

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

**DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO  
LABORATÓRIO DE BIODIVERSIDADE MOLECULAR E CITOGENÉTICA DE PEIXES**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Análise comparativa da variação genética entre os estoques  
cultivado e natural de *Prochilodus argenteus*: implicações para o  
repopoamento de rios**

**Wagner Narciso de Campos**

São Carlos  
Julho/2009

**Análise comparativa da variação genética entre os estoques  
cultivado e natural de *Prochilodus argenteus*: implicações para o  
repovoamento de rios**

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

**Análise comparativa da variação genética entre os estoques  
cultivado e natural de *Prochilodus argenteus*: implicações para o  
repovoamento de rios**

**Wagner Narciso de Campos**

**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**

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

C198ac

Campos, Wagner Narciso de.

Análise comparativa da variação genética entre os estoques cultivado e natural de *Prochilodus argenteus* : implicações para o repovoamento de rios / Wagner Narciso de Campos. -- São Carlos : UFSCar, 2009.  
51 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Genética de populações. 2. Peixe. 3. *Prochilodus argenteus*. 4. Microsatélite. 5. Conservação. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

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

**Análise comparativa da variação genética entre os estoques cultivado e natural de *Prochilodus argenteus*: implicações para o repovoamento de rios**

Dissertação de Mestrado de **Wagner Narciso de Campos**

Banca Examinadora

Profa. Dra. Terumi Hatanaka

Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues

Dra. Alexandra Sanches

  
.....  
  
.....  
  
.....

Muitos filósofos ecologistas mostraram que toda a civilização ocidental está na errada, em rota de colisão com aquilo que o nosso planeta pode suportar(...) além dos fenômenos concretos de poluição e destruição ambiental, concluíram que há algo de errado no próprio modo de pensar do Ocidente.(...) filósofos ecologistas debateram, por exemplo, o próprio conceito de desenvolvimento. Este conceito baseia-se na premissa de que o homem é superior na natureza, e que é o seu dono.(...) Nos próprios meios científicos muitas vezes se levantaram nos últimos anos para explicar que o nosso modo científico de pensar se encontra perante uma “mudança de paradigma”, ou seja, uma transformação fundamental. Em alguns campos específicos vimos já os primeiros frutos, por exemplo, em "movimentos alternativos" que põem a tônica num pensamento global e trabalham para um novo estilo de vida.

Gaarden, Jostein O mundo de Sofia.

## **Agradecimentos**

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

A Capes, pela bolsa concedida;

Ao meu porto seguro e  
meu norteador que são os meus pais Antonio e Izete;

Ao meu irmão Pierre que sempre se posicionou  
como o imediato substituto caso meus pais faltassem.

À minha irmã Jessie;

À minha orientadora Terumi Hatanaka  
que me proporcionou um bem vitalício, minha formação

Ao Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.;

Ao Dr. Flávio Henrique da Silva;

Ao Dr. Yoshimi Sato e à CEMIG-CODEVASF;

A todos os membros do Departamento de Genética e Evolução;

Alexandra Sanchez pela ajuda final;

E um último porém não menos importante

À Ana Karina Lemos Arantes (Aninha)

senão pelos milhares de pequenos enormes favores que fez

e pela ajuda compreensão por tempo integral,

pelo simples fato que no momento que eu cai

literal e metaforicamente

foram seus braços que me apararam;

Finalmente à amigos e todos que me ajudaram

que não foram aqui incluídos, injustamente, para não delongar essa lista.

