

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DE AFLP PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM *Prochilodus argenteus*
(PISCES, PROCHILODONTIDAE)**

THAÍS CABRERA GALVÃO ROJAS

SÃO CARLOS - SP

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**UTILIZAÇÃO DE AFLP PARA ESTUDOS GENÉTICOS EM *Prochilodus argenteus*
(PISCES, PROCHILODONTIDAE)**

Thaís Cabrera Galvão Rojas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução.

Orientadora: Dra. Terumi Hatanaka

SÃO CARLOS - SP

2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

R741ua

Rojas, Thaís Cabrera Galvão.
Utilização de AFLP para estudos genéticos em
Prochilodus argenteus (Pisces, Prochilodontidae) / Thaís
Cabrera Galvão Rojas. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
68 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2008.

1. *Prochilodus argenteus*. 2. AFLP (Amplified Fragment
Length Polymorphism). 3. Variabilidade genética. 4. Mapa
de ligação. I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

**Dedico esta dissertação a todos os meus pais,
ao meu marido, irmãos e amigos.**

AGRADEÇO

Ao programa de Pós-graduação em Genética e Evolução, pela formação;

Ao CNPq, pela bolsa concedida;

À Dra. Terumi Hatanaka;

Ao Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.;

Ao Dr. Orlando Moreira Filho;

Ao Dr. Flávio Henrique da Silva;

Ao Dr. Cosme Damião Cruz;

Ao Me. Maurício Carrillo Ávila;

À Ma. Michelle Mantovani Gonçalves;

Ao Fernando Fonseca Pereira de Paula;

Ao Dr. Yoshimi Sato e à CEMIG-CODEVASF;

À todos os membros do Departamento de Genética e Evolução;

À todos os amigos do laboratório;

Às minhas grandes amigas: Fernanda, Carolzona, Carolzinha e Géssia;

À minha família;

Ao meu amado;

Pelas diferentes contribuições de cada uma dessas pessoas, na realização desse trabalho.

RESUMO

Estudos genéticos foram realizados em uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco, *Prochilodus argenteus*, a qual possui grande importância na pesca artesanal e de subsistência da região. Os estudos do mapa de ligação e de variabilidade genética foram realizados com o uso do marcador dominante AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) e com 189 indivíduos de um cruzamento F1, utilizado também para o repovoamento do rio São Francisco, à montante da barragem de Três Marias (MG). Todas as análises foram realizadas com 15 combinações de *primers*. Para a construção dos mapas de ligação foi utilizada a abordagem pseudocruzamento teste. Os *primers* utilizados geraram 46 marcas heterozigóticas para os genitores, com segregação mendeliana de 1:1. O mapa referente ao genitor feminino apresentou 3 grupos de ligação e o comprimento do genoma analisado foi de 128,45 cM, e o mapa do genitor masculino também consistiu em 3 grupos de ligação com comprimento total de 192,67 cM. Marcadores comuns aos dois genitores, com segregação mendeliana de 3:1, foram utilizados como pontes na integração dos mapas. O mapa integrado foi formado por 9 grupos de ligação, o que correspondeu a 442,08 cM de genoma analisado. Adicionalmente, a variabilidade genética foi estudada por meio da média da heterozigosidade esperada (*He*), a qual foi de 0,32082 e pela análise do coeficiente de similaridade de Jaccard, que foi igual a $0,72564 \pm 0,00451$. Estes valores, ainda que preliminares, mostraram que essa amostragem cultivada possui o coeficiente de similaridade maior quando comparado com os de populações selvagens. Desta forma, sugere-se no presente trabalho que estudos genéticos devam ser realizados juntamente com a prática de repovoamento de rios, visando conservar o patrimônio genético desta espécie na bacia do São Francisco. Os resultados mostraram também que os marcadores AFLP foram adequados e eficientes para a identificação de marcas ligadas em *Prochilodus argenteus* e no estudo da variabilidade genética de amostras cultivadas.

Palavras chaves: *Prochilodus argenteus*, AFLP, mapa de ligação, variabilidade genética.

ABSTRACT

Genetic studies have been performed for an endemic species from São Francisco River basin, *Prochilodus argenteus*, which has a great importance in the artisanal and subsistence fishing in the region. The linkage mapping and the genetic variability studies were made with AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) dominant markers and with 189 specimens from a F1 cross, that was also used for restocking the upstream area from Três Marias hydroelectric dam. All the analyses were carried out with 15 primer pairs combinations and the linkage map was made using the pseudo-testcross mapping strategy. Forty six heterozygous marks were found for the genitors, with mendelian segregation of 1:1. The female genitor map had 3 linkage groups and the length of the analysed genome was 128,45 cM, the male genitor map had the same number of linkage groups and the total length of 192,67 cM. Common markers for both genitors, with mendelian segregation ratio of 3:1, served as bridge between the maps, for the construction of an integrated map. This map had 9 linkage groups, and the total map length was 442,08 cM. Additionally, the genetic variability was assessed and an expected heterozygosity mean was of 0,32082, with a Jaccard's similarity coefficient of $0,72564 \pm 0,00451$. These preliminary values show that the cultured sample has a higher similarity coefficient than that obtained for the wild populations. Hence, the present results suggest that genetic studies and management restocking practices should be simultaneously performed for the maintenance of the genetic patrimony of this species at the São Francisco River basin. The results also showed that AFLP marks were suitable and effective to identify linkage marks in *Prochilodus argenteus* and for genetic variability studies in cultivar samples.

Key words: *Prochilodus argenteus*, AFLP, linkage map, genetic variability.

LISTA DE ABREVIATURAS

A: adenina;
AFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados;
C: citosina;
°C: graus Celsius;
cm: centímetro,
cm³: centímetro cúbico;
cM: centimorgan;
CODEVASF: Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba;
dNTPs: desoxirribonucleotídeos;
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético;
fAFLP: Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados Fluorescentes;
G: guanina;
h: horas;
HCl: ácido clorídrico;
He: heterozigosidade esperada;
Kg: quilograma;
Km: quilômetro;
Km²: quilômetro quadrado;
LOD: logaritmo das probabilidades;
m: metro;
M: molar;
m²: metro quadrado;
m³: metro cúbico;
mg: miligrama;
ml: mililitro;
MG: Minas Gerais;
MgCl₂: cloreto de magnésio;
mm: milímetro;
mM: milimolar;
µg: micrograma;
µl: microlitro;
NaCl: cloreto de sódio;
ng: nanograma;
PCR: reação em cadeia da polimerase;
pH: potencial hidrogeniônico;
QTL: locos que controlam caracteres quantitativos;
RAPD: polimorfismo de DNA amplificado ao acaso;
RFLP: polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição;
rpm: rotações por minuto;
SDS: sulfato duodecil de sódio;
SSR: seqüências simples repetidas
T: timina;
t: tonelada;
TBE: tampão a base de Tris, ácido bórico e EDTA;
TE: Tris-HCl + EDTA;
Tris-HCl: Tris - ácido clorídrico;
V: volt.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Curimatás (<i>Prochilodus</i>).....	10
1.2. O reservatório de Três Marias.....	11
1.3. O emprego de AFLP em estudos genéticos.....	12
1.4. Mapas genéticos em peixes.....	14
1.5. O estudo da variabilidade genética em estoques cultivados.....	16
2. OBJETIVOS	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1. Espécie analisada, área de estudo e coleta.....	19
3.2. Hipofização e cruzamento.....	20
3.3. Extração e quantificação do DNA genômico.....	21
3.4. Obtenção dos locos de fAFLP.....	21
3.4.1. Digestão do DNA genômico.....	21
3.4.2. Ligação dos adaptadores.....	22
3.4.3. Amplificação pré-seletiva.....	23
3.4.4. Amplificação seletiva.....	23
3.5. Genotipagem.....	24
3.6. A escolha dos <i>primers</i>	25
3.7. Análise dos locos e construção do mapa.....	27
3.8. Análise da variabilidade genética.....	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
CAPÍTULO I-Utilização de marcadores AFLP na construção de um mapa genético de ligação para a espécie <i>Prochilodus argenteus</i>	29
RESUMO	30

INTRODUÇÃO.....	31
MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
RESULTADOS.....	34
DISCUSSÃO.....	35
AGRADECIMENTOS.....	38
REFERÊNCIAS.....	38
TABELA.....	39
FIGURAS.....	40
CAPÍTULO II-Análise da diversidade genética de um estoque cultivado de <i>Prochilodus argenteus</i> com marcadores AFLP: subsídios ao repovoamento de rios.....	43
RESUMO.....	44
INTRODUÇÃO.....	45
MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
RESULTADOS.....	47
DISCUSSÃO.....	48
AGRADECIMENTOS.....	51
REFERÊNCIAS.....	51
TABELAS.....	52
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	56
6. CONCLUSÕES.....	57
7. REFERÊNCIAS.....	58

1.INTRODUÇÃO

1.1. Curimatás (*Prochilodus*)

Os peixes da família Prochilodontidae possuem 3 gêneros com 21 espécies. São endêmicos da América do Sul, sendo a maioria das espécies amazônicas (CASTRO; VARI, 2003). Os Prochilodontidae, conhecidos como curimatás ou curimatás, têm o corpo alargado, compacto e coberto por escamas (COCKERELL, 1915), a alimentação é iliófaga (MAGO-LECCIA, 1972), ou seja, ingerem a vasa que se acumula no fundo dos rios, possuindo assim, adaptações anatômicas como lábios espessos e protracteis, com numerosos denticulos dispostos em duas fileiras na frente das maxilas (BRITSKI et al.,1988; CASTRO; VARI, 2003).

Esta família é constituída por espécies de médio a grande porte, com comprimento de 40 cm em média. Segundo Mago-Leccia (1972), a altura do corpo varia com a alimentação, idade e maturação sexual. Na época da desova realizam migrações rios acima (BRITSKI, 1972) e sua reprodução depende da dinâmica fluvial, sendo que a desova ocorre em plena correnteza. Os Prochilodontidae não apresentam territorialidade e possuem um comportamento pacífico (PAULS, 1985).

Três espécies do gênero *Prochilodus* são encontradas na Bacia do São Francisco: *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides* (BRITSKI et al.,1988). *P. argenteus*, chamado popularmente de curimatã-pacu na região de Três Marias (MG), pode alcançar até 15 Kg, sendo este o maior porte de toda família (SATO et al., 1996). A reprodução ocorre na estação chuvosa que vai de novembro a fevereiro (GODINHO; GODINHO, 2003), coincidindo com as estações com maior temperatura e longos fotoperíodos. Essa espécie é endêmica da bacia do rio São Francisco, tendo sido introduzida em vários rios da região nordeste do Brasil (FISHBASE, 2008).

P. argenteus representa um importante recurso pesqueiro do rio São Francisco, alcançando até 50% da produção do pescado (GODINHO; GODINHO, 2003). Em 2004, o Estado de Minas Gerais produziu 1.277,5 toneladas referentes à pesca extrativa do *Prochilodus*. Em todo o país, a pesca do gênero representou aproximadamente 12% da produção total de pesca extrativa continental (INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, 2004).

Apesar da grande importância do *P. Argenteus*, muitos aspectos da sua história de vida,

como: migração, domínio vital e locais de desova, não são inteiramente conhecidos. Essas informações são necessárias para avaliar o impacto ambiental dos reservatórios existentes ao longo do rio São Francisco (GODINHO; KYNARD, 2006).

1.2. O reservatório de Três Marias

A barragem de Três Marias, localizada no alto-médio rio São Francisco (S 18° 12' 51" W 45° 15' 51"), foi inaugurada em 1960 e teve como principais objetivos: regularização do rio São Francisco, controle da cheia e produção de energia (BRITSKI et al., 1984; SAMPAIO; LÓPEZ, 2003;).

A área de inundação da represa na cheia é de 1.050 Km², com volume de 21 bilhões de m³ e profundidade máxima de 60 m, apresentando um aspecto dendrítico. A temperatura média anual da região é de 22,5 °C e a precipitação total anual está entre 1.200 e 1.300 mm, sendo que as chuvas ocorrem principalmente nos meses de novembro a fevereiro (BRITSKI et al., 1984).

A pesca no rio São Francisco vem sofrendo um declínio acentuado (GODINHO; GODINHO, 2003). Na década de 70, a média era de 25 de kg de peixe por dia para um pescador; no entanto, nos anos 80 esse valor passou para 11 kg (SATO; GODINHO, 2004). Diversas espécies de peixes comerciais e desportivas foram incluídas na lista da fauna ameaçada de extinção do Estado de Minas Gerais (LINS et al., 1997), sendo que na região à montante da barragem de Três Marias já existem espécies extintas (SATO et al., 1987).

A fauna sanfranciscana é composta por 152 espécies diferentes, as principais espécies comerciais são migratórias e dentre elas está o *Prochilodus argenteus* (SATO; GODINHO, 2004). A reprodução das espécies migratórias é afetada porque o barramento pode alterar o regime hidrológico natural e as características da água, afetando a região à jusante (PETTS, 1989). O rio Abaeté, um importante afluente, se localiza a aproximadamente 32 Km à jusante da barragem e parece ser o local de desova de muitos peixes migradores (SATO; GODINHO, 2004; GODINHO; KYNARD, 2006).

Segundo Godinho; Kynard, (2006), os curimatãs-pacu pertencentes a população localizada imediatamente a jusante da barragem de Três Marias não realizam a desova e a maioria dos indivíduos também não migram. Um sistema de transposição de peixes

possibilitaria a continuidade dessa migração. No entanto, importantes perguntas sobre aspectos biológicos e mesmo sociais ligados aos *P. argenteus* necessitam ser conhecidos antes da construção de qualquer transposição na represa de Três Marias.

O repovoamento, também denominado peixamento, tem sido muito utilizado como estratégia para a recuperação da atividade pesqueira. No entanto, o seu manejo pode envolver riscos, como a diminuição do pool gênico e incidência de doenças (HICKLEY, 1994). A CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba) vem fazendo o repovoamento na região à montante da barragem de Três Marias desde a década de 1980. Porém, a avaliação dessa medida ainda não está disponível (GODINHO; GODINHO, 2003).

1.3. O emprego de AFLP em estudos genéticos

Marcador molecular é qualquer fenótipo genômico que pode corresponder a um gene, que pode ser expresso ou não, ou a um determinado segmento de DNA. Ele pode ser considerado um marcador genético se a sua segregação estiver de acordo com as leis de herança mendeliana (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995) e a sua seqüência de nucleotídeos pode ou não ser conhecida.

Atualmente, estão disponíveis inúmeros tipos de marcadores moleculares, os quais podem ser divididos em dois grandes grupos: os de hibridização, como por exemplo, RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição - BOTSTEIN et al., 1980) e os de amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), como o AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados - VOS et al., 1995), RAPD (Polimorfismo de DNAs Amplificados ao Acaso - WELSH; MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS et al., 1990) e Microsatélite (LITT; LUTTY, 1989).

Os marcadores AFLP têm apresentado um grande destaque devido à sua especificidade, alto poder de resolução e repetibilidade. Outras características seriam a possibilidade de analisar vários exemplares ao mesmo tempo e o fato de gerar um grande número de marcas. Quando os *primers* utilizados na técnica são marcados com algum tipo de fluorescência, a técnica passa a se chamar fAFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados fluorescentes).

A metodologia de AFLP consiste em três etapas principais: digestão do DNA genômico com enzimas de restrição, ligação de adaptadores específicos aos fragmentos digeridos e amplificação via PCR utilizando *primers* específicos que reconhecem as seqüências nos adaptadores. A análise dos fragmentos amplificados é feita em gel de alta resolução (VOS et al., 1995).

Os AFLP são marcadores dominantes, eles evidenciam a presença ou ausência de bandas, as quais correspondem aos sítios referentes às enzimas de restrição utilizadas, sem identificar se o loco amplificado está em homozigose ou heterozigose. O polimorfismo detectado pela técnica corresponde a mudanças dos nucleotídeos localizados nos sítios das enzimas e nas regiões flanqueadoras, correspondentes a região na qual o adaptador irá se ligar (BENSCH; ÅKESSON, 2005).

A técnica tem sido muito utilizada em estudos com plantas, fungos e bactérias (OLIVARES - FUSTER et al., 2007; PHILLIPS-MORA et al., 2007; AVERSANO et al., 2007; GONÇALVES et al., 2007; SCHRENZEL et al., 2008). No entanto, existem poucos estudos referentes a animais. De acordo com o *site* de busca Web of science (2008), existem 120 artigos publicados referentes a estudos com marcadores AFLP em espécies de peixe. Esta diferença observada entre os táxons sugere que há outras metodologias que sejam mais eficientes ou que o conhecimento não tenha se expandido de uma área para a outra (BENSCH; ÅKESSON, 2005). Apesar disso, para estudos de diversidade e na construção de mapas genéticos, os AFLPs têm se mostrado bastante eficientes, devido ao elevado número de locos que podem ser analisados por vez e a ausência de conhecimento prévio sobre o genoma do organismo em questão (SØNSTEBØ et al., 2007).

