godinho, HP (2006) Migration and spawning of female

surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) in São Francisco river, Brazil. **Environ Biol Fish Springer Science-** Business Media B.V.

Goulding M (1980) **The fishes and forest: explorations in amazonian natural**

**history.** University of California Press, Berkeley, USA. 280pp.

Hartl, DL e Clark, AG (2010) **Princípios de genética de populações.** Editora

Artmed, 4ª edição, 659pp.

Isaac, VJ; Milstein, A e Ruffino, ML (1996) A pesca artesanal no baixo Amazonas: análise multivariada da captura por espécie. **Acta Amazônica** n.26, v.3, p.185-208.

Latrubesse, EM e Prado, R (2006) Avaliação de mudanças no canal do rio Araguaia através de dados geomorfológicos semi-quantitativos e sua relação com o desmatamento do Cerrado. **Revista Brasileira de Geomorfologia** n.2, v.6, p. 1-28.

Leão, ASA (2009) **Análise de variabilidade genética das populações de pirarucu (*Arapaima gigas*, SCHINZ 1822) dos principais tributários do rio Amazonas através do uso de marcadores microssatélites**. Tese de mestrado – Universidade Federal do Amazonas, 74pp.

Lima, JS; Telles, MPC; Resende, LV; Gouveia, FO e Boni, TA (2008) Amplificação cruzada e padronização de marcadores microssatélites em *Colossoma macroponum* (tambaqui). **Rev. Biol. Neotrop.**, n.5, v.2, p.41-49.

Lima, NL (2010) **Isolamento, caracterização de locos microssatélites e análise da variabilidade genética de duas populações de *Anopheles (N.) darlingi* (DIPTERA: CULICIDAE) do estado do Amazonas**. Tese de mestrado – Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA), 65pp.

Lovshin,LL & Cyrino, JEP (1998) Status of commercial fresh water fish culture in Brazil. **World Aquaculture**, p. 23-40.

Machado, VN (2009) **Análise de variabilidade genética em curimatã (*Prochilodus nigricans*, Agassiz 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários.** Tese de mestrado – Universidade Federal do Amazonas, 85pp.

Marques, DKS (2002) **Aplicação da Biologia Molecular em Programas de Conservação de Recursos Pesqueiros.** Corumbá: Embrapa Pantanal. 22 pp. (Embrapa Pantanal. Documento 36).

Maia AL e Chalco FP (2002) Produção de frutos de espécies da floresta de várzea da Amazônia Central importantes na alimentação de peixes. **Acta Amazônica**, 32 (1): 45-54.

Mia, MY; Taggart, JB; Gilmour, AE; Gheyas, AA; Das, TK; Kohinoora, HM; Rahman, MA; Sattar, MA; Hussain, MA; Mazid, MA; Penman, DJ e Mcandrew, BJ (2005) Detection of hybridization between carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristicnthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. **Aquaculture** n. 247, p. 267-273.

Minch E., Ruiz-Linares A., Goldstein D., Feldman M., Cavalli-Sforza, L.L. (1996). MICROSAT (version 1.5b): a computer program for calculating various statistics on microsatélite allele data.

Moreira, AA; Hilsdorf, AWS; Silva, JV e Souza, VR (2007) Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. Agropec. Bras.**, n.4, v.42, p.521-526.

Moritz, C (1994) Defining evolutionary significant units for conservation. **Tree**, n.9,



p.373-375.

Norris, AT; Bradley, DG e Cunningham, EP (1999) Microsatellite genetic variation between and wild Atlantic salmon (*Salmon salar*) populations. **Aquaculture**, n.180, p. 247-264.

Peakall, R e Smouse, P (2007) GeneAlex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology**, n. 6, 228-295.

Pearse, DE; Arndt, Ad; Valenzuela, N; Miller, BA; Cantarelli, V; Sites, JW (2006) Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river-turtle, *Podocnemis expansa* (chelonian, Podocnemididae). **Molecular Ecology**, n.15, p.985-1006.

Perales-Flores, LE; Sifuentes-Rincón, AM e García de León, FJ (2007) Microsatellite variability analysis in farmed catfish (*Ictalurus punctatus*) from Tamaulipas, Mexico. **Genetics and Molecular Biology**, n.30, v.3, p.570-574.

Pereira, JR; Girardi, L; Aquino-Silva, MR e Fiorini, MP (2005) **Desempenho da pirarara (*Phractocephalus hemeliopterus*) em tanques rede com diferentes densidades de estocagem**. In: Anais VII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IV Encontro Latino Americano de Pós-Graduação – Universidade do Vale do Paraíba.