## RESUMO

O repovoamento de rios é uma das estratégias que vem sendo frequentemente usada para a reabilitação pesqueira, atuando como uma medida mitigadora de curto prazo, embora envolva riscos relativos à eficiência do programa quanto aos seus resultados, à preservação do *pool* genético e à possibilidade de introdução de doenças, além de outros aspectos ecológicos e econômicos. No rio São Francisco, esta prática vem sendo realizada há mais de duas décadas com algumas espécies de peixes. No entanto, não existem relatos quantitativos de sua eficiência. *Prochilodus argenteus*, conhecido popularmente como curimatã-pacu, constitui uma espécie de relevante valor econômico para a bacia do São Francisco, representando cerca de 50% de toda produção de pescado. O presente trabalho teve como objetivo traçar o perfil genético de uma população de cultivo de *Prochilodus argenteus*, visando identificar a variabilidade genética deste estoque. Foram utilizados 13 *loci* de microssatélites previamente descritos na literatura e seus dados foram comparados com os de população selvagem de trabalhos anteriores. Testes feitos com os programas Microchecker, Genepop e Fstat detectaram baixa homozigose, redução da variabilidade alélica quando comparada a estoques naturais, um número aumentado de heterozigotos quando comparado com o esperado e coeficiente de endogamia negativo, tais dados apontam para um possível efeito gargalo (*bottleneck*) recente na população cultivada. Testes feitos com o programa Bottleneck confirmaram essa hipótese. Resultado de tais teste se tornaram muito expressivos, quando o mesmo teste foi feito com dados de uma população selvagem para parâmetros de comparação. Os dados obtidos no presente trabalho demonstram que programas de manejo e cultivo do *Prochilodus argenteus* necessitam de um conhecimento do perfil genético da população (de cultivo ou selvagem), para que não haja introgressão deletéria na população selvagem com seu posterior declínio. Discussões sobre recuperação de ambientes aquáticos mostram que ações integradas são necessárias para que de fato se tenha uma efetiva recuperação desses ambientes. Dados genéticos poderão subsidiar e viabilizar programas de peixamentos mais eficientes e, assim, contribuir com estudos relacionados ao manejo de pesca, piscicultura e conservação biológica deste peixe.

**Palavras-chave:** microssatélite, *Prochilodus argenteus*, peixamento, conservação, população cultivada,

## ABSTRACT

Introduction of hatchery fish in river has been the major using strategy for river fishery rehabilitation, working to attenuate river damage in short time. But there are effective risks about their efficiency and results, concerning the pool gene preservation and illness proliferation, beyond others ecologies and economics aspects. At São Francisco river, during two decades it was used this kind of procedure with some species of fish, but there are no quantitative data about their efficiency. *Prochilodus argenteus*, popular known as Curimatá-pacu, is pointed as the most important economic specie at São Francisco basin, responsible for 50% of all fishery production. Therefore, this project goals to trace the genetic profile of a *Prochilodus argenteus* hatchery population, looking for identify stock genetic variability through 13 SSR *loci* previous described, and to compare theses data with others described in literature from wild stocks. Tests made with Microchecker, Genepop, and Fsat softwares detected low homozygosis; reduced allelic variability when compared with wild population; increase in heterozygosis when compared with expected; and negative inbreed coefficient, these data got a trace for bottleneck phenomena in a cultured population, and Bottleneck software tests confirm this hypothesis. When the same test was ruled with wild population data results very far from those found in hatchery populations, give a high reliability. To conclude, at cultured and/or management programs are necessary the knowledge of genetic profile population (hatchery or wild) to prevent damaging introgression in wild population and consequently extinction. These data can be used to made fishery river rehabilitation program more efficient, and so, adding with information to fish procreation, industrial fishery and biologic fish conservation studies.

**Key words:** SSR, *Prochilodus argenteus*, fishery programs, conservation, hatchery population,

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE <i>Prochilodus argenteus</i></b>	<b>10</b>
<b>1.2 ASPECTOS DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO</b>	<b>11</b>
<b>1.3 IMPACTO DAS HIDRELÉTRICAS</b>	<b>13</b>
<b>1.4 REPOVOAMENTO DE RIOS</b>	<b>15</b>
<b>1.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES: DEFINIÇÃO E APLICAÇÕES</b>	<b>17</b>
<b>1.6 ESTUDOS GENÉTICOS EM PEIXES</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
<b>3.1 MATERIAL</b>	<b>22</b>
3.1.1 ESPÉCIE ESTUDADA	22
<b>3.2 MÉTODOS</b>	<b>23</b>
3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDOS SÓLIDOS UTILIZANDO TAMPÃO SALINO (ALJANABI & MARTINEZ, 1997)	23
3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA	24
3.2.3 AMPLIFICAÇÃO DOS LOCI DE MICROSSATÉLITES	24
3.2.4 VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS	26
3.2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	27
3.2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS	28
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>36</b>
<b>6. CONCLUSÕES</b>	<b>42</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>42</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS BIOLÓGICOS DE *Prochilodus argenteus*