Esses marcadores podem ser aplicados em diversos estudos genéticos, tais como: análises de parentesco (KRAUSS, 1999; QUESTIAU et al., 1999; MADDEN et al., 2004), estudos de diversidade genética (SACHIDANANDAM et al., 2001; LYNCH, 2002; SABETI et al., 2002; FOULLEY et al., 2006; GONÇALVES et al., 2007; DAGHER-KHARRAT et al., 2007), estrutura populacional (NYBOM, 2004; MCMILLAN et al., 2006; SØNSTEBØ et al., 2007), na identificação de híbridos (HAIG et al., 2004), em estudos filogenéticos (ALBERTSON et al., 1999) e mapeamento genético, incluindo QTLs (quantitative trait loci) e grupos de ligações (KNAPIK et al., 1996; KEARSEY; FARQUHAR, 1998; KOCHER et al., 1998; COIMBRA et al., 2003; WANG et al., 2007).

1.4. Mapas genéticos em peixes

A construção de mapas genéticos em espécies de interesse econômico pode auxiliar na cobertura e análise completa do genoma, nos estudos de características genéticas complexas nos seus componentes Mendelianos, na localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica, além de canalizar toda informação em programas de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1994).

Um mapa de ligação deve ser planejado com cuidado, uma vez que ele exige a escolha de genitores adequados para se obter uma população segregante correta. A maioria dos mapas genéticos é obtida de populações F2 de retrocruzamentos, oriundas de populações F1 com genitores de linhagens puras, pois nessas populações a fase de ligação dos alelos é conhecida (MORAES, 2005). Quando a obtenção dessas populações não é praticável, pode-se utilizar uma população F1 e a abordagem pseudocruzamento teste ou *pseudo-testecross*, na qual os locos que serão utilizados na construção do mapa só serão escolhidos após a genotipagem, sendo que apenas aqueles que segregam na proporção 1:1, da mesma maneira que em um cruzamento teste, serão incluídos no mapa (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994). Dessa maneira, serão obtidos dois conjuntos de grupos de ligação, um para cada genitor.

Existe a possibilidade de se obter um único mapa através da integração dos dois mapas obtidos por meio de marcadores pontes, ou seja, marcadores presentes em ambos os genitores (RITTER et al., 1990). Marcadores que segregam 3:1 podem ser utilizados como marcadores pontes segundo Maliepaard et al. (1997).

No mapa genético, as distâncias são determinadas estatisticamente baseadas em uma análise de segregação dos marcadores polimórficos (LUNDIN et al., 1999). A integração das informações do mapa genético com a localização física dos marcadores selecionados permite a confirmação da ordem linear dos grupos de ligação ao longo dos cromossomos (DANZMANN; GHARBI, 2001).

Particularmente em peixes, a construção de mapas genéticos ainda é bastante escassa. Em *Danio rerio*, uma espécie conhecida popularmente como paulistinha, foi construído o primeiro mapa genético utilizando-se um painel de 94 embriões haplóides com um total de 401 marcadores de RAPD (POSTLETHWAIT et al., 1994). Neste trabalho, foram identificados 29 grupos de ligação. Em adição aos marcadores RAPD, foram também mapeados 13 SSRs (Seqüências Simples Repetidas ou microssatélites) usando *primers* já publicados na literatura. Segundo os autores, a construção deste mapa genético pode auxiliar

na identificação de genes candidatos para mutações, na caracterização de rearranjos cromossômicos e no estudo da evolução do genoma.

Posteriormente, um mapa genético de resolução moderada foi obtido para *D. rerio* com 705 marcadores microssatélites, com uma resolução média de 3,3 cM. O mapa foi considerado completo, pois foi encontrado um grupo de ligação para cada cromossomo da espécie, o que foi confirmado pelo mapeamento do centrômero (KNAPIK et al., 1998).

Um mapa de ligação foi construído para a tilápia (*Oreochromis niloticus*) com 62 locos de microssatélite e 112 marcas de AFLP provenientes de 41 embriões haplóides de uma única fêmea. Noventa e três por cento das marcas foram incluídas em algum grupo de ligação, o que resultou em 30 grupos de ligação, alcançando assim os 22 cromossomos da espécie (KOCHER et al., 1998).

Resultados similares foram também obtidos em outro estudo com tilápias, porém, resultante de cruzamentos entre 5 grupos do gênero. Neste trabalho, observou-se a formação de 24 grupos de ligação com comprimento total de 1623 cM para a F1, por meio também de marcadores microssatélite e AFLP (AGRESTI et al., 2000).

Em carpa comum (*Cyprinus carpio L.*), utilizando-se marcadores microssatélite, RAPD e genes marcados, foi obtido um mapa com 50 grupos de ligação, sendo que no grupo 5 foi identificada uma marca relacionada com a tolerância ao frio, um início bastante promissor para trabalhos com QTLs (SUN; LIANG, 2004).

Um mapa utilizando marcadores AFLP foi construído para embriões haplóides provenientes de fêmeas diplóides de *Scophthalmus maximus*, sendo encontrados 12 grupos de ligação com as 7 combinações de *primers* utilizadas. Estes resultados, ainda que preliminares, representam o início do estudo de mapeamento em uma das espécies de peixe mais cultivada com propósito comercial por todo mundo (FORTES et al., 2008).

A abordagem pseudocruzamento teste tem sido bastante aplicada em estudo com plantas (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994), e de maneira crescente, vem sendo utilizada em peixes. Em *Paralichthys olivaceus*, o linguado japonês, foram obtidos dois mapas de ligação, um para cada genitor, com 352 marcas de AFLP e 111 locos de microssatélite. O mapa de ligação do genitor masculino foi formado com 25 grupos de ligação, enquanto o do genitor feminino apresentou 27 grupos de ligação. O comprimento total do mapa foi estimado em 1000-1200 cM e 96% das marcas estavam ligadas (COIMBRA et al., 2003).

Um outro estudo, utilizando a mesma estratégia acima, foi reportado para duas espécies de carpa *Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis*, em que a F1 foi obtida do cruzamento utilizando um genitor de cada espécie. O mapa para *H. molitrix* com 271 marcas de microssatélite e AFLP, resultou em 27 grupos de ligação. Por outro lado, para o mapa de *A. nobilis*, as 153 marcas analisadas foram caracterizadas em 30 grupos de ligação. No final, 18 locos de microssatélites apresentaram-se comuns aos dois mapas (LIAO et al., 2007).

Em *Salmo salar*, foi também analisada a F1 resultante do cruzamento de genitores de famílias distintas e o mapa de ligação do genitor feminino foi caracterizado por 33 grupos de ligação, enquanto no mapa do genitor masculino foram observados 31 grupos. Marcadores AFLP presentes em ambos os genitores com segregação 3:1, e marcadores microssatélites foram eficazmente utilizados como marcadores pontes na integração dos dois mapas (MOEN et al., 2004).

Em peixes, taxas de recombinação diferenciadas entre os sexos têm sido freqüentemente reportadas e parece ser um fenômeno bastante comum entre os vertebrados. Em *Salmo salar*, por exemplo, a taxa de recombinação foi de 8,26 : 1, para os genitores feminino e masculino, respectivamente; sendo este o maior valor relatado para vertebrados (MOEN et al., 2004). Ainda em *S. salar*, uma taxa de recombinação sexo-específica de 3,92 : 1 (feminino : masculino) também foi observada (GILBEY et al., 2004). Resultados similares foram descritos para *Oncorhynchus mykiss* (truta arco-íris), onde a taxa de recombinação na meiose masculina também se mostrou diferenciada em relação à das fêmeas (3,25 : 1 – feminino : masculino) (SINGER et al., 2002).

No Brasil, os estudos relacionados ao mapeamento genético de espécies de peixes de interesse econômico são inexistentes. Desta forma, uma melhor caracterização do genoma de espécies potencialmente úteis aos programas de piscicultura pode auxiliar na localização de regiões que controlam características de importância econômica, tais como taxas de crescimento, fecundidade e resistência às doenças.

1.5. O estudo da variabilidade genética em estoques cultivados

A diversidade genética é a variedade de genótipos e alelos presentes em um determinado grupo: espécies, grupos de espécies ou população. Utilizando a seqüência do

DNA, a diversidade pode ser medida por meio de polimorfismo, diversidade alélica e heterozigotidade média (FRANKHAM et al., 2004). As populações necessitam dessa variabilidade para se adaptarem a mudanças ambientais.

Em sistemas de repovoamento, muitas vezes esse pool gênico acaba sendo diminuído porque apenas poucos indivíduos, comparando-se com a população natural, são utilizados nos cruzamentos. O que resulta no aumento da homozigotidade e na depressão por endogamia de diversos fenótipos nas gerações seguintes (BEAUMONT; HOARE, 2003). Em um programa de conservação, a variação genética presente nas populações naturais deve ser conhecida para ser comparada com a variação da população de cativeiro e, através dos resultados, fazer uma análise do programa em questão (WASKO et al., 2004).

Para se começar um programa de repovoamento, com caráter de conservação, é fundamental dispensar atenção especial aos fundadores da nova população, é necessário que o grupo que dará início ao programa esteja em equilíbrio, ou seja, cada indivíduo deve ter a mesma probabilidade de carregar um determinado gene que um exemplar da população ancestral. Assim, os fundadores serão realmente representantes da população selvagem e o tamanho efetivo da população será mantido (DOYLE et al., 2001).

Diversos trabalhos já foram publicados analisando as diferenças na variabilidade entre populações selvagens e domésticas de peixes. Alarcón et al. (2004) comparou a diversidade genética entre populações selvagens e cultivadas do peixe marinho *Sparus aurata* e verificou uma diminuição na variabilidade das populações cultivadas, além de serem altamente divergentes.

Em *Ictalurus punctatus*, foi analisada a diversidade genética entre estoques cultivados, tanto destinados à pesquisa como provenientes de fazendas de cultivo, verificando-se um alto coeficiente de similaridade entre os indivíduos (MICKETT et al., 2003). Posteriormente, um estudo comparativo entre populações domésticas e selvagens mostrou que as populações selvagens exibiram um maior nível de polimorfismo e heterozigotidade em relação às populações domésticas, e que estas populações cultivadas eram todas estreitamente relacionadas umas com as outras (SIMMONS et al., 2006).

Estes resultados foram também observados em salmão do Atlântico (*Salmo salar*), em que as amostras de populações cultivadas apresentaram uma variabilidade genética reduzida quando comparadas com populações selvagens (SKAALA et al.; 2004).

Em *Prochilodus argenteus*, análises da diversidade genética foram feitas somente em estoques naturais, abrangendo diferentes locais de coleta na região à jusante da barragem de Três Marias, no rio São Francisco. Com o uso de marcadores RAPD foi verificado uma relação de proximidade entre o local de coleta analisado e a barragem, ou seja, quanto mais próximo, maior foi o coeficiente de similaridade de Jaccard encontrado. Além disso, diferenças significativas nas frequências das bandas foram observadas entre as diferentes localidades, sugerindo a existência de estruturação populacional na região (HATANAKA; GALETTI, 2003). Posteriormente, a ocorrência de diferentes unidades reprodutivas na região de Três Marias foi corroborada por meio de marcadores microssatélites (HATANAKA et al., 2006).

Um estudo de biotelemetria conduzido de 2001 a 2003 com 21 fêmeas e 10 machos de *P. argenteus*, nos primeiros 409 Km a jusante da barragem de Três Marias, determinou que existem 3 diferentes populações ao longo do rio São Francisco, mas que elas apresentam áreas de sobreposição. E que a população localizada imediatamente abaixo da barragem parece fazer parte da população a montante da barragem, no entanto, mais estudos são necessários para verificar e entender melhor essa população (GODINHO; KYNARD, 2006).

No entanto, não existem dados relativos à diversidade genética dos estoques cultivados para as atividades de repovoamento do rio São Francisco e nem dos estoques naturais procedentes da região à montante da barragem, local onde os alevinos têm sido liberados. Desta forma, um estudo mais detalhado, envolvendo um monitoramento genético, deve ser realizado, a fim de se evitar o declínio da variabilidade genética desta espécie de peixe já bastante explorada na bacia do São Francisco.

2. OBJETIVOS

Tendo em vista que *Prochilodus argenteus* apresenta uma posição de destaque na pesca artesanal e de subsistência para a bacia do São Francisco e ainda, verificando-se a ausência de estudos de mapeamento genético em espécies de nossa ictiofauna, o presente trabalho teve como objetivos:

- 1) Analisar a progênie F1 de *Prochilodus argenteus* através de marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados).

- 2) Realizar a construção de um mapa genético para *P. argenteus* utilizando a estratégia pseudocruzamento teste ou *pseudo-testcross*.
- 3) Disponibilizar dados de diversidade genética do cruzamento e fornecer subsídios à prática de repovoamento de rios.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Espécie analisada, área de estudo e coleta

As coletas e o desenvolvimento do cruzamento para a obtenção da geração F1 foram realizados em colaboração com o pesquisador Dr. Yoshimi Sato da CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba).

Foram coletados 2 indivíduos de *Prochilodus argenteus* (Figura 1), da região do alto-médio rio São Francisco, sendo que o genitor feminino foi coletado imediatamente abaixo da barragem de Três Marias (MG) no rio São Francisco e o genitor masculino, na região à jusante da confluência dos rios Abaeté e São Francisco, localizada a aproximadamente 30 km à jusante da barragem (Figura 2). Os locais de coleta foram determinados baseados em estudos sobre a diversidade genética de *Prochilodus argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2003; HATANAKA et al., 2006) para que a progênie obtida fosse bastante heterozigótica.



Figura 1: Exemplar de *Prochilodus argenteus*.

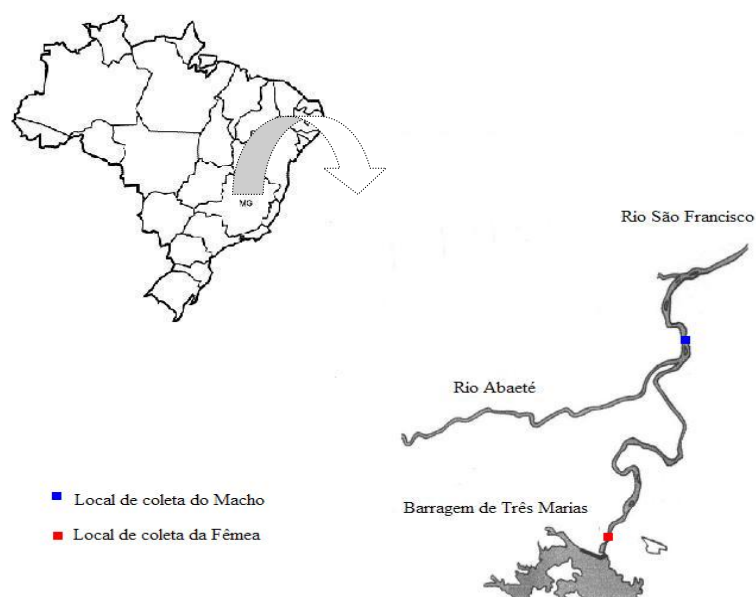


Figura 2: Mapa da região de Três Marias (MG), mostrando os locais de coleta dos genitores no rio São Francisco.

3.2. Hipofização e cruzamento

A hipofização foi realizada na estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, CODEVASF, em Três Marias, MG. O genitor masculino recebeu 1 dose de extrato bruto de hipófise de carpa contendo 2,8 mg/Kg de peso corporal e o genitor feminino, 2 doses contendo 0,8 e 6 mg/Kg de peso corporal e o intervalo entre as doses foi de aproximadamente 16 horas. Os ovos foram fertilizados pelo método “seco”, no qual os gametas são misturados sem contato com a água e apenas após a fertilização os ovos são colocados na água. A extrusão dos ovos se deu $227,3 \pm 9,3$ horas - grau (tempo necessário para a desova em h x temperatura da água em °C) depois da aplicação da segunda dose nas fêmeas (SATO et al., 1996).

Foram colocados cerca de 100 mil alevinos pós-larvas em um tanque com 600 m², no dia 30 de Dezembro de 2005.

A coleta de 189 alevinos, com aproximadamente 9 meses de idade, foi realizada nos dias 11 e 12 de setembro de 2006.

3.3. Extração e quantificação do DNA genômico

O DNA total dos indivíduos (F1 e genitores) foi extraído pelo método fenol /clorofórmio / álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989), com algumas modificações.

O DNA foi extraído de pedaços de fígados armazenados em álcool 99,9% PA. Aproximadamente 1cm³ do tecido foi macerado com auxílio de nitrogênio líquido. Adicionou-se 1 ml de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris HCl 0,01M; RNase - 100 µg/ml; SDS 0,1% e água ultra pura autoclavada até que se complete o volume).

As amostras foram levadas ao banho maria a 37°C por 1,5 horas. Após esse período adicionou-se 100 µg/ml de Proteínase K e as amostras foram incubadas a 55°C por 2h. Um volume igual de fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (50:48:2) foi adicionado e as amostras foram agitadas suavemente por 20 minutos. O material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro tubo *Eppendorf*.

Para a precipitação do DNA foi adicionado NaCl 1M e 2 volumes iguais de etanol gelado, e agitou-se o tubo suavemente. As amostras foram incubadas a -80 °C por 30 minutos. Transcorrido o tempo, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Acrescentou-se 200 µl de álcool 70% gelado e as amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos, descartando-se novamente o sobrenadante.

O DNA foi seco em estufa a 37°C e ressuspendido em TE (Tris- HCl 10mM; EDTA 1mM).