Pinto AA da C e Maduro CB (2003) Produtos e subprodutos da medicina popular comercializadas na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazônica** n.33, v.2, p. 281-290.

Povh, JA; Ribeiro, RP; Sirol, RN; Streit Júnior, DP; Lopera-Barrero, NM; Vargas, L; Gomes, PC; Lopes (2008) Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. **Pesq. Agropec. Bras.**, v.43, n.2, p.201-206.

Raymond M and Rousset F (1995) Genepop (Version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal Hereditary** n.86, p. 248–249.

Reid, SL (1983) La biología de los bagres rayados *Pseudoplatystoma fasciatum* Y *Pseudoplatystoma tigrinus* em la cuenca del rio Apure, Venezuela. **Unellez de Ciencia y Tecnologia**, Barinas, v 1, p. 13-41.

Revaldaves, E; Pereira, LHG, Foresti, F e Oliveira, C (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p.463-465.

Rozen S, Skaletsky H (2000) **PRIMER 3 on the WWW for general users and for biologist programmers bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology**. Humana Press, Totowa.

Santos, MCF; Ruffino, ML; Farias, IP (2007) High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macroponum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, n.71, supp. A, p. 33-44.

Silva, SA (2002) **Regime hidrológico e comportamento morfo-hidráulico do Rio Araguaia**. Dissertação de Mestrado. Instituto de Geografia, Universidade Estadual de Maringá.

Slatkin, M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, n.139, p. 457-462.

Sousa, AB; Carvalho, DC; Melo, DC; Seerig, AS; Oliveira, DAA; Ribeiro, LP; Teixeira,EA; Crepaldi, DV e Faria, PMC (2006) A utilização de baixo número de matrizes em pisciculturas: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento. **Rev. Bras. Repro. Anim.**, n.3/4 (30), p. 100-104.

Swarça, AC; Caetano, LG e Dias, AL (2000) Cytogenetics of species of the families Pimelodidae and Rhamdiidae (Siluriformes). **Genetics and Molecular Biology**, n.23, v.3, p.589-593.

Tuxtil, J (1998) **Losing strands in the web of life: vertebrates declines and the conservation of biological diversity**. World Watch Paper, n.141. World Watch Institute, Washington, DC, 88pp.

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, n. 4, p. 535–538.

Zane, L; Bargelloni, L; Patarnello, T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, n.11, p. 1-16.

Zucoloto, RB; Villela, PMS; Verdade, LM e Coutinho, LL (2006) Cross-specie microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman spp* and *Paleosuchus palpebrosus*). **Genetics and Molecular Biology**, n. 29, v.1, p. 75-78.

Wright, S (1965) **Evolution and the genetics of populations: the theory of gene frequencies**. University of Chicago Press, Chicago, USA, v.2.

Wright, S (1978) **Variability within and among natural populations**. University of Chicago Press, Chicago, USA, v.4.

*Анекс*

---

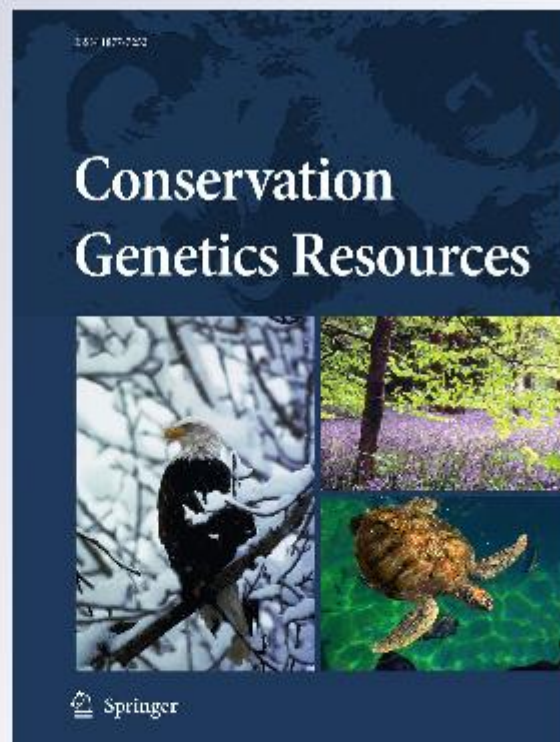
*Development and characterization of  
microsatellite loci in Phractocephalus  
hemiliopterus (Siluriformes: Pimelodidae)  
and their cross-species amplification in six  
related species*

**C. A. Souza, D. T. Hashimoto,  
L. H. G. Pereira, C. Oliveira, F. Foresti &  
F. Porto-Foresti**

**Conservation Genetics Resources**

ISSN 1877-7252

Conservation Genet Resour  
DOI 10.1007/s12686-011-9584-3



 Springer