Prochilodontidae é uma família de peixes Actinopterygios pertencentes à ordem Characiformes que têm como principal característica sua alta estruturação labial, de dentes e maxilar. São rapidamente distinguíveis morfologicamente do resto da ictiofauna neotropical e, em suma, de todos os outros peixes (MENIN & MIMURA, 1991). Com exceção da larva, os prochilodontídeos têm um lábio carnudo marcante, equipado com duas séries de dentes numerosos, relativamente pequenos, falciformes ou espatulados, anexados com mobilidade aos lábios, mais especificamente ao osso da mandíbula (MENIN & MIMURA, 1991). Essa mandíbula projetada e esses lábios distintos formam um disco oral contornado por um anel de pequenos dentes. A estruturação dos lábios, dentes e mandíbula observada nesta espécie de peixe é convergente com suas pronunciadas modificações de múltiplos componentes de brânquias e músculo mandibular (MENIN & MIMURA, 1991; CASTRO & VARI, 2004). Similarmente, o trato digestivo apresenta especializações do estômago, ceco pilórico e intestinos, tendo que esses dois últimos sistemas são mais visivelmente elaborados e alongados (MENIN & MIMURA, 1991, CASTRO & VARI, 2004). Essas modificações permitem eficiência no processo de obter sua alimentação primária, detritívora. A família compreende 21 espécies distribuídas em três gêneros: *Ichthyelephas* (duas espécies), *Semaprochilodus* (seis espécies) e *Prochilodus* (13 espécies) (CASTRO & VARI, 2004). Dentre os prochilodontídeos, o gênero *Prochilodus* sp. tem uma grande relevância, já que são os peixes de água doce mais conspícuos, abundantes e largamente distribuídos, vivendo nos rios da América do Sul que deságuam no Oceano Atlântico. Eles são os maiores migradores detritívoros que suprem importantes contingentes de pescas em muitas partes do continente (WELCOMME, 1979; SIVASUNDAR *et al.*, 2000; CASTRO & VARI, 2004).

Esses peixes tipicamente fazem migrações de longas distâncias rio acima antes do início da estação chuvosa. Durante o ciclo anual, os *Prochilodus* nadam centenas de quilômetros pelo rio, das áreas de inundação onde se alimentam ou de regiões mais baixas para áreas de desova, perto das cabeceiras (SIVASUNDAR *et al.*, 2000). Na bacia do Paraná, a espécie *P. lineatus* é responsável por mais de 50-90% do total da ictiomassa na parte baixa do rio e nas lagoas de inundação (BONETTO, 1986; CORDIVIOLA DE YUAN, 1992; SIVASUNDAR *et al.*, 2000).

Especificamente, o *Prochilodus argenteus* (AGASSIZ, 1829), classificado anteriormente como *P. marggravii* (WALBAUM, 1792), se destaca por ser a espécie de piracema mais abundante na região de Três Marias (MG), representando cerca de 50% de toda produção de pescado. Essa espécie, principalmente, tem grande relevância quando se leva em consideração a alta degradação dos ambientes aquáticos. Ela é endêmica na bacia do São Francisco, possui o maior porte da família e pode atingir até 15 kg de peso corporal. Tem hábito alimentar iliófago, desova total, período reprodutivo estendendo-se de novembro a janeiro na estação chuvosa, coincidindo com a época de cheias, altas temperaturas e longos fotoperíodos (GODINHO & GODINHO, 2003; SATO *et al.*, 2005).