A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria com luz ultravioleta pela leitura de comprimentos de ondas de 260/280 nanômetros pelo biofotômetro (*Eppendor, Inc.*). Cada amostra foi diluída até a obtenção final de 50 ng de DNA por µl de TE .

3.4. Obtenção dos locos de fAFLP

As reações de fAFLP foram realizadas com os kits e protocolo da *Applied Biosystems, Inc.* AFLP Plant Mapping Protocol kit (1997) com modificações.

3.4.1. Digestão do DNA genômico

Para a digestão do DNA foram utilizadas duas enzimas de restrição: a *EcoRI* (*New England BioLabs, Inc.*) de corte freqüente e a *MseI* (*New England BioLabs, Inc.*) de corte raro. Os sítios de reconhecimento das enzimas encontram-se na Tabela 1.

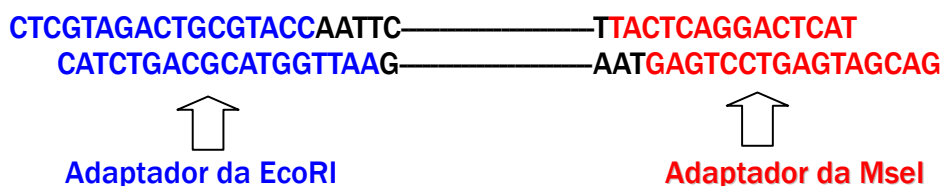
Tabela 1: Sítios de reconhecimento das enzimas *EcoRI* e *MseI*.

Sítios de Reconhecimento	
<i>EcoRI</i>	<i>MseI</i>
5'... G*AATTC...3'	5'... T*TAA...3'
3'... CTTAA*G...5'	3'... AAT*T...5'

Para cada reação foram utilizados 500 ng de DNA; 1,25 µl de tampão (10x NE Buffer *EcoRI*) fornecido juntamente com a enzima; 1,5 unidade de *MseI* e 5 unidades de *EcoRI*. As reações foram incubadas a 37° por 14 horas e, para a inativação das enzimas, a temperatura foi elevada para 65° por 10 minutos. Para verificar o resultado da digestão, 5,5 µl da reação foram aplicados em gel de agarose 1,5%, o DNA foi corado com Brometo de Etídio 400 µg/ml e submetido à eletroforese a 110 V por aproximadamente 45 minutos em tampão TBE 1x (EDTA 2mM, Tris 0,09M e Ácido Bórico 0,09M). Após a reação, o gel foi fotografado sob luz ultravioleta.

3.4.2. Ligação dos adaptadores

Os adaptadores são feitos com seqüências complementares às pontas coesivas das enzimas de restrição (Figura 3) e servirão como sítios de ligação para os *primers* utilizados na amplificação pré-seletiva. Eles são ligados as pontas coesivas do DNA genômico pela enzima T4 DNA ligase

**Figura 3:** Seqüência de nucleotídios dos adaptadores das enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*.

Para cada amostra foram utilizados 0,33 µl de cada adaptador. Os adaptadores da *EcoRI* e da *MseI* foram aquecidos a 95°C por 5 minutos, em tubos *Eppendorfs* diferentes, para a separação dos oligonucleotídeos e após esse período, foram imediatamente colocados

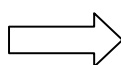
no gelo por 10 minutos.

Na reação de ligação, foram utilizados 1 μ l de tampão da enzima T4 DNA ligase, 200 unidades de T4 DNA ligase, 0,33 μ l de cada adaptador e 3,67 μ l do DNA digerido. A reação foi incubada a 20°C por 2 horas e diluída com o acréscimo de 45 μ l de água ultrapura autoclavada, por amostra.

3.4.3. Amplificação pré-seletiva

Para a amplificação dos fragmentos de DNA foram utilizados *primers* com apenas uma base seletiva. O *primer* da *EcoRI* é formado pelo adaptador + a região de reconhecimento + o nucleotídeo Adenina (A). Da mesma forma o *primer* da *MseI* também é formado pelo adaptador + a região de reconhecimento + o nucleotídeo Citosina (C) (Figura 4). Dessa forma somente os segmentos de DNA ligados aos adaptadores e que possuam essas bases seletivas serão amplificados

DNA genômico ligados aos adaptadores



Fragmentos obtidos após a amplificação



Figura 4: Representação dos fragmentos de DNA (AFLP Plant Mapping Protocol kit 1997).

Na amplificação pré-seletiva, foram utilizados 0,5 μ l da mistura dos dois *primers*, 7,5 μ l de *Core Mix* (tampão, dNTPs, MgCl₂ e enzima DNA polimerase) e 2 μ l do DNA ligado já diluído.

A reação de PCR foi realizada no termociclador *Mastercycle Gradient (Eppendorf Inc.)* seguindo o programa: 72°C por 2 minutos (inicialização); 94°C por 20 segundos (desnaturação); 56°C por 30 segundos (hibridização); 72°C por 2 minutos (extensão). Os passos de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidos por 20 vezes. Para a inativação da enzima a temperatura se manteve a 60°C por 30 minutos.

3.4.4. Amplificação seletiva

Os *primers* utilizados na amplificação seletiva possuem na região interna mais duas bases complementares, as quais podem variar, resultando em diferentes combinações de pares de *primers*; assim somente os fragmentos da amplificação pré-seletiva que possuírem essas

bases complementares serão amplificados nessa etapa.

A amplificação seletiva foi realizada com 7,5 µl de *Core Mix* e 0,5 µl de cada *primer* da *EcoRI* e da *MseI*, além de 1,5 µl da reação pré-seletiva diluída 3 vezes. Os *primers* fluorescentes (FAM, JOE ou NED) utilizados nessa amplificação possuem 3 pares de bases situados posteriormente à seqüência correspondente ao adaptador. As nomenclaturas das possíveis combinações de *primers* estão descritas na Tabela 2, segundo Kocher *et al.* (1998).

As amplificações foram realizadas em um termociclador *Mastercycler Gradient* (Eppendorf), programado para uma desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, desnaturação a 94°C por 20 segundos, hibridização a 66°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 2 minutos. Os passos de desnaturação, hibridização e extensão foram repetidos por 10 vezes, sendo que a cada ciclo a temperatura da hibridização diminuiu 1°C, chegando a 56 °C. Este último ciclo foi repetido por 20 vezes. A temperatura foi mantida a 60°C por 30 minutos para a inativação da enzima.

3.5. Genotipagem

As amostras foram preparadas com a adição de 2 µl da amplificação seletiva, 7,75 µl de Tween 20 (*Sigma Inc.*) 0,01% e 0,25 µl MegaBace ET 550-R Size Standart (*GE Healthcare Life Science Inc.*). Quando as amostras amplificadas com a fluorescência FAM foram misturadas com NED ou JOE, a reação foi modificada para: 2 µl de cada amplificação seletiva, 5,75 µl de Tween 20 (*Sigma Inc.*) 0,01% e 0,25 µl MegaBace ET 550-R Size Standart (*GE Healthcare life Science Inc.*). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95°C.

As genotipagens foram feitas no seqüenciador MegaBACE 750 sistema de análise de DNA (*GE Healthcare life Science Inc.*) pertencente ao laboratório de Biologia Molecular da UFSCar.

Os eletroferogramas foram analisados por meio do *software* Fragment Profiler 1.2 (*MegaBACE Genetic Profiler; Amersham Biosciences Inc.*).

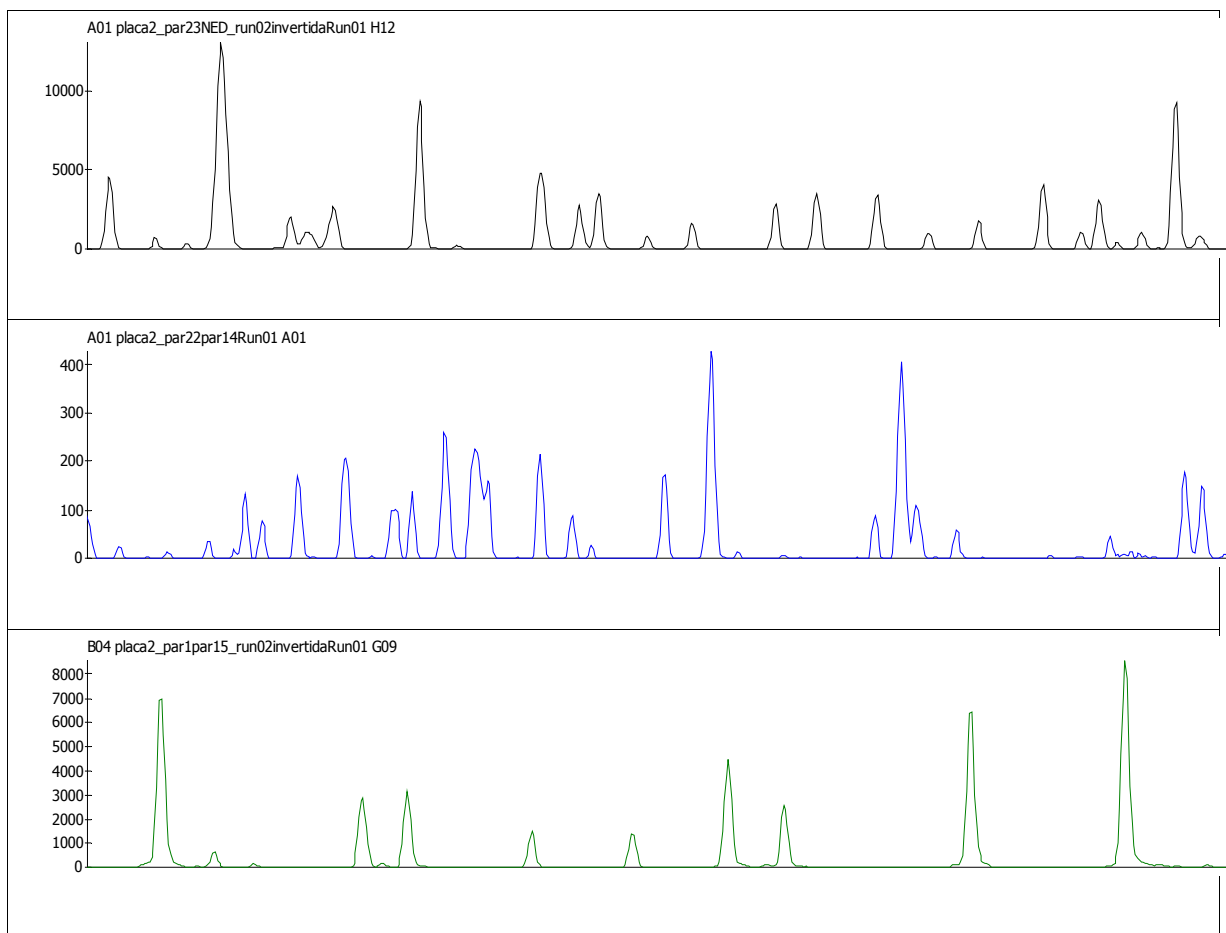


Figura 5: Exemplos de eletroferogramas obtidos pelas fluorescências NED, FAM e JOE respectivamente.

3.6. A escolha dos *primers*

Primeiramente foi feita uma varredura com 46 possíveis combinações de *primers* (Tabela 2), com as quais foram amplificadas amostras de ambos os genitores e 2 indivíduos da progênie. Os *primers* que apresentaram melhor amplificação e maior polimorfismo foram utilizados na construção do mapa e análises de variabilidade (Tabela 3).

Tabela 2 - Identificação das combinações dos *primers*, segundo Kocher et al., (1998).

<i>Primers da EcoRI</i>	<i>Primers da MseI</i>								
	CAA	CAC	CAG	CAT	CTA	CTC	CTG	CTT	
	AAC	1	2	3	4	5	6	7	8
	AAG	9	10	11	12	13	14	15	16
	ACA	17	18	19	20	21	22	23	24
	ACC	25	26	27	28	29	30	31	32
	ACG	33	34	35	36	37	38	39	40
	ACT	41	42	43	44	45	46	47	48
	AGC	49	50	51	52	53	54	55	56
	AGG	57	58	59	60	61	62	63	64

Tabela 3 - Lista das combinações utilizadas na construção do mapa de ligação. EM são as letras iniciais das enzimas utilizadas - *EcoRI* e *MseI* - e o número corresponde à identificação do par de *primers* (KOCHER et al, 1998).

Fluorescência	<i>Primer EcoRI</i>	<i>Primer MseI</i>	Nomenclatura
JOE	ACG	CAT	EM36
JOE	AAG	CTC	EM14
JOE	ACG	CAA	EM33
JOE	AAG	CAT	EM12
JOE	AGG	CAG	EM59
FAM	ACA	CTC	EM22
FAM	ACA	CTA	EM21
FAM	ACA	CTG	EM23
FAM	ACA	CAC	EM18
FAM	ACT	CAA	EM41
FAM	ACT	CTT	EM48
NED	AGC	CAT	EM52
NED	AGC	CTC	EM54
NED	AGC	CAA	EM49
NED	AGC	CTA	EM53

3.7. Análise dos locos e construção do mapa

Primeiramente foi realizada uma análise apenas com os locos polimórficos para os genitores. Para cada indivíduo da progênie foram verificadas a presença, representada pelo algarismo 1, a ausência, pelo 0 ou a falta de dados, pelo 9, de um determinado loco, resultando em uma tabela de polimorfismo.

Para verificar a segregação mendeliana 1:1 de cada loco, foi aplicado o teste segregação (teste de aderência qui-quadrado (X^2)), do *software* GQMOL (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>), sendo estabelecido um nível de decisão: $P = 0,01$ e obtido um valor de p para cada teste. Somente aqueles locos que apresentaram um valor $\geq P$ foram incluídos nas análises, pois não rejeitaram a hipótese nula (H_0), de proporções esperadas iguais.

Posteriormente, foram analisados os locos presentes em ambos os genitores e da mesma forma, foi realizado o teste de segregação. Somente as marcas que segregaram na proporção 3:1, utilizando-se o mesmo valor de P , foram incluídas no mapa para servirem de marcadores pontes.

Os cálculos de recombinação foram feitos para 2 marcadores por vez, a frequência de recombinação foi calculada e os locos foram alocados nos grupos de ligação conforme o valor obtido para o LOD (*log of the odds*) que é a probabilidade de duas marcas estarem ligadas dividido pela probabilidade dessas duas marcas não estarem ligadas, no logaritmo de base 10. Somente os valores de $LOD \geq 3$ foram considerados no mapa.

A distância de mapa, em centiMorgans, foi obtida pela função de Kosambi (1944) e a frequência de recombinação máxima utilizada foi de 30 para os mapas referentes a cada genitor e 20 para o mapa integrado.

3.8. Análise da variabilidade genética

Todos os locos polimórficos foram utilizados na análise de variabilidade. Foi construída uma tabela binária para presença (1) e ausência (0) de todos os fragmentos para cada amostra.

Para a análise da variabilidade foi calculado o coeficiente de similaridade de Jaccard (1901), que compara o número de presença de bandas comuns e o número total de bandas envolvidas, sem considerar o número de ausências conjuntas. A fórmula é dada por: $SJ = a / a + b + c$; onde a corresponde à presença de bandas em ambos os indivíduos (11), b ao número

total de bandas presentes em apenas um indivíduo (10) e c ao número de bandas presentes somente no outro indivíduo (01). Seu intervalo de ocorrência é de 0 a 1 (MEYER, 2002), o cálculo foi realizado pelo programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística (www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm). A diversidade genética foi analisada por meio da heterozigosidade esperada *He*, a qual foi calculada com o *software* AFLPsurv (VEKEMANS, 2002), pelo método Lynch e Milligan (1994).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão dos dados dessa dissertação estão separados em 2 capítulos, os quais correspondem aos trabalhos científicos que serão submetidos para publicação em periódicos.

CAPÍTULO I

Utilização de marcadores AFLP na construção de um mapa genético de ligação para a espécie *Prochilodus argenteus*

Thaís Cabrera Galvão Rojas¹, Cosme Damião Cruz², Fernando Fonseca Pereira de Paula¹,
Pedro Manoel Galetti Junior¹, Terumi Hatanaka¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brasil.

² Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Biologia Geral, Viçosa, MG, Brasil.

RESUMO

No presente trabalho, está descrito o primeiro mapa de ligação para *Prochilodus argenteus*, uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco, com relevante importância para a pesca artesanal e de subsistência. O mapa foi construído com um cruzamento F1, através da abordagem pseudocruzamento teste ou *pseudo-testcross*, utilizando-se 15 combinações de *primers* que resultaram em 46 marcas com segregação mendeliana de 1:1. O mapa do genitor feminino apresentou 3 grupos de ligação e o comprimento do genoma analisado foi de 128,45 cM e o mapa masculino também consistiu em 3 grupos de ligação com comprimento total de 192,67 cM. Trinta e cinco marcadores com segregação observada de 3:1 foram utilizados como âncora na construção de um mapa único, resultando em 9 grupos de ligação somando 442,08 cM. As combinações utilizadas apresentaram um número médio de 3,2 fragmentos polimórficos, com segregação mendeliana de 1:1, por pares de *primers*, valor considerado baixo quando comparado com outros trabalhos. As marcas com segregação 3:1 foram bastante úteis como pontes na localização de marcadores 1:1 e na construção do mapa único, aumentando assim o número de grupos de ligação. Dessa maneira, os resultados mostraram que os marcadores AFLP podem ser adequados para a identificação de marcas ligadas em *Prochilodus argenteus* e os dados obtidos resultaram em um mapa de ligação preliminar para a espécie.

Palavras chaves: AFLP, mapa de ligação, *Prochilodus argenteus*, *pseudo-testcross*.

INTRODUÇÃO

A construção de mapas genéticos pode auxiliar nos estudos e na localização de regiões genômicas que controlam caracteres de importância econômica, podendo aplicar essas informações em programas de melhoramento (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1994). O estudo do genoma de espécies potencialmente úteis a programas de piscicultura pode auxiliar na localização de regiões que controlam características de importância econômica, tais como taxas de crescimento, fecundidade e resistência às doenças (ANDERSON, 2001).

O uso dos marcadores AFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos Amplificados) tem apresentado grande destaque devido ao fato da técnica não requerer nenhum conhecimento prévio sobre o genoma da espécie de interesse e à sua capacidade de gerar, de forma rápida e fácil, inúmeras marcas que podem ser posicionadas aleatoriamente ao longo do genoma de qualquer espécie. Outras características que os tornam um excelente marcador referem-se à sua especificidade, alto poder de resolução e repetibilidade (VOS et al., 1995).

Em peixes, esta ferramenta molecular tem sido frequentemente utilizada em análises de variação genética em estudos populacionais (ARENS et al., 1998), na identificação de marcadores ligados ao sexo (EZAZ et al., 2004; FELIP et al., 2005; LI et al., 2005) e de espécies híbridas (TRANAH et al., 2003). Adicionalmente, inúmeros mapas de ligação utilizando-se marcadores AFLP têm sido construídos para diferentes espécies, tais como: *Oreochromis niloticus* (KOCHER et al., 1998 ; AGRESTI et al., 2000), *Paralichthys olivaceus* (COIMBRA et al., 2003), *Salmo salar* (MOEN et al., 2004), *Pecoglossus altivelis* (WATANABE et al., 2004), *Clarias macrocephalus* (POOMPUANG et al., 2004), *Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis* (LIAO et al., 2007) e *Scophthalmus maximus* (FORTES et al., 2008). No entanto, estudos relacionados ao mapeamento genético de espécies neotropicais são ainda inexistentes.

A espécie *P. argenteus*, conhecida popularmente como curimatã-pacu, apresenta hábitos migradores e representa um importante recurso pesqueiro do rio São Francisco, alcançando até 50% da produção do pescado (GODINHO; GODINHO, 2003). Com a construção da barragem de Três Marias em 1960, a reprodução da espécie foi afetada resultando em um declínio da atividade pesqueira na região (SATO; GODINHO, 2004).

Apesar da grande importância econômica de *P. argenteus* para a pesca artesanal e de subsistência da bacia do São Francisco, ainda não existem estudos com marcadores AFLP. Análises de estruturação populacional foram realizadas na região de Três Marias utilizando-se marcadores RAPD (HATANAKA; GALETTI, 2003) e mais recentemente, microsatélites (HATANAKA et al., 2006). Devido ao seu destaque no setor pesqueiro, inúmeros locos de microsatélites têm sido isolados e caracterizados para a espécie (BARBOSA et al., 2006; BARBOSA et al., no prelo).

A estratégia pseudocruzamento teste ou *pseudo-testcross* tem sido empregada para gerar mapas de ligação de forma mais rápida em indivíduos altamente heterozigóticos, utilizando-se a geração F1 (GRATTAPAGLIA; SEDEROFF, 1994). Esta abordagem de mapeamento tem sido aplicada com sucesso para várias espécies de peixes (KRONFORST et al., 2006; LIAO et al., 2007; ROGERS et al., 2007). Nesta estratégia, são gerados dois conjuntos de marcadores, sendo um para cada genitor, e a construção de um mapa único pode ser obtida através de fragmentos com segregação mendeliana de 3:1, os quais podem servir como âncoras na integração dos dois conjuntos de grupos de ligações resultantes de cada genitor (RITTER et al., 1990; MALIEPAARD et al., 1997; MOEN et al., 2004).

Desta forma, o presente trabalho reporta o primeiro mapa de ligação para a espécie *Prochilodus argenteus*, com marcadores AFLP através da estratégia pseudocruzamento teste, visando identificar a versatilidade desta abordagem de mapeamento em genitores provenientes de diferentes regiões do rio São Francisco.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local de coleta e cruzamento

A coleta foi realizada na região do alto-médio rio São Francisco. Os genitores masculino e feminino foram coletados em diferentes regiões, à jusante da barragem de Três Marias (MG). O cruzamento foi feito na estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, MG (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba - CODEVASF). A hipofização foi efetuada segundo metodologia descrita em Sato et al. (1996). Foram cultivados cerca de 100 mil alevinos pós-larvas, sendo que 189 alevinos, com

aproximadamente 9 meses de idade, constituíram a F1 utilizada para construção do mapa de ligação.

Extração do DNA

O DNA da progênie F1 e dos genitores foi extraído do fígado, segundo método fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989), com algumas modificações. A quantificação do DNA foi feita por espectrofotometria com luz ultravioleta realizada pelo biofotômetro (*Eppendor, Inc.*).

Obtenção das marcas de fAFLP

Os locos de fAFLP foram obtidos com os kits e protocolo da *Applied Biosystems, Inc.* AFLP Plant Mapping Protocol kit (1997) com modificações. Aproximadamente 500 ng de DNA foram digeridos por 14 horas a 37 °C com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI*. Para a ligação, os adaptadores foram aquecidos separadamente a 95°C por 5 minutos, com o objetivo de desnaturar os oligonucleotídeos. A reação foi incubada a 20°C por 2 horas e diluída com o acréscimo de 45 µl de água ultrapura autoclavada.

A amplificação pré-seletiva foi feita com 0,5 µl da mistura dos dois *primers*, 7,5 µl de *Core Mix* e 2 µl do DNA ligado já diluído. A PCR seguiu o ciclo descrito em Plant Mapping Protocol kit (1997) e foi diluída 3 vezes. Igualmente a PCR seletiva seguiu o ciclo descrito no mesmo protocolo e foi realizada com 7,5 µl de *Core Mix* e 0,5 µl de cada *primer* da *EcoRI* e da *MseI* e 1,5 µl da reação pré-seletiva diluída.

As genotipagens foram feitas no seqüenciador MegaBACE 750 sistema de análise de DNA (*GE Healthcare life Science Inc.*). A preparação das amostras foi feita com a adição de 2 µl da amplificação seletiva, 7,75 µl de Tween 20 (*Sigma Inc.*) 0,01% e 0,25 µl MegaBace ET 550-R Size Standart (*GE Healthcare life Science Inc.*). Os eletroferogramas foram analisados com o *Software* Fragment Profiler 1.2 (*MegaBACE Genetic Profiler; Amersham Biosciences Inc.*).

Seleção dos pares de *primers* e a análise dos locos

Inicialmente, 46 possíveis combinações de *primers* foram testadas com os genitores e

2 indivíduos da progênie. Somente os locos polimórficos para os genitores foram verificados na primeira etapa e a presença e ausência das marcas foram representadas por 1 e 0, respectivamente; a falta de dados foi representada pelo algarismo 9. A detecção das marcas foi feita visualmente, excluindo qualquer marca ambígua. O teste do qui-quadrado (X^2) foi aplicado pelo *software* GQMOL (<http://www.ufv.br/dbg/gqmol/gqmol.htm>), com nível de decisão $P \geq 0,01$ para verificar a segregação 1:1 dessas marcas.

Posteriormente foram analisados os locos com segregação 3:1 e, da mesma maneira, foi realizado o teste de segregação. Os marcadores aprovados foram incluídos no mapa para servirem de marcadores pontes.

A construção do mapa

Todos os marcadores fAFLP adequados foram utilizados na construção do mapa com $LOD \geq 3$. A frequência de recombinação máxima utilizada para estabelecer os grupos de ligação de cada genitor foi de 30 e na elaboração de um mapa único, por meio de marcadores pontes, a frequência de recombinação máxima foi de 20.

RESULTADOS

Das 46 possíveis combinações de *primers* utilizadas, 15 que apresentaram melhor amplificação e maior polimorfismo foram utilizadas na elaboração do mapa (Tabela 1). Foram detectados 659 fragmentos, com variação entre 50 e 500 pares de bases. O par de *primers* que apresentou o maior número de marcas foi o *EcoRI* ACA-CTG *MseI*, sendo 62 ao todo. Já o par com o menor número, 29, foi a combinação *EcoRI* ACG-CAA *MseI*. Foram encontrados 107 marcadores presentes apenas no genitor feminino, sendo que desse total 22 apresentavam segregação mendeliana de 1:1 para $P \geq 0,01$. Para o genitor masculino foram encontrados 113 fragmentos exclusivos e 26 deles com segregação de 1:1 para o teste do qui-quadrado (X^2). Quatrocentos e trinta e nove marcadores estavam presentes em ambos os genitores, desses apenas 35 tinham segregação mendeliana de 3:1, $P \geq 0,01$.

Para o genitor feminino, foram encontrados 3 grupos de ligação e 40% dos fragmentos foram incluídos no mapa. O grupo de ligação 2 apresentou o maior número de marcadores

ligados, 5 no total, alcançando o comprimento de 83,03 cM, pela função de Kosambi. Os grupos de ligação 1 e 3 apresentaram apenas dois marcadores cada, e o tamanho foi de 17,82 cM e 27,60 cM, respectivamente (Figura 1), sendo assim o tamanho total do genoma analisado foi de 128,45 cM.

O comprimento do mapa de ligação do genitor masculino foi de 192,67 cM, divididos em 3 grupos de ligação com 46% do total das marcas com segregação 1:1 ligadas. Os grupos de ligação 1, 2 e 3 tiveram 4, 3 e 5 marcas ligadas, respectivamente. O maior tamanho encontrado foi de 107,54 cM para o grupo 3 e o menor foi de 33,66 cM para o grupo 1 (Figura 2).

Todos os marcadores com segregação 1:1, juntamente com os fragmentos que segregaram 3:1 foram utilizados na construção de um mapa único (Figura 3). O mapa apresentou 9 grupos de ligação, com 54 marcadores no total, ou seja, 65% dos fragmentos disponíveis para a construção do mapa foram alocados em algum grupo de ligação. O tamanho dos grupos de ligação variou de 10,03 cM a 112,25 cM, e o comprimento total foi de 442,08 cM. Cinco grupos de ligação foram formados com apenas 2 marcadores, nos demais grupos o número de marcadores foi desde 5 até 19. Somente o grupo de ligação 1 apresentou um agrupamento de marcadores, no entanto, o grupo de ligação 2 apresentou 2 pares de marcadores ligados com menos de 1 cM de distância e o grupo de ligação 3, 1 par.

O mapa foi constituído por 15 marcadores exclusivos do genitor feminino, 18 do genitor masculino e 21 com segregação 3:1, dessa maneira aproximadamente 70% dos fragmentos com segregação 1:1 estavam ligados (Tabela 2). A interferência média encontrada para o mapa foi de 0,53.

DISCUSSÃO

Os marcadores de polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados têm apresentado elevada eficiência nos estudos de mapeamento, principalmente em espécies com pouca informação referente ao genoma (RAZZOLI et al., 2003) e devido ao grande número de fragmentos que podem ser analisados de uma única vez (SØNSTEBØ et al.2007).

A sobreposição de dois ou mais fragmentos de AFLP do mesmo tamanho, mas com

seqüências de nucleotídeos diferentes pode causar um excesso de falsas dupla recombinação entre os marcadores e uma incorreta organização dos locos (BUETOW, 1991), o que poderia resultar em uma super estimativa do tamanho do mapa (SHIELDS et al., 1991). Desta forma, para evitar a inclusão desses marcadores, a detecção da presença e ausência dos fragmentos foi feita visualmente e todos os marcadores ambíguos e duvidosos não foram incluídos nas análises.

A média do número de fragmentos polimórficos de fAFLP obtidos, com segregação mendeliana de 1:1, foi de 3,2 por combinação de *primer*, sendo que o restante das marcas polimórficas não foram informativas. O baixo número de marcadores informativos pode ser explicado pelo fato dos genitores da F1 serem da mesma espécie, enquanto a maioria dos estudos com mapeamento de progênie F1 utiliza genitores de espécies distintas (AGRESTI et al., 2000; LIAO et al., 2007).

No presente trabalho, 87,4% dos marcadores apresentaram desvio na segregação mendeliana esperada de 1:1 e 3:1, um valor de porcentagem bastante alto quando comparado com o obtido para o mapa integrado de duas variedades de *Citrus*, que foi de 24,6% (OLIVEIRA et al., 2008). Segundo Barcaccia et al. (1999), é esperado que uma progênie F1, obtida do cruzamento entre genitores não melhorados geneticamente e altamente heterozigóticos, apresente um baixo nível de distorção na segregação mendeliana. Como os genitores foram retirados da natureza, pode-se inferir que eles deveriam ser altamente heterozigotos e assim, a distorção observada deveria ser baixa. Por outro lado, marcas heterozigóticas não são detectadas por marcadores dominantes, o que explicaria a alta distorção encontrada na segregação esperada. Desta forma, futuros trabalhos com marcadores microssatélites poderão elucidar melhor essa questão.

Adicionalmente, um grande número de marcadores não apresentou ligação com nenhum outro. No mapa gerado para o genitor masculino, cerca de 54% dos marcadores com segregação 1:1 não estavam ligadas, e para o genitor feminino, o valor foi de 59%. Resultados aproximadamente similares também foram encontrados por Moen et al. (2004), de 56% para o mapa do genitor masculino e 69% para o mapa do genitor feminino. Segundo os autores, uma possível explicação para a falta de ligação poderia ser devido ao fato de alguns pares de marcas estarem localizados muito próximos, sendo possível também que exista um padrão de segregação irregular, fenômeno bastante conhecido em machos de salmão. No entanto, para o

presente estudo, não se pode inferir ainda que exista um padrão de segregação anômalo para *Prochilodus argenteus*, visto que não existem dados disponíveis suficientes para tal conclusão.

No mapa integrado por meio dos marcadores 3:1, apenas 35% dos marcadores não estavam ligados e o tamanho total do mapa integrado foi de 442,08 cM obtido com a função de kosambi. Outros trabalhos têm mostrado que a integração de mapas com marcadores 3:1 tem reduzido o tamanho do mapa (CAI et al., 1994; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, no presente estudo, o tamanho do mapa aumentou com a inclusão de mais locos, o que mostra que, pela abordagem do programa GQMOL, os marcadores 3:1 realmente auxiliaram na inclusão e na detecção de ligação dos fragmentos com segregação 1:1.

Segundo Kocher et al. (1998), as estimativas de tamanho de mapa encontradas com marcas AFLP foram menores do que o comprimento de mapa construído com marcas microssatélites, provavelmente porque os alelos co-dominantes são pontuados como locos separados, o que aumenta a estimativa de marcas ligadas. Outra razão para a baixa estimativa do tamanho do mapa pode ser a alta interferência média encontrada que foi de 0,53. Em tilápia, foi também observada uma interferência de 0,54 (KOCHER et al., 1998), e segundo os autores, a interferência pode suprimir a recombinação, aumentando o número de marcadores que parecem estar agrupados muito próximos. No presente trabalho, isto pode ser verificado no grupo de ligação 1 do mapa integrado (Figura 3).

Desta forma, os resultados do presente estudo mostraram que a técnica AFLP é bastante apropriada na detecção de marcas ligadas, por ser um método bastante rápido e eficaz. Entretanto, os dados aqui apresentados são ainda preliminares, pois o tamanho e a organização do genoma analisado não corresponderam ao genoma total de *Prochilodus argenteus*. O número de grupos de ligação detectado para o genitor masculino, para o genitor feminino e para o mapa integrado não foi igual ou maior que o número haplóide da espécie $n=27$, diferentemente de outros trabalhos (KOCHER et al., 1998; AGRETI et al., 2000; COIMBRA et al., 2003; LIAO et al., 2007;). No entanto, todos esses trabalhos foram realizados com marcadores AFLP e microssatélite, ressaltando desta forma, a importância do uso de diferentes marcadores moleculares (dominante e codominante) na construção de mapas de ligação.

A estratégia pseudocruzamento teste ou *pseudo-testcross* mostrou-se também eficiente,

especialmente no caso de cultivo de *P. argenteus*, já que a obtenção da geração F2 significaria consumir um tempo relativamente alto, o que seria impraticável para o presente estudo. Assim, para uma maior eficiência na obtenção de marcas ligadas, sugere-se que o cruzamento seja realizado entre genitores de espécies diferentes como o realizado para carpas (*Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis*) (LIAO et al., 2007), ou então, que a F1 seja resultante do cruzamento de genitores de famílias bem distintas como o descrito para *Salmo salar* (MOEN et al., 2004). O delineamento utilizado no presente estudo foi baseado na variação genética de estudos anteriormente realizados (HATANAKA; GALETTI, 2003; HATANAKA et al., 2006).