## 1.2 ASPECTOS DA BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO

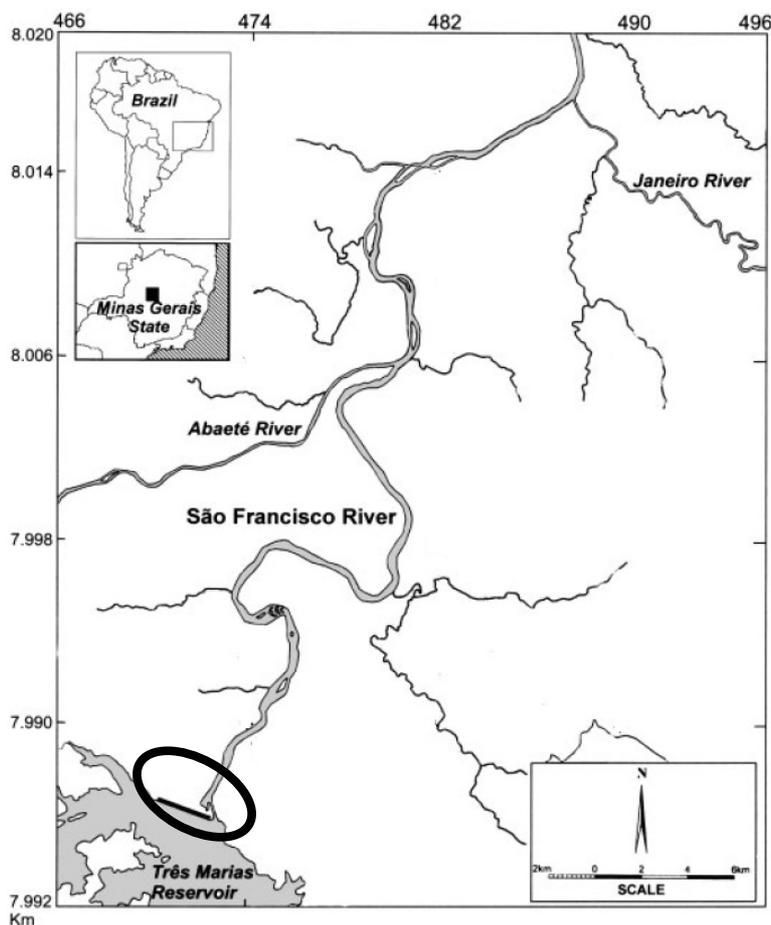
Quando se trata da necessidade de preservação da fauna de água doce do Brasil, a bacia do rio São Francisco toma uma posição de destaque, localizada entre 21°00' e 7°00' de latitude e com altitude de mais de 1.600 m acima do nível do mar. Esta bacia abrange condições diversas de clima: a média anual de temperatura do ar é de 18 a 27° C, a taxa de evaporação relativa alta de 2.300 a 3.000 mm/ano, 2.400 a 3.300 horas de luz/ano, um domínio ecológico variando de Mata Atlântica para Cerrado e Caatinga, e clima variando de tropical úmido para semi-árido. A bacia do São Francisco cobre uma área de 631.133 km<sup>2</sup>, ou 7,4% do território do Brasil. Com nascentes na Serra da Canastra, na parte mais sul dos Estados de Minas Gerais e Bahia, vira para leste correndo 400 quilômetros entre os Estados da Bahia, Pernambuco, Sergipe e Alagoas para desaguar no Oceano Atlântico (SATO & GODINHO, 2004).

Considerando as espécies migratórias da bacia do rio São Francisco, excluindo as espécies diádromas (aquelas que migram entre o mar e a água doce), são registradas cerca de 158 espécies de peixes de água doce para a bacia (ALVES & POMPEU, 2001; SATO & GODINHO, 1999; BRITSKI *et al.*, 1988), mas novas espécies têm sido descritas com frequência. Sete espécies, todas importantes para a pesca, foram consideradas por Sato *et al.* (2003) como provavelmente migradoras de longa distância: curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*), curimatá-piôa (*Prochilodus costatus*), dourado (*Salminus brasiliensis*), matrinhã (*Brycon orthotaenia*=*Brycon lundii*), piau-verdadeiro (*Leporinus obtusidens*), pirá (*Conorhynchus conirostris*) e surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) (GODINHO & GODINHO, 2003).

Vindo da premissa que as nascentes dos rios são áreas prioritárias no que concerne preservação, independente do seu estado de conservação. Godinho & Godinho (2003), descrevem condições de outros trechos da bacia do rio São Francisco e sugerem, que a fauna de peixes migradores sanfranciscanos apresenta diferentes *status* de conservação ao longo dessa bacia. Assim, ela está relativamente estável no segmento que se estende da foz do rio Abaeté à entrada da represa de Sobradinho, incluindo os rios Urucuia, Carinhanha, Corrente e Grande. Ela se encontra vulnerável no trecho do rio São Francisco à montante da represa de Três Marias e nos rios Abaeté, Paracatu e Pandeiros. A ictiofauna está, ainda, ameaçada nos rios Pará, Paraopeba, das Velhas, Verde Grande e no baixo São Francisco, à jusante da barragem de Xingó. Seu *status* de conservação é crítico na represa de Três Marias e no segmento do rio limitado pelas represas de Sobradinho e Xingó.