Contudo, acredita-se que uma melhor representação do genoma do curimatã-pacu, poderá ser obtida com a utilização de marcadores microssatélites. Desta forma, os dados do presente trabalho, adicionados aos de microssatélites, poderão resultar em uma estimativa de tamanho mais precisa com uma maior saturação do mapa.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Florestal de Minas Gerais pela autorização da captura dos espécimens analisados, ao Dr. Yoshimi Sato e CEMIG-CODEVASF pelo desenvolvimento do cruzamento, ao prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pelo uso do seqüenciador automático, ao Dr. Dario Grattapaglia, pelas orientações durante a análise dos dados e às agências de fomento, FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

As referências do presente artigo estão listadas no final da dissertação.

Tabela 1 - Combinação dos *primers* utilizados seguindo a nomenclatura descrita em Kocher et al., (1998).

Fluorescência	Pares de <i>Primers</i> <i>EcoRI-MseI</i>	Nomenclatura	Nº de fragmentos	Nº de fragmentos polimórficos
JOE	ACG-CAT	EM36	36	16
JOE	AAG-CTC	EM14	59	10
JOE	ACG-CAA	EM33	29	13
JOE	AAG-CAT	EM12	43	16
JOE	AGG-CAG	EM59	38	8
FAM	ACA-CTC	EM22	33	14
FAM	ACA-CTA	EM21	48	19
FAM	ACA-CTG	EM23	62	34
FAM	ACA-CAC	EM18	44	12
FAM	ACT-CAA	EM41	47	10
FAM	ACT-CTT	EM48	45	13
NED	AGC-CAT	EM52	33	12
NED	AGC-CTC	EM54	61	20
NED	AGC-CAA	EM49	44	12
NED	AGC-CTA	EM53	37	11

Figura 1 - Mapa de ligação para o genitor feminino, a distância em cM foi referente à função de Kosambi. As letras das marcas são das iniciais das enzimas utilizadas *EcoRI* e *MseI*, seguidas por dois dígitos que representam a combinação de *primers* (KOCHER et al.,1998) e os números seguintes correspondem ao tamanho do fragmento.

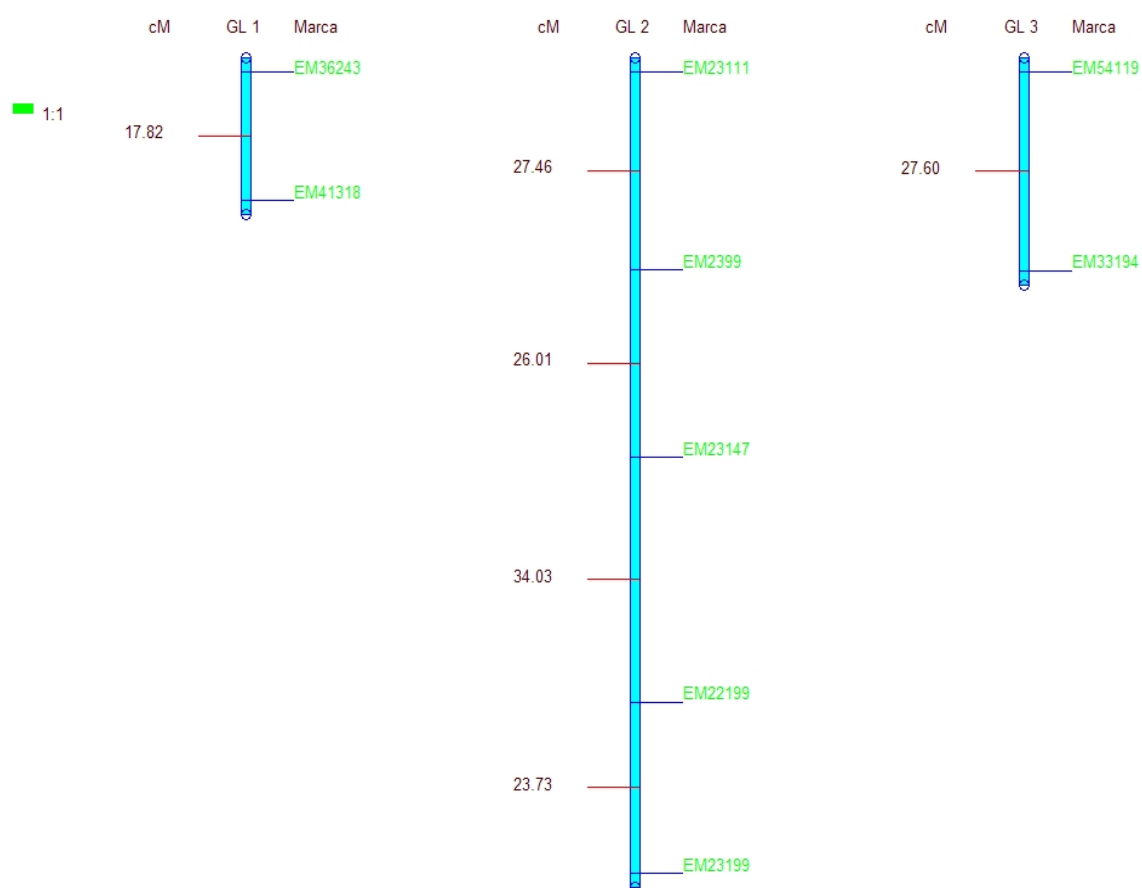


Figura 2 - Mapa de ligação para o genitor masculino, a distância em cM foi referente à função de Kosambi. As letras das marcas são das iniciais das enzimas utilizadas *EcoRI* e *MseI*, seguidas por dois dígitos que representam a combinação de *primers* (KOCHER et al.,1998) e os números seguintes correspondem ao tamanho do fragmento.

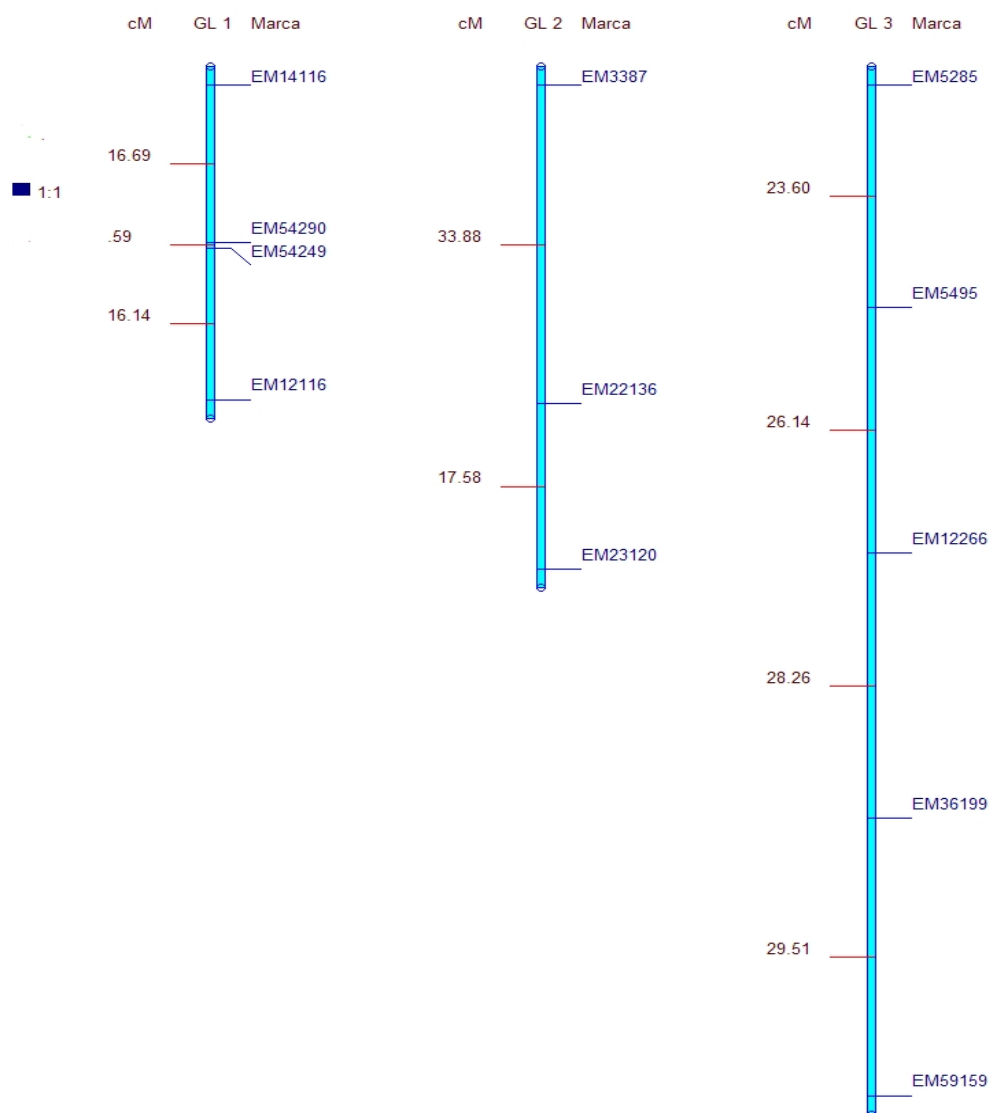
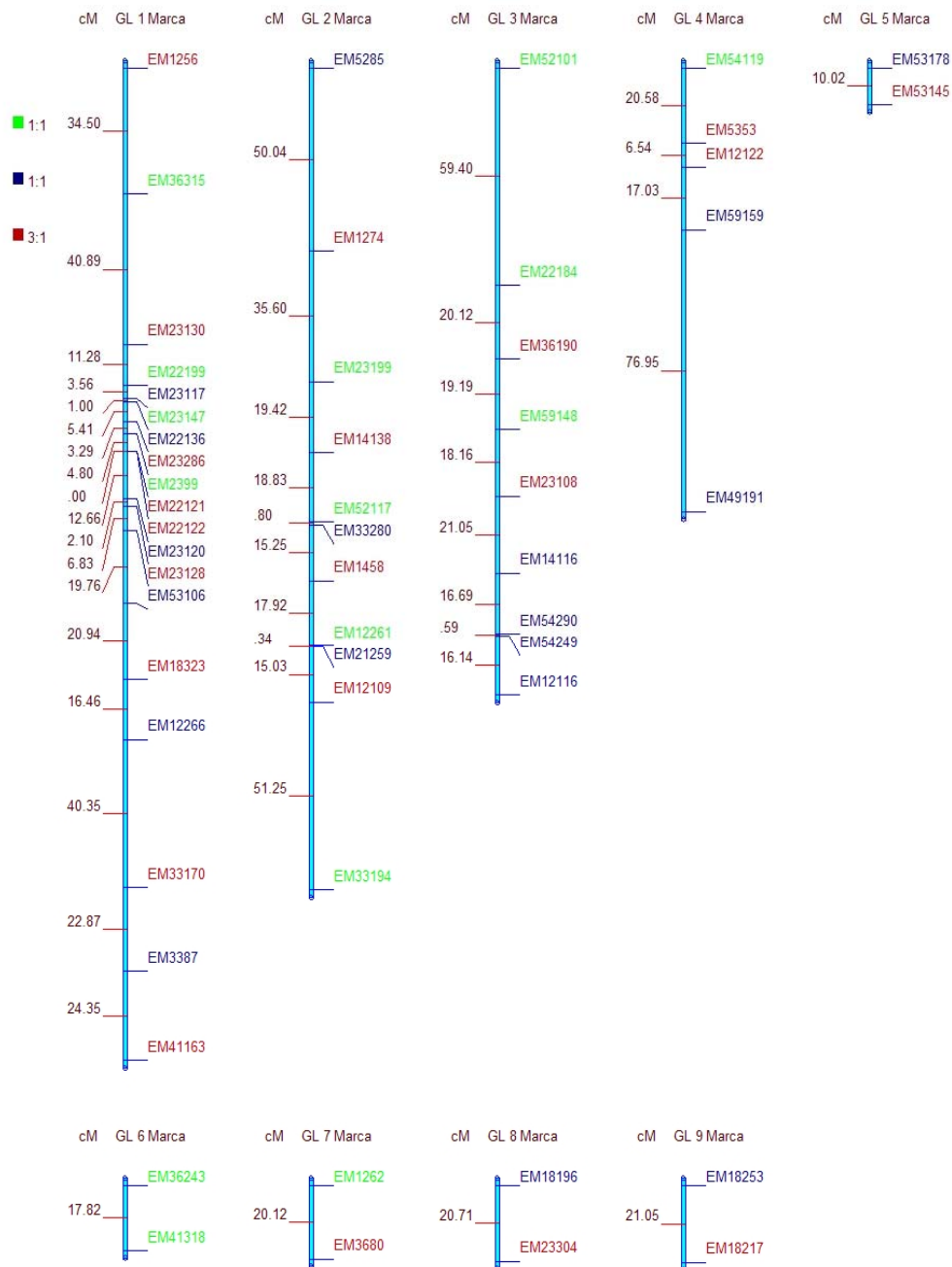


Figura 3 - Mapa de ligação integrado com marcadores 1:1 e 3:1, a distância em cM foi referente à função de Kosambi. As letras das marcas são das iniciais das enzimas utilizadas *EcoRI* e *MseI*, seguidas por dois dígitos que representam a combinação de *primers* (KOCHER et al.,1998) e os números seguintes correspondem ao tamanho do fragmento.



CAPÍTULO II

Análise da diversidade genética de um estoque cultivado de *Prochilodus argenteus* com marcadores AFLP: subsídios ao repovoamento de rios

Thaís Cabrera Galvão Rojas¹, Fernando Fonseca Pereira de Paula¹,
Pedro Manoel Galetti Junior¹, Terumi Hatanaka¹

¹ Universidade Federal de São Carlos, Departamento de Genética e Evolução, São Carlos, SP, Brasil.

RESUMO

A variabilidade genética de um cruzamento de *Prochilodus argenteus*, utilizado para o repovoamento do rio São Francisco, à montante da barragem de Três Marias, foi analisada por meio do polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados (AFLP). As 15 combinações de *primers* usadas nas amplificações resultaram em 659 fragmentos para os 189 exemplares genotipados. Os valores encontrados para as frequências alélicas variaram bastante, de 0,07663 até 0,99532 e a média da heterozigosidade esperada (*He*) foi de 0,32082. O coeficiente de similaridade de Jaccard intrapopulacional foi de $0,72564 \pm 0,00451$, evidenciando uma alta homogeneidade existente entre os indivíduos. A comparação desse índice com os valores encontrados para populações naturais coletadas em diferentes locais à jusante da barragem, reforça a necessidade de estudos genéticos e ecológicos nos programas de peixamento que vêm sendo realizados na região à montante da barragem de Três Marias.

Palavras chaves: variabilidade genética, AFLP, *Prochilodus argenteus*, repovoamento de rios.

INTRODUÇÃO

A família Prochilodontidae é endêmica da América do Sul e é dividida em 3 gêneros com 21 espécies (CASTRO; VARI, 2003). Na bacia do rio São Francisco, são encontradas três espécies do gênero *Prochilodus*: *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides* (BRITSKI, 1988). *P. argenteus* possui o maior porte da família e representa um importante recurso pesqueiro do rio São Francisco, alcançando até 50% da produção do pescado (GODINHO; GODINHO, 2003). Durante a reprodução, que ocorre na estação chuvosa, essa espécie realiza migração rio acima (BRITSKI, 1972).

Em 1960 foi inaugurada a barragem de Três Marias, localizada no alto-médio rio São Francisco (S 18° 12' 51" W 45° 15' 51"), afetando a reprodução da espécie na região à jusante, devido às alterações no regime hidrológico natural e nas características da água (PETTS, 1989). O repovoamento da região vem sendo utilizado como estratégia para a recuperação da atividade pesqueira na região de Três Marias pela CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba) desde a década de 1980; no entanto, ainda não está disponível a avaliação dessa medida (GODINHO; GODINHO, 2003).

Existem vários riscos associados com a introdução de espécies e/ou populações em um determinado ecossistema: pode haver um aumento da taxa de competição e/ou predação, há o risco de impactar outros organismos que ali vivem e ainda, temos que considerar a possibilidade do endocruzamento diminuir o *fitness* (RIDDELL, 1993). Assim, o uso de marcadores moleculares pode ser empregado para medir a diversidade genética (TORO et al., 1999) dentro da população que está sendo introduzida e entre essa população e a selvagem.

Os marcadores AFLP se destacam por não exigirem nenhum conhecimento prévio sobre o genoma da espécie em estudo e pela capacidade de verificar inúmeros locos simultaneamente. Vários estudos sobre variabilidade com o uso de marcadores AFLP têm sido realizados com diferentes espécies de peixes: *Scleropages fomusus* (YUE et al., 2004), *Ictalurus punctatus* (SIMMONS et al., 2006), *Fundulus heteroclitus* (MCMILLAN et al., 2006) e *Salmo trutta* (SØNSTEBØ et al., 2007). Em *Ictalurus punctatus*, por exemplo, foi analisada a diversidade genética de estoques cultivados, tanto destinados à pesquisa como provenientes de fazendas, verificando-se um alto coeficiente de similaridade entre os indivíduos (MICKETT et al., 2003). Segundo os autores, estes dados podem auxiliar na seleção e manejo destes estoques, possibilitando também comparações futuras entre estoques

cultivados e naturais.