Na calha principal do rio São Francisco, existe a represa de Três Marias (Figura 1) construída em 1961 com o propósito de regular as inundações, cheias e geração de energia elétrica, com capacidade de 21 a 109 m<sup>3</sup> de água, inundando uma área de aproximadamente 100.000 ha (BRITSKI *et al.*, 1988). A região à jusante dessa represa conjuntamente com os baixos cursos dos principais afluentes desse trecho, foram considerados como áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade do Estado de Minas Gerais devido à riqueza da ictiofauna, à presença de espécies de peixes endêmicas, à reprodução de peixes de piracema e/ou por ser ambiente único no Estado (COSTA *et al.*, 1998). As principais recomendações para essas áreas foram: manejo das descargas da represa de Três Marias, manutenção do regime de cheias, manutenção do trecho lótico, criação de unidade de conservação, manejo dos recursos pesqueiros e recuperação da qualidade da água. Outros trechos da porção mineira da bacia também foram indicados como áreas prioritárias, tais como os rios Paraopeba e Cipó (GODINHO & GODINHO, 2003).

### 1.3 IMPACTO DAS HIDRELÉTRICAS



**Figura 1.** Bacia do Rio São Francisco, destaque para represa de Três Maria (figura retirada de Sato *et al.*, 2005).

As barragens hidrelétricas produzem um forte impacto negativo na pesca, e segundo Godinho & Godinho (1994), estão entre as principais causas do declínio da pesca em rios de muitos países. A regularização do regime hidrológico de um rio por meio de barragens é geralmente reconhecida como uma das formas mais devastadoras de degradação do habitat de águas interiores.

A construção de barragens pode modificar o regime hidrológico natural e a qualidade da água, de modo a afetar negativamente as condições de jusante. Mudanças ocorrem nos *habitats* de desova, em áreas de abrigo e nos gatilhos do ciclo de vida (PETTS, 1989). Em peixes neotropicais, a piracema (migração rio acima para desova) é disparada pelo princípio de chuvas e temperaturas elevadas e o sucesso reprodutivo é associado com esses fatores (LOWE-MCCONNELL, 1987; PARKINSON *et al.*, 1999; SATO *et al.*, 2005).

Construções de barragem geram a interrupção da subida da piracema por se tornar um obstáculo intransponível, além de um ambiente que proporciona o fenômeno (devido à modificação da temperatura e regime de cheias) chamado de atresia folicular. Esse fenômeno se caracteriza pela reabsorção do ovócito em qualquer fase de desenvolvimento, mais comumente após a ovulação (SHANBHAG & SAIDAPUR, 1996; SATO *et al.*; 2005). Esse fenômeno se dá pelo comprometimento da migração dos peixes, que não permite a metabolização da gordura acumulada no esforço da subida o rio produzindo ácido láctico. Sendo que o aumento do nível do ácido láctico na corrente sanguínea do animal atua no estímulo das glândulas inter-renal e hipófise, que são responsáveis pela elaboração dos hormônios gônada estimulantes, que permitem o desenvolvimento das gônadas e conseqüentemente maturação dos gametas e estímulo final da desova. Além disso, o segmento à jusante torna-se regulável de acordo com as necessidades de geração de energia hidrelétrica, atenuando as grandes cheias. Várzeas, antes alagáveis, deixam de receber água, comprometendo o seu papel de berçários de jovens de peixes migradores. A instalação de um regime hidrológico favorável é, portanto, uma importante forma de restauração do habitat (SWALES, 1994). Além disso, as barragens constituem uma barreira intransponível na rota migratória dos peixes de piracema, que são os mais valiosos do ponto de vista pesqueiro, reduzindo seu sucesso reprodutivo. A nova situação no segmento à montante da barragem também é dramática para a pesca. Todavia, seus efeitos dependem da posição geográfica da barragem na bacia hidrográfica (GODINHO & GODINHO, 2003).

Tem sido constatado que as espécies reofílicas não se reproduzem em cativeiro, pois não encontram as condições ambientais adequadas para fazê-lo, e por esta razão é indispensável induzir o processo aplicando as técnicas convencionais de indução hormonal (ZANIBONI-FILHO & NUÑER, 2004). Diante desse fato, pode-se inferir a relevância das corredeiras para a efetiva reprodução desse animal e como o confinamento de grandes extensões de água por barragens hidrelétrica tem um impacto altamente danoso na densidade populacional dos mesmos.

Visando analisar o impacto que a construção da barragem de Três Marias (e outras alterações ambientais como o desmatamento intensivo) promove sobre a ictiofauna local, estoques de *B. orthotaenea* e *Prochilodus argenteus*, dois dos mais importantes peixes comerciais migratórios que ocorrem na bacia do rio São Francisco, foram estudados. Assim, se observa que muitos espécimes dessas duas espécies coletadas na região à jusante da barragem de Três Marias, no sistema do Médio São Francisco, têm diminuído de tamanho e

têm apresentado gônadas imaturas na estação de desova, o que pode estar relacionado com atresia folicular, descrita anteriormente, provida provavelmente das condições ambientais menos favoráveis para sua reprodução. Uma condição distinta tem sido observada a 30 km depois da jusante da barragem em um ambiente menos perturbado, onde esses animais geralmente têm tamanho normal e gônadas desenvolvidas (SATO *et al.*, 2005).

Sendo evidente a degradação dos ambientes aquáticos naturais, medidas preventivas devem ser tomadas enquanto o banco genético *in situ* da população considerada ainda não sofreu grandes impactos. Grandes ou irreversíveis alterações ambientais conduzem para uma perspectiva de manejo em cativeiro de espécies de peixes afetadas. Neste caso, é necessário selecionar indivíduos que representem a diversidade genética em populações naturais de maneira a habilitar uma futura estabilização da flutuação genética entre estoques em cativeiro e populações naturais (RYDER, 1986; SEAL, 1988; WASKO *et al.*, 2004). Por isso, a correta seleção de estoques que serão usados para esse propósito é de suma importância (WASKO *et al.*, 2004).

#### **1.4 REPOVOAMENTO DE RIOS**

O repovoamento é uma das estratégias mais usadas para a reabilitação pesqueira, embora envolva riscos relativos à eficiência do programa quanto aos seus resultados, à preservação do *pool* genético e à possibilidade de introdução de doenças, além de outros aspectos ecológicos e econômicos (HICKLEY, 1994). Quando empregado isoladamente, atua como medida mitigadora de curto prazo e não atinge as causas da debilitação da pesca (COWX, 1994). No entanto, segundo Godinho & Godinho (2003), não existem dúvidas de que o repovoamento tornar-se-á cada vez mais importante como ferramenta para o manejo de rios, para a manutenção de estoques altamente explorados ou de espécies que, de outra forma, se extinguiriam. As três principais recomendações para o uso de repovoamento são: manter a produção face à exploração intensiva, mitigar ou compensar impactos negativos e aumentar a produção de um dos componentes do sistema aquático (WELCOMME, 1989).

SATO & GODINHO (2004) relatam que, desde 1983, cerca de sete milhões de alevinos de *Prochilodus argenteus*, *Prochilodus costatus*, *Leporinus elongatus*, *Brycon orthotaenia*, *Salminus brasiliensis* e *Pseudoplatystoma corruscans* têm sido produzidos e soltos na região à montante da barragem de Três Marias pela Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco (CODEVASF). Só no ano de 2005, foram liberados 500 mil

alevinos dessas espécies naquela região. Embora isso já venha sendo feito há mais de duas décadas, não existem relatos quantitativos de sua eficiência. Contudo, há indicações de que as populações de *B. orthotaenia*, que estavam praticamente extintas localmente, têm repovoado essa região vagarosamente desde o início da reintrodução em 1988. Além disso, *P. argenteus*, *L. elongatus* e *P. costatus*, que eram raros nas capturas naquela região, também têm aumentado em abundância desde os anos 80 (SATO & GODINHO, 2004; COSTA *et al.*, 2006).