Existem poucos trabalhos sobre a análise genética em *Prochilodus argenteus*, apesar de sua grande importância econômica para a pesca artesanal e de subsistência da bacia do São Francisco. Análises da diversidade e estrutura populacional foram realizadas para amostras da região à jusante do reservatório de Três Marias, com marcadores RAPD (HATANAKA; GALETTI, 2003) e microssatélite (HATANAKA et al., 2006). No entanto, na região à montante da barragem, onde o peixamento vem sendo realizado com frequência, não há dados genéticos disponíveis.

Assim, o objetivo do trabalho é apresentar dados referentes à variabilidade genética de um estoque cultivado proveniente de um cruzamento utilizado para o repovoamento da região à montante da barragem de Três Marias, no alto-médio rio São Francisco e comparar estes dados com os de estoques naturais já publicados. Estas informações serão úteis para fornecer subsídios ao peixamento que vem sendo realizado há aproximadamente 3 décadas na região de Três Marias (MG).

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras

O cruzamento foi realizado pela estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias, CODEVASF, em Três Marias, MG, e a hipofização seguiu o protocolo descrito em Sato et al. (1996). Os genitores foram coletados em diferentes regiões, à jusante da barragem de Três Marias (MG), no rio São Francisco. Cento e oitenta e nove amostras desse cruzamento foram utilizadas nas análises de variabilidade genética.

Extração do DNA

O DNA das amostras foi extraído do fígado, pelo protocolo fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (SAMBROOK et al., 1989), com algumas modificações. A quantificação foi determinada por espectrofotometria com luz ultravioleta realizada pelo biofotômetro (*Eppendor, Inc.*).

Analises de fAFLP

Para a obtenção dos locos de fAFLP foram utilizados os kits e protocolo da *Applied Biosystems, Inc.* AFLP Plant Mapping Protocol kit (1997) com modificações. A digestão de 500 ng de DNA genômico com as enzimas de restrição *EcoRI* e *MseI* durou 14 horas a 37 °C. A reação de ligação foi incubada a 20°C por 2 horas e diluída com 45 µl de água ultrapura autoclavada.

Os ciclos de PCR da amplificação pré-seletiva e seletiva seguiram as etapas descritas em Plant Mapping Protocol kit (1997). A amplificação pré-seletiva foi feita com 0,5 µl da mistura dos dois *primers*, 7,5 µl de *Core Mix* e 2 µl do DNA ligado já diluído, e a seletiva com 7,5 µl de *Core Mix* e 0,5 µl de cada *primer* da *EcoRI* e da *MseI* e 1,5µl da reação pré-seletiva diluída.

Quinze combinações de *primers* foram utilizadas (Tabela 1), as análises dos produtos de AFLP foram feitas pelo seqüenciador MegaBACE 750 sistema de análise de DNA (*GE Healthcare life Science Inc.*) e com o *Software* Fragment Profiler 1.2 (*MegaBACE Genetic Profiler; Amersham Biosciences Inc.*). Os dados dos fragmentos obtidos foram transformados em uma matriz binária, na qual 1 e 0 representam presença e ausência, respectivamente.

O programa Genes - Aplicativo computacional em genética e estatística (www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm), foi utilizado para calcular o coeficiente de similaridade de Jaccard (1901). Para a comparação direta com marcadores co-dominantes, a média da heterozigosidade esperada foi calculada através da frequência alélica, pelo método Baysiano, assumindo que não existe nenhuma distribuição a priori da frequência, pelo programa AFLP-SURV version 1.0 (VEKEMANS, 2002).

RESULTADOS

Utilizando as 15 combinações de *primers* foram encontradas 659 marcas, para os 189 exemplares de *Prochilodus argenteus*. No entanto, 64 locos foram retirados das análises por estarem presentes em todas as amostras e não serem consideradas marcas informativas. O número de fragmentos por combinação de *primer* variou de 29 a 62. A frequência alélica para a ausência do fragmento variou bastante, foi de 0,07663 até 0,99532 e a média da heterozigosidade esperada (H_e) foi 0,32082 (Tabela 2). O valor encontrado para os coeficientes de similaridades de Jaccard (1901) foi de $0,72564 \pm 0,00451$.

DISCUSSÃO

As análises genéticas de diversidade dentro do estoque amostrado, conduzidas com AFLP, mostraram a utilidade deste marcador para acessar a diversidade genética da espécie *Prochilodus argenteus*. Da mesma maneira, o uso desse marcador foi eficiente para comparar a diversidade genética dentro e entre populações para *Scleropages formosus* (YUE et al., 2002), *Ictalurus punctatus* (MICKETT et al., 2003) e para o marisco *Coleomatra antiquata* (KONG; LI, 2007). O AFLP também foi empregado no design de uma população base para maximizar a diversidade genética na criação de salmão (*Salmo Salar*) e para investigar a correlação entre a diversidade genética e a variância de caracteres quantitativos (HAYES et al., 2006).

No entanto, o marcador AFLP é dominante e, dessa forma, não consegue separar heterozigotos (1/0) de homozigotos (1/1), o que dificulta a comparação com marcadores co-dominantes. Para tornar essa comparação viável, a estimativa da heterozigosidade é calculada por meio da frequência alélica, a qual é medida pela ausência da banda (BENSCH; ÅKESSON, 2005) e para evitar estimativas erradas para pequenas amostras, Lynch e Milligan (1994) sugeriram que apenas locos com 4 ou mais ausências para a marca em questão devem ser incluídos na análise. A média da heterozigosidade esperada para a população utilizada no peixamento do rio São Francisco foi de $He = 0,32082$.

Para os estoques cultivados de *Pangasianodon gigas* da Tailândia os valores para a heterozigosidade esperada forma maiores quando comparados com o valor do presente estudo. Diversos fatores como a super exploração, as práticas impróprias de pesca e as mudanças do meio ambiente causaram o declínio populacional da espécie *Pangasianodon gigas*. Desta forma, desde 1983, medidas conservacionistas foram tomadas para a recuperação da espécie e várias fazendas de produção foram criadas pelo governo e pela iniciativa privada, com o objetivo de serem usadas para aqüicultura e repovoamento (SRIPHAIROJ et al., 2007). A análise da diversidade dentro das fazendas analisadas mostrou que a variação genética dentro dos estoques foi relativamente baixa, a heterozigosidade esperada variou de $0,43 \pm 0,21$ a $0,66 \pm 0,11$, no entanto a variabilidade entre as fazendas foi relativamente alta mostrando que no futuro o manejo deve ser colaborativo entre as fazendas (SRIPHAIROJ et al., 2007).

As análises genéticas feitas com microssatélite para os estoques de *Lates calcarifer* do

sudeste da Ásia mostraram que a diversidade genética encontrada para os dois estoques cultivados e a população selvagem foi alta, apresentando valores para *He* variando de 0,72 a 0,76. Entretanto, foi encontrada uma significativa diferenciação genética e alelos privados também foram detectados dentro dos estoques, indicando assim que a criação de uma cultura através da combinação de exemplares das diferentes amostras pode elevar a diversidade genética (ZHU et al., 2006).

Mickett et al. (2003) acessou a diversidade genética de populações de *Ictalurus punctatus*, do Alabama, com marcadores AFLP e o valor médio encontrado para *He* foi de 0,135. Os resultados do trabalho indicaram que as populações analisadas podem ser consideradas geneticamente bastante similares, mas que diferenças observadas podem direcionar novas medidas para melhorar o manejo da espécie. Posteriormente, um estudo comparativo entre populações domésticas e selvagens mostrou que as populações selvagens exibiram um maior nível de polimorfismo e heterozigosidade em relação às populações domésticas, e que estas populações cultivadas eram todas estreitamente relacionadas umas com as outras (SIMMONS et al., 2006).

A diversidade genética de uma população de *Brycon opalinus*, proveniente da criação da companhia de luz Paraibuna, utilizada para o repovoamento da bacia do Paraíba do Sul, foi acessada por meio de marcadores microssatélites. O valor encontrado para a heterozigosidade esperada foi de 0,789 e foi menor do que os valores encontrados para as outras 7 populações selvagens analisadas no trabalho, o que mostra a diminuição da diversidade genética para populações domésticas, quando comparadas com amostras selvagens (BARROSO et al., 2005).

A diversidade genética de *Prochilodus argenteus* já foi anteriormente estudada com o uso de marcadores RAPD (HATANAKA; GALETTI, 2003) e microssatélites (HATANAKA et al., 2006), no entanto, somente populações selvagens foram incluídas nas análises. Três diferentes locais de coleta, à jusante da barragem, foram analisados com marcadores RAPD (HATANAKA; GALETTI, 2003), os coeficientes de similaridades de Jaccard foram diminuindo conforme o local amostrado se afastava da barragem, o que, segundo os autores, poderia estar relacionado com as condições ambientais dos locais de coleta.

No presente trabalho, o coeficiente de similaridade de Jaccard foi de $0,72564 \pm 0,00451$, maior que os valores obtidos por Hatanaka e Galetti (2003), para os diferentes locais de coleta à jusante da barragem: $0,636 \pm 0,81$; $0,604 \pm 0,047$ e $0,442 \pm 0,024$. Um aspecto que

deve ser mencionado é que ambos os marcadores AFLP (presente estudo) e RAPD (HATANAKA; GALETTI, 2003) apresentam um comportamento dominante, possibilitando assim, análises comparativas entre os estudos. Além disso, o estudo com microsatélites mostrou que as amostras mais distantes da barragem também apresentaram maiores valores para *He*, quando comparado com amostras de locais de coleta mais próximos da barragem (HATANAKA et al., 2006).

Esses dados indicam que a prática de repovoamento necessita de um monitoramento, incluindo o uso simultâneo de marcadores genéticos e ecológicos. A seleção dos genitores coletados aleatoriamente na natureza para a produção dos alevinos que em seguida são liberados na região à montante da barragem deve ser acompanhada de um estudo preliminar. Além disso, a possível ocorrência de populações estruturadas na região à jusante, verificada para *P. argenteus* (HATANAKA; GALETTI, 2003; HATANAKA et al., 2006) e outras espécies migradoras como *Brycon lundii* (WASKO; GALETTI, 2002), pode estar comprometendo a viabilidade do método, se este cenário for similar na região à montante do reservatório.

Sabe-se atualmente que a integridade das populações naturais pode ser afetada pelas atividades antropogênicas e isso pode ocorrer não só pela rotina humana que é considerada um forte agente estressor, mas também pelo repovoamento de rios e escape acidental de populações domésticas (PALUMBI, 2001). Dados sobre a diversidade genética devem ser efetivamente usados para combinar indivíduos ou populações com uma alta performance e uma ampla variabilidade genética em programas de criação, seleção e repovoamento, a fim de evitar catástrofes causadas por doenças ou mudanças ambientais (MICKETT et al., 2003).

Os dados do presente trabalho mostram que a F1 proveniente do cruzamento para fins de repovoamento apresenta uma alta similaridade quando comparada com estoques naturais anteriormente estudados. Desta maneira, enfatizamos a necessidade de estudos genéticos e ecológicos na definição dos programas de peixamento que vêm sendo realizados na região à montante da barragem de Três Marias, visando assim, contribuir com a manutenção da biodiversidade e reconstituição dos estoques naturais desta espécie de peixe tão explorada na bacia do São Francisco.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Instituto Florestal de Minas Gerais pela autorização da captura dos espécimens analisados, ao Dr. Yoshimi Sato e CEMIG-CODEVASF pelo desenvolvimento do cruzamento, ao prof. Dr. Flávio Henrique da Silva pelo uso do seqüenciador automático e às agências de fomento FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

REFERÊNCIAS

As referências estão relacionadas no final da dissertação.

Tabela 1 - Combinações de *primers* utilizadas nas análises e número de fragmentos polimórficos encontrados por combinação.

Pares de <i>Primers</i>	Nº de fragmentos
Adaptador da EcoRI+ ACG-CAT +Adaptador da MseI	36
Adaptador da EcoRI+ AAG-CTC +Adaptador da MseI	59
Adaptador da EcoRI+ ACG-CAA +Adaptador da MseI	29
Adaptador da EcoRI+ AAG-CAT +Adaptador da MseI	43
Adaptador da EcoRI+ AGG-CAG +Adaptador da MseI	38
Adaptador da EcoRI+ ACA-CTC +Adaptador da MseI	33
Adaptador da EcoRI+ ACA-CTA +Adaptador da MseI	48
Adaptador da EcoRI+ ACA-CTG +Adaptador da MseI	62
Adaptador da EcoRI+ ACA-CAC +Adaptador da MseI	44
Adaptador da EcoRI+ ACT-CAA +Adaptador da MseI	47
Adaptador da EcoRI+ ACT-CTT +Adaptador da MseI	45
Adaptador da EcoRI+ AGC-CAT +Adaptador da MseI	33
Adaptador da EcoRI+ AGC-CTC +Adaptador da MseI	61
Adaptador da EcoRI+ AGC-CAA +Adaptador da MseI	44
Adaptador da EcoRI+ AGC-CTA +Adaptador da MseI	37

Tabela 2 - Valores das frequências alélicas para ausência de bandas referentes a todos os fragmentos polimórficos.

Nome do locos - Frequência alélica			
EM3685,1-0.84445	EM2389,6-0.40554	EM33246,1-0.29040	EM41185,9-0.12994
EM3691,5-0.47610	EM2398,7-0.75608	EM33252,7-0.24892	EM41188,1-0.12994
EM36100,1-0.48784	EM23111,2-0.68545	EM33274,5-0.72146	EM41199,3-0.27752
EM36108,3-0.64472	EM23114,7-0.60199	EM5954,3-0.94355	EM41210-0.14947
EM36169,2-0.62506	EM23121,2-0.31978	EM59148,1-0.72331	EM41227-0.18240
EM36171,2-0.98943	EM23124-0.52687	EM59154,5-0.93764	EM41233,5-0.16674
EM36216,9-0.96917	EM23146,6-0.75608	EM59318,7-0.77527	EM41242,7-0.18240
EM36242,8-0.72552	EM23176,3-0.86100	EM5962,7-0.62873	EM41249,2-0.16674
EM36315-0.72941	EM23184,2-0.64727	EM59106,7-0.87628	EM41251,7-0.18240
EM3684,1-0.98371	EM23199,4-0.75981	EM59112,5-0.95526	EM41255,1-0.24618
EM3689,3-0.90271	EM23212,5-0.93649	EM59158,9-0.67562	EM41263,1-0.21024
EM3696,5-0.96039	EM23248,3-0.82409	EM5971,4-0.13102	EM41274,2-0.72872
EM36105-0.95747	EM23332,5-0.86427	EM5980,3-0.10784	EM41307,8-0.12994
EM36106,7-0.97790	EM23373,5-0.97504	EM5988,8-0.07832	EM41326,1-0.54389
EM36163,7-0.61133	EM2373,4-0.83768	EM5992,3-0.15071	EM41333,2-0.18240
EM36199-0.66450	EM2379,7-0.94851	EM5999,1-0.07832	EM41340,7-0.19680
EM3659,3-0.66023	EM2395,1-0.87403	EM59101,5-0.13102	EM41358,8-0.19680
EM3664,5-0.98943	EM2396-0.92130	EM59121,7-0.15071	EM41405,2-0.18240
EM3667,8-0.36129	EM23112,7-0.89957	EM59128-0.15071	EM41425,5-0.21024
EM3680-0.43254	EM23116,9-0.70177	EM59130,5-0.10784	EM4855-0.95931
EM36142,6-0.15199	EM23120,5-0.64290	EM59141,1-0.10784	EM4862,8-0.79593
EM36145,7-0.23877	EM23125-0.53217	EM59144,3-0.10784	EM4889-0.86123
EM36154,1-0.16955	EM23132,4-0.77818	EM59149,7-0.25918	EM48107,4-0.55084
EM36156,8-0.16955	EM23135-0.94851	EM59163,3-0.13102	EM48110-0.96495
EM36164,2-0.66450	EM23155,8-0.27199	EM59177,6-0.13102	EM48137,4-0.95080
EM36170,1-0.07898	EM23228,8-0.61593	EM59190-0.24822	EM48155,4-0.92486
EM36175,6-0.15199	EM23245-0.93649	EM59192-0.21199	EM4865-0.94796
EM36189,9-0.48784	EM23251,9-0.20012	EM59203,7-0.16812	EM4882,7-0.19574
EM36196,3-0.55303	EM23275,7-0.83768	EM59213,7-0.15071	EM48119,5-0.52054
EM36239-0.13213	EM23283,2-0.82065	EM59217,1-0.28958	EM48145-0.64160
EM36245,1-0.10875	EM23330,2-0.90271	EM59239,8-0.26969	EM48165,3-0.61578
EM36248-0.21377	EM23408,7-0.89012	EM59249,6-0.13102	EM48185-0.28563
EM36288,4-0.13213	EM23451,5-0.86427	EM59264,8-0.23675	EM4852,1-0.83248
EM36308,7-0.23877	EM2361,1-0.71771	EM59267,1-0.23675	EM4858,3-0.19574
EM36331,8-0.18546	EM2366,9-0.30156	EM59273-0.10784	EM4869,9-0.57953
EM36419,7-0.16955	EM2368,9-0.65596	EM59291,3-0.10784	EM4873,6-0.24485
EM1467,8-0.96788	EM2375,1-0.70177	EM59293,9-0.16812	EM4876,9-0.87987
EM14238,8-0.96495	EM2380,6-0.72164	EM59311,4-0.40214	EM4880,8-0.24485
EM14269,4-0.99532	EM23104,7-0.22662	EM59316,4-0.75346	EM4888-0.86123
EM14319,2-0.40895	EM23107,6-0.43903	EM59454,1-0.19844	EM4890-0.52054
EM14106,1-0.16539	EM23121,2-0.26138	EM1262-0.65826	EM4895,3-0.22165
EM14115,8-0.73758	EM23127,8-0.52146	EM12103,6-0.62452	EM4899,3-0.16584
EM14125,7-0.39559	EM23130,5-0.52146	EM12107,6-0.77177	EM48101,7-0.24485
EM14206-0.79593	EM23144,3-0.70578	EM12123,3-0.97335	EM48105-0.20910
EM14211,3-0.07725	EM23159,3-0.58290	EM12135,3-0.57953	EM48113,1-0.20910
EM14355,4-0.68459	EM23162,2-0.76350	EM12147,5-0.98711	EM48128,8-0.25566
EM1458,4-0.44183	EM23173,5-0.86427	EM12250-0.87677	EM48133,9-0.19574
EM1471,5-0.58880	EM23178,1-0.18546	EM12261,4-0.67047	EM48141,8-0.22165
EM1473,7-0.10638	EM23180,3-0.13213	EM1276,7-0.92775	EM48147-0.25566
EM1475,2-0.10638	EM23196,5-0.29203	EM12112,7-0.57013	EM48148,2-0.19574

EM1485,7-0.10638	EM23201,6-0.34527	EM12115,9-0.64581	EM48163,5-0.29495
EM1497,1-0.12923	EM23205-0.67065	EM12206,3-0.78568	EM48168,8-0.62452
EM1499,3-0.49935	EM23210,7-0.78541	EM12211,6-0.26603	EM48173,2-0.20910
EM14102,4-0.38277	EM23215,7-0.76350	EM12266,2-0.53084	EM48199-0.20910
EM14109,5-0.10638	EM23223,7-0.63403	EM12266,2-0.73220	EM48202,5-0.18141
EM14127,3-0.07725	EM23270,7-0.16955	EM1250,7-0.96778	EM48211,9-0.25566
EM14128,9-0.07725	EM23285,6-0.54273	EM1256-0.41663	EM48240,6-0.23354
EM14136-0.10638	EM23294,5-0.32848	EM1258,6-0.59797	EM48244-0.25566
EM14138-0.45391	EM23303,8-0.48201	EM1265-0.55574	EM48256,2-0.27602
EM14150,6-0.32962	EM23306,7-0.13213	EM1266,6-0.37564	EM48273,2-0.19574
EM14164-0.28563	EM23384,4-0.18546	EM1271,4-0.18141	EM48276-0.24485
EM14182,1-0.07725	EM5278,8-0.98371	EM1274,5-0.55084	EM48278,8-0.25566
EM14209,6-0.07725	EM52100,8-0.73329	EM1280,7-0.24485	EM48335-0.25566
EM14221,5-0.10638	EM52116,9-0.71375	EM1286,4-0.16584	EM48343,9-0.24485
EM14242,1-0.16584	EM52132,7-0.63403	EM1290-0.18141	EM4954,6-0.65109
EM14265,6-0.29495	EM5252,1-0.96172	EM1296,4-0.19574	EM4975,9-0.73446
EM14285,7-0.07725	EM5271,9-0.40554	EM12108,6-0.55574	EM4991,9-0.56521
EM14298,4-0.25566	EM5285,1-0.75068	EM12111-0.50471	EM49131,4-0.73070
EM14310,2-0.32962	EM52113,5-0.44665	EM12114,5-0.22165	EM49140,2-0.95290
EM22147,6-0.80608	EM52124,2-0.94450	EM12118,7-0.20910	EM49156,9-0.83604
EM22173,5-0.92775	EM52201-0.21750	EM12121,7-0.46567	EM49132,6-0.53003
EM22176,3-0.86123	EM52218,7-0.99528	EM12127,3-0.22165	EM49155-0.94710
EM22184,2-0.75763	EM52228,1-0.98693	EM12128,9-0.24485	EM49160,7-0.56030
EM22199,4-0.67451	EM52262,4-0.96702	EM12130,4-0.24485	EM49182,5-0.56030
EM22212,5-0.97608	EM52265,5-0.29821	EM12136-0.25566	EM49190,6-0.64687
EM22232,1-0.85489	EM52269,7-0.36493	EM12141-0.22165	EM49229,1-0.62962
EM22284,7-0.83472	EM5274,1-0.99523	EM12145,4-0.18141	EM4968,8-0.13030
EM22332-0.85489	EM5277,3-0.97842	EM12153,9-0.64160	EM4966-0.13030
EM22273,5-0.86750	EM5280,9-0.16766	EM12169,8-0.20910	EM4969,7-0.18289
EM22135,6-0.67451	EM5288,5-0.62255	EM12194,2-0.18141	EM4974-0.13030
EM22215,6-0.78568	EM5290,7-0.80815	EM12277,5-0.28563	EM4980,8-0.10725
EM22244,9-0.95054	EM5292,3-0.78383	EM12294,7-0.20910	EM4985,8-0.18289
EM22275,5-0.84763	EM5295,8-0.96986	EM1899,2-0.62152	EM4987,3-0.29737
EM22266,8-0.10581	EM52103-0.21140	EM18113,3-0.88827	EM4995,7-0.18289
EM22268,9-0.67088	EM52106-0.16766	EM18127,6-0.51854	EM49101,6-0.13030
EM22280,6-0.62544	EM52135,9-0.98966	EM18132,5-0.98388	EM49106-0.19736
EM22285,4-0.14786	EM52155,3-0.72133	EM18235-0.99517	EM49109-0.16720
EM22101,2-0.14786	EM52161,1-0.82507	EM18369,3-0.96957	EM49110,5-0.21082
EM22104,6-0.10581	EM52176,9-0.99238	EM18100,9-0.56992	EM49113,2-0.18289
EM22107,6-0.27454	EM52192,9-0.26895	EM18184,6-0.85291	EM49123,8-0.18289
EM2211,2-0.86904	EM52195,3-0.16766	EM18196,4-0.73681	EM49129,6-0.18289
EM22114,7-0.40788	EM52255-0.23610	EM18253-0.70976	EM49137,6-0.13030
EM22121,2-0.52289	EM52261,8-0.97842	EM18283,5-0.93722	EM49151,4-0.16720
EM22123,9-0.61683	EM5472,7-0.91505	EM1857,8-0.24822	EM49153,8-0.14988
EM22121,7-0.54299	EM54111,3-0.90909	EM1859,3-0.24822	EM49158-0.30649
EM22130,2-0.48019	EM54112,9-0.95891	EM1867,9-0.67149	EM49161,9-0.14988
EM22159,2-0.62114	EM54118,7-0.72872	EM1873,4-0.28958	EM49170,9-0.18289
EM22196,5-0.74999	EM54147,3-0.90605	EM1880,4-0.29903	EM49173,1-0.23546
EM22201,5-0.37363	EM54173,5-0.16674	EM1890,8-0.37347	EM49184,5-0.21082
EM22205,5-0.79839	EM54191-0.97579	EM18111,9-0.31707	EM49188,7-0.13030
EM22270,7-0.07684	EM54209,3-0.90605	EM18117-0.26969	EM49205,6-0.19736
EM2152,5-0.96986	EM54226,3-0.10695	EM18119,6-0.46621	EM49211,8-0.16720
EM2157,8-0.95261	EM54275,9-0.94739	EM18122,2-0.26969	EM49214-0.23546
EM2160,8-0.98665	EM5474,1-0.80027	EM18124,6-0.24822	EM49224,6-0.19736
EM2162,9-0.98100	EM5479,6-0.71353	EM18130,1-0.32574	EM49267,1-0.13030
EM2176,8-0.97527	EM5494,7-0.72872	EM18134,8-0.29903	EM49288,6-0.19736
EM2189,7-0.96986	EM54204,9-0.47978	EM18143,1-0.35041	EM49355-0.16720

EM21177,1-0.98954	EM54206,7-0.42537	EM18146,2-0.27982	EM49402,9-0.14988
EM21191,2-0.99511	EM54248,7-0.68219	EM18149,5-0.42237	EM53121,1-0.88495
EM2191,2-0.80691	EM54270,3-0.46823	EM18155,5-0.81720	EM53174,7-0.54154
EM21100,9-0.41926	EM54290-0.67818	EM18158,3-0.85703	EM53188-0.88495
EM21130,4-0.25847	EM54296,5-0.45035	EM18160-0.57320	EM5379,8-0.76208
EM21144,6-0.84070	EM54321,8-0.86905	EM18163,4-0.24822	EM5384,8-0.88193
EM21146,4-0.91968	EM5459,7-0.07767	EM18167,1-0.21199	EM53106,2-0.75858
EM21160,8-0.82734	EM5468,2-0.45641	EM18171,6-0.25918	EM53111,5-0.52661
EM21162,1-0.31620	EM5488,7-0.42537	EM18187,6-0.29903	EM53177,6-0.71524
EM21195,9-0.25847	EM54100,4-0.54889	EM18194,2-0.31707	EM53186-0.58866
EM21232,9-0.45795	EM54116-0.07767	EM18198,5-0.81379	EM53210,7-0.62800
EM21258,6-0.73652	EM54127,3-0.37771	EM18205,5-0.25918	EM53262,6-0.17995
EM21310-0.78028	EM54129,5-0.07767	EM18208,8-0.37347	EM5353,5-0.54154
EM2156,4-0.34144	EM54161,5-0.07767	EM18217,5-0.41574	EM5359,8-0.25360
EM2160-0.76598	EM54179,2-0.07767	EM18224,5-0.60620	EM5365,9-0.86056
EM2164,7-0.29821	EM54250,6-0.10695	EM18249,4-0.47211	EM5373,4-0.16451
EM2166,7-0.37979	EM54398,9-0.22286	EM18310,5-0.56339	EM5382,4-0.30156
EM2168,2-0.21140	EM3377,6-0.87872	EM18323-0.40900	EM5387,2-0.10552
EM2169,7-0.37242	EM33123,1-0.81605	EM4168,8-0.88468	EM5388,8-0.07663
EM2180-0.16766	EM33194,4-0.75923	EM41136-0.97579	EM5392,3-0.14747
EM2184,2-0.19790	EM33217,8-0.98665	EM41245-0.34752	EM5394,7-0.17995
EM2193,4-0.13065	EM33232,7-0.98388	EM41278,7-0.55387	EM53101,7-0.12820
EM2196,5-0.61361	EM33387-0.68977	EM41318,5-0.75816	EM53109-0.10552
EM2199,3-0.16766	EM33105,4-0.28059	EM4183,7-0.61469	EM53135,7-0.10552
EM21102-0.18341	EM33110,6-0.64798	EM41132,4-0.85323	EM53144,6-0.55128
EM21105,2-0.16766	EM33112,7-0.43012	EM41289,1-0.99528	EM53150,3-0.16451
EM21107,1-0.16766	EM33141,8-0.41691	EM4163,2-0.07767	EM53153,6-0.17995
EM21110,7-0.19790	EM33201,5-0.67750	EM4172,9-0.37038	EM53156,7-0.10552
EM21112,6-0.15030	EM33243,7-0.98100	EM4189-0.23481	EM53157,6-0.17995
EM21188-0.18341	EM33279,8-0.70580	EM4191,5-0.29658	EM53182,3-0.10552
EM21120,8-0.19790	EM3362,6-0.19900	EM4194,7-0.14947	EM53186,9-0.19418
EM21132-0.15030	EM3382,7-0.18442	EM41101,9-0.18240	EM53216,7-0.17995
EM21135,2-0.18341	EM33117,8-0.35140	EM41104,9-0.30565	EM53219,3-0.14747
EM21172,4-0.21140	EM33120-0.81605	EM41109,3-0.14947	EM53227,1-0.19418
EM21182,3-0.22409	EM33128,8-0.24892	EM41120-0.18240	EM53253,8-0.14747
EM21193,3-0.23610	EM33131,4-0.22535	EM41129,3-0.10695	EM53258,2-0.37970
EM21203-0.19790	EM33145,2-0.29040	EM41139,2-0.24618	EM53268-0.50597
EM21214-0.07810	EM33158,4-0.84963	EM41147,5-0.18240	EM52320,8-0.14747
EM21239,3-0.22409	EM33170-0.47343	EM41154-0.12994	
EM21243,9-0.23610	EM33178,7-0.66920	EM41163,3-0.43175	He = 0,32082
EM21246,6-0.23610	EM33210-0.29040	EM41165,9-0.54889	Var(He)= 0.00003
EM21253,9-0.22409	EM33221,2-0.39625	EM41174-0.29658	
EM2388,5-0.58290	EM33237,5-0.32664	EM41179,6-0.10695	

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados apresentados nesse trabalho se referem a um cruzamento, utilizado para o repovoamento da região à montante da barragem de Três Marias (MG), no rio São Francisco. Baseado em estudos de variação genética, anteriormente realizados, os genitores utilizados foram coletados em dois locais diferentes à jusante da barragem e com características liminológicas e ambientais distintas, já que estes são potencialmente heterozigóticos para diversos locos, já que são de uma população natural e assim gerassem uma progênie adequada para a construção de um mapa de ligação por meio da abordagem pseudocruzamento teste.

A construção do mapa de ligação com marcador dominante AFLP teria sido mais eficiente se um dos genitores fosse totalmente heterozigoto (Aa) e o outro homozigoto recessivo (aa) pois, dessa maneira a fase de ligação seria conhecida e todos os fragmentos presentes nas genotipagens da progênie seriam considerados marcas informativas, uma vez que todas as marcas presentes seriam heterozigotas, provenientes do alelo A do genitor (Aa), e a ausência significaria que o alelo cedido por esse genitor foi o a. No entanto, espera-se que populações naturais possuam um certo nível de heterozigosidade, principalmente quando trabalhos anteriores já verificaram diferenças na diversidade e a presença de estrutura populacional (HATANAKA; GALETTI, 2003; HATANAKA et al., 2006), o que justifica a utilização de genitores coletados na natureza, para os estudos realizados no presente trabalho.

Para a construção de um mapa de ligação mais saturado e com uma maior extensão de genoma analisado, mais estudos fazem-se necessários para que se possa alcançar o número haplóide da espécie. Desta forma, os dados do presente trabalho, adicionados a estudos com microsatélites, poderão futuramente fornecer subsídios para identificação de locos referentes a características com valor econômico (QTLs), visto a importância deste grupo de peixe na economia no Brasil.

Quanto à diversidade genética, os dados obtidos mostraram uma grande similaridade da amostragem cultivada, o que sugere a realização de estudos mais completos para a avaliação da variabilidade dos estoques cultivados que são utilizados no projeto de repovoamento. Além desta avaliação, deve-se realizar um acompanhamento de análises genéticas antes e depois desta prática, a fim de verificar a eficiência do método. A definição dos programas de repovoamento deve ser embasada em estudos genéticos e ecológicos, com capacidade de manter a biodiversidade da espécie na região de Três Marias.

6. CONCLUSÕES

- A técnica AFLP mostrou-se eficiente na análise de uma progênie F1 de *Prochilodus argenteus*. A soma das marcas geradas pelos 15 pares de *primers* utilizados gerou um total de 659 marcas, para cada amostra, o que resultou em uma matriz com 124.551 pontos. Esse valor evidencia a capacidade do marcador em gerar inúmeras marcas informativas rapidamente, as quais puderam ser utilizadas na construção de um mapa de ligação e simultaneamente, na análise da diversidade genética.
- Um mapa de ligação preliminar foi construído para a espécie através do pseudocruzamento teste. Além disso, os marcadores com segregação 3:1 foram muito bem empregados como âncoras na integração dos mapas gerados para os genitores. O mapa de ligação obtido representa o início dos estudos de mapeamento para espécies de peixes neotropicais no Brasil.
- Dados de estudos com microssatélites devem ser adicionados aos resultados do presente estudo, visando obter uma maior saturação do mapa.
- Como esperado, foi observado que o cruzamento utilizado em projetos de repovoamento na região à montante da barragem de Três Marias apresenta uma alta similaridade genética quando comparada com estoques naturais anteriormente estudados.
- Há necessidade de estudos genéticos e ecológicos na definição dos programas de peixamento que vêm sendo realizados na região à montante da barragem de Três Marias, tanto no sentido de avaliar geneticamente os estoques cultivados quanto de analisar as populações naturais anteriormente e posteriormente à prática de repovoamento, visando assim identificar a eficácia do método.

7. REFERÊNCIAS

AFLP[®] Plant Mapping Protocol. Disponível em: <http://www3.appliedbiosystems.com/cms/groups/mcb_support/documents/generaldocuments/cms_040959.pdf>. Acessado em :09 Janeiro de 2007.

AGRESTI, J. J. et al. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. **Aquaculture**, v. 185, p. 43-56, 2000.

ALARCÓN, J.A. et al. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of the gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture**, v. 230, p. 65-80, 2004.