Empresas do Setor Elétrico têm realizado diversos programas de repovoamento dos reservatórios, com diferentes espécies de peixes. As informações científicas sobre esse assunto são escassas e os programas têm sido executados sem o necessário conhecimento dos aspectos ecológicos do ambiente, da ictiofauna, dos aspectos relacionados à pesca, etc. Em geral, não são realizados programas de monitoramento que permitam avaliar a eficiência da ação. Quando realizados, evidenciam que os repovoamentos não têm sido satisfatórios, com raras exceções. As espécies utilizadas nos peixamentos contínuos que vem sendo realizados nos reservatórios não desenvolveram populações auto-sustentáveis. Dessa forma, os repovoamentos têm gerado poucos benefícios para a conservação da biodiversidade ou para a produção pesqueira nos reservatórios e rios, em níveis sustentáveis (M.M.E, 2007).

Um possível motivo para esse insucesso deriva do fato de que um dos principais propósitos dos programas de manejo e conservação de espécies ameaçadas é a manutenção de variação gênica. Assim, a variação genética presente em populações naturais deve ser identificada para ser acessada em programas de conservação. Adicionalmente, para o efetivo sucesso de um programa de conservação e comprovar sua eficácia, é necessário estimar o nível de variação genética em estoques de cativeiro e compará-lo com a variação genética observada em populações naturais (WASKO *et al.*, 2004). Um ponto crítico relevante extensivamente pesquisado é a questão da estruturação de populações selvagens que pode tornar o manejo de peixamento mais difícil de ser realizado (WASKO & GALETTI, 2002; HATANAKA & GALETTI, 2003; HATANAKA *et al.*, 2006; SANCHES & GALETTI, 2007).

Experiências anteriores com peixamentos em que fluxos gênicos advindos de peixes domesticados para as populações selvagens, providas do escape de populações confinadas em aquicultura de plantas ou de estoques deliberadamente isolados, mostraram-se problemáticos, sendo que essa situação não recebeu uma considerável atenção na área da biologia da conservação (HINDAR *et al.*, 1991). Numerosos estudos têm objetivado estimar

os efeitos da introdução de peixes domesticados em populações selvagens (CHILCOTE *et al.*, 1986; LARGIADÈR & SCHOLL, 1996; POTEAUX *et al.*, 1999; HANSEN *et al.*, 2000; HANSEN *et al.*, 2001).

Atualmente, muitos estudos têm utilizado marcadores moleculares no diagnóstico destes problemas. Marcadores microssatélites podem ser particularmente úteis para gerar informações relevantes para a manutenção de populações viáveis e auto-sustentáveis.

### **1.5 MARCADORES MICROSSATÉLITES: DEFINIÇÃO E APLICAÇÕES**

O declínio e a extinção de algumas espécies de peixe têm chamado a atenção de agências governamentais e de cientistas, no intento de restaurar ambientes degradados, conduzindo pesquisas na área da ecologia e programas de desenvolvimento de propagação, perpetuação e reintrodução de espécies. Entretanto, até o presente momento, os estudos de conservação usando marcadores moleculares estão bastante restritos a fauna de peixes da América do Norte e Europa (FERGUSON & DANZMANN, 1998; VRIJENHOEK, 1998). Porém análises deste tipo em peixes neotropicais estão apenas começando, tendendo a crescer com a rotineira aplicação de técnicas moleculares. O ganho de informações biológicas e de variação genética de espécies de peixes, conjuntamente com dados ecológicos e demográficos pode ser altamente importante para o desenvolvimento de estratégias eficientes de conservação (WASKO *et al.*, 2004).

As ferramentas moleculares são os mais modernos e efetivos recursos que têm possibilitado análises genéticas em larga escala, se tornando de uso rotineiro em muitos laboratórios ao redor do mundo (POKE *et al.*, 2005). Os marcadores moleculares incluem microssatélites ou sequências simples repetitivas (*Simple Sequence Repeats*, SSR) (LITT & LUTTY, 1989), polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (*Random Amplification of Polymorphic DNA*, RAPD) (WELSH & MCCLELLAND, 1990; WILLIAMS *et al.*, 1990), polimorfismo de tamanho de fragmentos amplificados (*Amplified Fragment Length Polymorphism*, AFLP) (VOS *et al.*, 1995), polimorfismo de tamanho em fragmentos de restrição (*Restriction Fragment Length Polymorphism*, RFLP) (GRODZICKER *et al.*, 1974) e DNA mitocondrial (mtDNA), onde se amplifica *loci* do DNA mitocondrial em estudos de diferenciação de haplótipos, coalescência e resolução de questões de filogenia.