ALBERTSON, R.C. et al. Phylogeny of a rapidly evolving clade: the cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. **Proceeding of the National Academy of Science**, USA, v. 96, p. 5107–5110, 1999.

ANDERSSON, L. Genetic dissection of phenotypic diversity in farm animals. **Nature Reviews Genetics**, v. 2, p.130–138, 2001.

ARENS, P.; COOPS, H.; VOSMAN, B. Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers. **Molecular Ecology**, v.7, p. 11-18, 1998.

AVERSANO, R. et al. Resistance traits and AFLP characterization of diploid primitive tuber-bearing potatoes. **Genetic Resources and Crop Evolution**, v. 54, n. 8, p. 1797-1806, 2007.

BARBOSA, A.C.D.R. et al. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 936-938, 2006.

BARBOSA, A.C.D.R. et al. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, 2007, Prelo.

BARCCARCIA, G. et al. AFLP fingerprint in *Medicago* spp.: its development and application in linkage mapping. **Plants Breeding**, v.118, p. 335-340, 1999.

BARROSO, R.M. et al. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellite. **Aquaculture**, v. 247, p. 51-65, 2005.

BEAUMONT, A.R.; HOARE K. **Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture**. USA; Blackwell science, 2003. 158 p.

BENSCH, S.; ÅKESSON, M. Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2899–2914, 2005.

BOTSTEIN, D. et al. Costruction of a genetis linkage map in man using restriction fragment lenght polymorphism. **American Journal of Human Genetics**, Chicago, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do estado de São Paulo - sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. Brasília: Câmara dos Deputados; CODEVASF, 1984, 143 p.

BRITSKI H.A.; SATO Y.; ROSA A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. 3° ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1988. 115 p.

BUETOW, K.H. Influence of aberrant observations on high-resolution linkage analysis outcomes. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, n. 5, p. 985-994, 1991.

CAI, Q.; GUY, C.L.; MOORE, G.A. Extension of the linkage map in *Citrus* using random amplified polymorphic DNA (RAPD) markes and RFLP mapping of cold- acclimation-responsive loci. **Theor. Appl. Genet.**, v. 89, p. 606-614, 1994.

CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. Family Prochilodontidae. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Jr. CJ. **Check List of the Freshwaters of South and Central América**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003, p. 65-70.

COCKERELL, T.D.A. The scales of the South american characinid fishes. **Ann. Carnegie Mus.**, v.9, p. 92-113, 1915.

COIMBRA, M.R.M. et al. A genetic linkage map of the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 220, p. 203-18, 2003.

CRUZ, C.D. **Programa genes: análise multivariada e simulação**. Viçosa (MG): Editora UFV, 2006. Disponível em: <www.ufv.br/dbg/genes/genes.htm>. Acessado em: 17 de dez. 2007.

CRUZ, C.D.; SCHUSTER, I. **Software GQMOL**. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gbol/gbol.htm>>. Acessado em: 17 de dez. 2007.

DAGHER-KHARRAT, M.B. et al. Geographical diversity and genetic relationships among Cedrus species estimated by AFLP. **Tree Genetics & Genomes**, v. 3, p. 275–285, 2007.

DANZMANN, R.G.; GHARBI, K. Gene mapping in fishes: a means to an end. **Genetica**, v. 111, p. 3-23, 2001.

DOYLE, R.W. et al. Selective recovery of founder genetic diversity in aquacultural broodstocks and captive, endangered fish populations. **Genetica**, v. 111, p. 291–304, 2001.

EZAZ, M.T. et al. Isolation and physical mapping of sex-linked AFLP markers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.). **Marine Biotechnology**, v. 6, n. 5, p. 435-445, 2004.

FELIP, A. et al. An AFLP-based approach for the identification of sex-linked markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Aquaculture**, v. 247, n. 1-4, p. 35-43, 2005.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1994. 220 p.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética**. Brasília :EMBRAPA - CENARGEM,1995. 220 p.

FISHBASE. Disponível em: < <http://www.fishbase.org/search.php> >. Acessado em: 04 de Jan. 2008.

FORTES, G.G. et al. Application of amplified fragment length polymorphism markers to assess molecular polymorphisms in gynogenetic haploid embryos of turbot (*Scophthalmus maximus*). **Aquaculture Research**, v. 39, p. 41-49, 2008.

FOULLEY, J.L. et al. Genetic Diversity Analysis Using Lowly Polymorphic Dominant Markers: The Example of AFLP in Pigs. **Journal of Heredity**, v. 97, n. 3, p. 244–252, 2006.

FRANKHAN, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 220 p.

GILBEY, J. et al. A microsatellite linkage map for Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Animal Genetics**, v. 35, n. 2, p. 98-105, 2004.

GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: SOGRAFE; PUC Minas, 2003. 468 p.

GODINHO, A.L; KYNARD, B. Migration and spawning of radio-tagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed brazilian river. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 135, p. 811-824, 2006.

GONÇALVES, S.C. et al. Genetic diversity and differential in vitro responses to Ni in *Cenococcum geophilum* isolates from serpentine soils in Portugal. **Mycorrhiza**, v. 17, n. 8, p. 677-686, 2007.

GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage map of *Eucalyptus grandis* and *E. urophylla* using a pseudo-testcross mapping strategy and RAPD marks. **Genetics**, v. 137, p. 1121-1137, 1994.

HAIG, S.M. et al. Genetic identification of spotted owls, barred owls, and their hybrids: legal implications of hybrid identity. **Conservation Biology**, v. 18, p.1347–1357, 2004.

HATANAKA, T.; GALETTI JUNIOR., P.M. RAPD marks indicate the occurrence of structured populations of a migratory freshwater fish species. **Genet. Mol. Biol.** v. 26, p. 19-25, 2003.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JUNIOR., P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 153-159, 2006.

HAYES, B. et. al. Use of molecular markers to maximise diversity of founder populations for aquaculture breeding programs. **Aquaculture**, v. 255, p. 573-578, 2006.

HICKLEY, P. Stocking and introduction of fish- a synthesis. In: COWX, I. G. **Rehabilitation of freshwater fisheries**. Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 247-254.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS (IBAMA), 2004. Estatística da pesca 2004, grande regiões e unidades da federação. Brasília, DF, 2005. Disponível em: < ([http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesi/boletim 2004.pdf](http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesi/boletim%202004.pdf)) >. Acessado em 03 de jan. 2008.

JACCARD, P. Étude comparative de la distribution florale dans une portion des Alpes et des Jura. **Bulletin de la société vandoise de sciences naturelles**, n. 37, p. 547-579, 1901.

KEARSEY, M.J.; FARQUHAR, A.G.L. QTL analysis in plants; where are we now? **Heredity**, v. 80, p. 137-142, 1998.

KNAPIK, E.W. et al. A reference cross DNA panel for zebrafish (*Danio Rerio*) anchored with simple sequence length polymorphism. **Development**, v. 123, p. 451-460, 1996.

KNAPIK, E.W. et al. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio Rerio*). **Nature Genet.**, v. 18, p. 338-343, 1998.

KOCHER, T.D. et al. A Genetic Linkage map of a Cichlid Fish, the Tilapia (*Oreochromis nicoticus*). **Genetics**, v. 148, p. 1225-1232, 1998.

KONG, L.; LI, Q. Genetic comparison of cultured and wild populations of the clam *Coelomactra antiquata* (Spengler) in China using AFLP markers. **Aquaculture**, v. 271, p.152-161, 2007.

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. **Annals of eugenics**, v. 12, p. 75-172, 1944.

KRAUSS, S.L. Complete exclusion of non-sires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 217-226, 1999.

KRONFORST, M.R. et al. Linkage of butterfly mate preference and wing color preference cue at the genomic location of wingless. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, p. 6575–6580, 2006.

LI, L. et al. Construction of AFLP-based genetic linkage map for Zhikong scallop, *Chlamys farreri* Jones et Preston and mapping of sex-linked markers. **Aquaculture**, v. 245, n. 1-4, p. 63-73, 2005.

LIAO, M. et al. Development of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) genetic maps using microsatellite and AFLP markers and a pseudotestcross strategy **Animal Genetics**, v. 38, n. 4, p. 364-370, 2007.

LINS, L.V. et al. **Roteiro, etodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: Contendo a lista oficial da fauna ameaçada de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1997. 55 p.

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

LUDIM, M. et al. Cosmid clones from atlantic salmon physical genome mapping. **Aquaculture**, v. 177, p. 59-64, 1999.

LYNCH, M.; MILLIGAN, B.G. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 91-99, 1994.

LYNCH, M. Gene duplication and evolution. **Science**, v. 297, p. 945– 947, 2002.

MADDEN, J.R. et al. Neighbouring male spotted bowerbirds are not related, but do maraud each other. **Animal Behaviour**, v. 68, p. 751–758, 2004.

MAGO-LECCIA, E. Consideraciones sobre la sistemática de la familia Prochilodontidae (Osteichthyes, Cypriniformes), con una sinopsia de las especies de Venezuela. **Acta Biol. Venez.**, v. 8, n. 1, p. 35-96, 1972.

MALIEPAARD, C.; JANSEN, J.; VAN OOIJEN, J.W. Linkage analysis in a full-sib family of an outbreeding plant species: overview and consequences for applications. **Genetics Research**, v. 70, p. 237-250, 1997.

MCMILLAN, A.M. et al. Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. **Ecotoxicology**, v. 15, p. 539–548, 2006.

MEYER, A.S. **Comparação de coeficiente de similaridades usados em análises de agrupamento com dados de marcadores moleculares dominantes**. 106p. Dissertação de Mestrado -Escola Superior de Agricultura Luz de Queiroz, Piracicaba, 2002.

MICKETT, K. et al. Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. **Aquaculture**, v. 228, p. 91-105, 2003.

MOEN, T. et al. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rates between the sexes. **Animal Genetics**, v. 35, p. 81-92, 2004.

MORAES, M.C. de. **Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá- amarelo (*Passiflora edulis* Sims f *flavicarpa* Deg.)** 141 p. Tese- Doutorado- Escola Superior de Agricultura Luz de Queiroz, Piracicaba, 2005.

NYBOM, H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 1143–1155, 2004.

OLIVARES-FUSTER, O. et al. Host-specific association between *Flavobacterium columnare* genomovars and fish species. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, n. 8, p. 624-633, 2007.

OLIVEIRA, E.J. et al. An integrated molecular map of yellow passion fruit based on simultaneous maximum-likelihood estimation of linkage and linkage phases. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 133, n. 1, p. 35-41, 2008.

PALUMBI, S.R. Humans as the world’s greatest evolutionary force. **Science**, v. 293, p. 1786-1790, 2001.

PAULS, E. **Características cariotípicas em espécies do gênero *Prochilodus* (*Pisces, Prochilodontidae*):** Considerações sobre a evolução cromossômica e sistemas de cromossomos supranumerários. 156 p. Tese. Universidade Federal de São Carlos, SP. 1985.

PEETS, G.E. Perspectives for ecological management of regulated rivers. In: GORE, J.A.; PETTS, G.E. **Alternartives in regulated rivers management**. Boca Raton: CRC Press. 1989, p. 383-402.

PHILLIPS-MORA, W.; AIME, M.C.; WILKINSON, M.J. Biodiversity and biogeography of the cacao (*Theobroma cacao*) pathogen *Moniliophthora roreri* in tropical America. **Plant Pathology**, v. 56, n. 6, p. 911-922, 2007.

POOMPUANG, S.; NA-NAKORN, U. A preliminary genetic map of walking catfish (*Clarias macrocephalus*). **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 195-203, 2004.

POSTLETHWAIT, J.H. et al. A genetic linkage map for the zebrafish. **Science**, v. 264, p. 699-703, 1994.

QUESTIAU, S.; EYBERT, M.C.; TABERLET, P. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers reveal extra-pair parentage in a bird species: the bluethroat (*Luscinia svecica*). **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1331–1339, 1999.

RAZZOLI, M. et al. AFLP to asses genetic variation in laboratory gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Heredity**, v. 94, p. 507-511, 2003.

RIDELL, B.E. Salmonid enhancement: lessons from the past and a role for the future. In: MILLS, D. **Salmon in the Sca and new enhancement strategies**. Oxford: Fishing new books, 1993. p. 338-355.

RITTER, E.; GEBHARDT, C.; SALAMINI, F. Estimation of recombination frwquencies and construction of linkage maps from crosses between heterozygous parents. **Genetics**, v. 125, p. 645 -654, 1990.

ROGERS, S.M. et al. Linkage maps of the dwarf and normal lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) species complex and their hybrids reveal the genetic architecture of population divergence. **Genetics**, v. 175, p.375–398, 2007.

SABETI, P.C. et al. Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. **Nature**, 419, p. 832–83, 2002.

SACHIDANANDAM, R. et al. A map of human genome sequence variation containing 1.42 millionsingle nucleotide polymorphisms. **Nature**, 409, p. 928–933, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. . **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. 2 ed. Cold Spring Harbor: Laboratory Press, 1989, 626 p.

SAMPAIO, E.D.; LÓPEZ, C.M. Limnologias físicas, químicas e biológicas da represa de Três Marias e do São Francisco. In: Godinho H. P., Godinho A. L., 2003 **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: SOGRAFE- Editora e Gráfica LTDA PUC Minas, 2003. p. 71-92.

SATO, Y.; CRDOSO, E.L.; AMORIM, J.C.C. **Peixes das lagoas marginais do rio São francisco a montante da represa de Três Marias (Minas Gerais)**. Brasília: CODEVASF, 1987. 42 p.

SATO, Y. et al. Impacto do reservatório de Três Marias sobre a piracema à jusante da barragem. In: **Abstracts of the XI Encontro Brasileiro de Ictiologia**, Campinas, SP, Brazil, p. 2, 1995.

SATO, Y. et al. Hypophysation Parameters of Fish *Phochilodus marggravii* Obtained in Routine Hatchery Station Conditions. **Revista Brasileira de Biologia**, 56 (1), p. 59-64, 1996.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco river. In: CAROLSFELD, J. et al. **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and ecological status**. Victoria, Canadian : IDRC, 2004. 380 p.

SCHRENZEL, M. et al. Molecular epidemiology of Mycobacterium avium subsp. avium and Mycobacterium intracellulare in captive birds. **Veterinary Microbiology**, v. 126, n. 1-3, p. 122-131, 2008.

SHIELDS, D.C. et al. Error filtration, interference, and the human linkage map. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 88, p. 6501-6505, 1991.

SIMMONS, M. et al. Comparison of domestic and wild channel catfish (*Ictalurus punctatus*) populations provides no evidence for genetic impact. **Aquaculture**, v. 252, p. 133-146, 2006.

SINGER, A. et al. Sex-Specific recombination rates in zebrafish (*Danio rerio*). **Genetics**, v. 16, p. 649-657, 2002.

SKAALA, Ø. et al. Microsatellite analysis in domesticated and wild Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): Allelic diversity and identification of individuals. **Aquaculture**, v. 240, n. 1-4, p. 131-143, 2004.

SØNSTEBØ, J.H; BORGSTRØM, R.; HEUN, M.A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of brown trout (*Salmo trutta*L.) populations from Hardangervidda, Norway. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1427–1438, 2007.

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

SUN, X.; LIANG, L. A genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) and mapping of a locus associated with cold tolerance. **Aquaculture**, v. 238, n. 1-4, p. 165-172, 2004.

TORO, M.A. et al. Optimal use of genetic markers in conservation programmes. **Genetics Selection Evolution**, v. 31, p. 255-261, 1999.

TRANAH, G.J. et al. Development of codominant markers for identifying species hybrids. **Conservation Genetics**, v. 4, n. 4, p. 537-541, 2003.

VEKEMANS, X. **AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie,Végétale.** Université Libre de Bruxelles, Belgium ,2002. Disponível em: <<http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html> >. Acessado em: 4 de dez. 2007.

VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Reserach**, Londres, v.23, p. 4407-4414, 1995.

WANG, L. et al. Genetic linkage map of bay scallop, *Argopecten irradians irradians* (Lamarck 1819).**Aquaculture Research**, 38, p. 409-419, 2007.

WASKO, A.P.; GALETTI JUNIOR, P.M. RAPD analysis in the neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of tha especies. **Hydrobiologia**, 474, p. 131-137, 2002.

WASKO, A.P. et al. Genetic Conservation of Brazilian Fishes: Present State and Perspectives. **Annual Review of Biomedical Sciences**, Botucatu, v. 6, p.79-90, 2004.

WATANABE, T. et al. Preliminary study on linkage mapping based on microsatellite DNA and AFLP markers using homozygous clonal fish in ayu (*Plecoglossus altivelis*). **Marine Biotechnology**, v. 6, n. 4, p. 327-334, 2004.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, 18, p. 7213-7218, 1990.

WEB OF SCIENCE. Disponível em: <<http://www.periodicos.capes.gov.br/portugues/index.jsp>> Acessado em: 12 de maio 2008.

WILLIAMS, J.G.K. et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acids Researchs**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

YUE, H.G. et al. Monitoring the genetic diversity of three asian arowana (*Scleropages formosus*) captative stock usin AFLP and micrsatellites. **Aquaculture**, v. 237, p. 89-102, 2004.

ZHU, Z.Y. et al. Genetic analyses of Asian seabass stock using novel polymorphic microsatellites. **Aquaculture**, v. 256, p.167-173,2006.