Os microssatélites consistem de arranjos repetitivos de dois a seis pares de base (pb) dispostos em *tandem*. Estes arranjos são amplamente distribuídos através de todo o

genoma e formam grupos de até  $10^2$  pb em comprimento, os quais podem variar entre diferentes espécies e até mesmo entre os indivíduos (CHAMBERS & MACAVOY, 2000). Apresenta uma alta taxa de mutação ( $10^{-3}$ ), explicada principalmente pelo deslizamento ou *slippage* durante a replicação, e/ou pelo *crossing-over* desigual (SMITH *et al.*, 1986; LEVINSON & GUTMAN, 1987). Alguns termos são comumente usados para designar microssatélites: SSR, repetições curtas em *tandem* (*Short tandem repeats*, STR), polimorfismo de tamanho em sequência simples (*Simple sequence length polymorphism*, SSLP) e repetições em *tandem* de números variáveis (*Variable number of tandem repeats*, VNTR) (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004) sendo que esta última tem sido mais recentemente usada em seguimentos de minissatélites.

Os microssatélites estão presentes tanto em regiões não codificadoras, bem como nas codificadoras, sua frequência é alta em regiões transcritas (RAKOCZY-TROJANOWSKA & BOLIBOK, 2004) e grande proporção do genoma de organismos eucariotos é composta de sequências repetitivas de DNA, porém, estas proporções são variáveis (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1996). Em estudos populacionais, os microssatélites são de grande relevância, já que são tipicamente codominantes e multialélicos, permitindo uma precisa identificação até mesmo em indivíduos intimamente relacionados (KIRSTI *et al.*, 2005; DEWOODY & AVISE, 2000; O'REILLY & WRIGHT, 1995). Essa alta precisão advém do fato de que os fragmentos de microssatélites são amplificados por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) utilizando-se pequenas quantidades de DNA, que devido à alta especificidade desta reação e alta informação contida, estes marcadores permitem também a determinação da identidade baseada em estimativas formais derivadas de frequências alélicas (KIRSTI *et al.* 2005) como é caso de testes de paternidades. Uma das maiores dificuldades que pode comprometer o uso de tais marcadores é o tempo, trabalho e dinheiro despendidos com métodos de isolamento dessas sequências repetitivas e suas respectivas regiões flangeadoras (O'CONNELL & WRIGHT, 1997).

Por isso, dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis, os microssatélites estão entre os mais utilizados (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002) principalmente em peixes (TAUTZ, 1989; PIORSKI *et al.*, 2008), análises de microssatélites têm sido muito eficientes para analisar subestruturação populacional (SIVASUNDAR *et al.*, 2001; WASKO & GALETTI 2002; HATANAKA & GALETTI, 2003; HATANAKA *et al.*, 2006; SANCHES & GALETTI, 2007; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008); avaliar a diversidade genética de populações naturais e cultivadas de *Brycon opalinus* (BARROSO *et*

*al.*, 2005); comparar composição genética de amostras recente e antiga (NIELSEN *et al.*, 1997); além de serem bastante utilizados em estudos de mapeamento genético (KNAPIK *et al.*, 1998; SHIMODA *et al.*, 1999; GILBEY *et al.*, 2004; OHARA *et al.*, 2005).

## 1.6 ESTUDOS GENÉTICOS EM PEIXES

Um dos principais objetivos da utilização de marcadores genéticos em piscicultura é determinar se as amostras de cultivos ou populações naturais são geneticamente diferenciadas umas das outras, visando à detecção de diferentes estoques (CARVALHO & HAUSER, 1994), pois em caso de diferenciação, esses estoques devem ser tratados como unidades de manejo separadas (MORITZ, 1994). Manejo de populações naturais é baseado na ideia que estoques têm seus padrões próprios de recrutamento e mortalidade, e reagem a predação e exploração independentemente (CARVALHO & HAUSER, 1994). Um modo comum em análises genéticas de diagnosticar diferentes estoques baseados na diferenciação genética, tem sido realizado através de estudos de variabilidade genética, detecção de alelos privados ou haplótipos por mtDNA (ROFF & BENTZEN 1989; ZAYKIN & PUDOVKIN, 1993; DANZMANN & IHSEN, 1995, FERGUSON *et al.* 1995).

Entender os diferentes padrões genéticos em diferentes estoques e conseqüentemente tratá-los de forma diferenciada é fruto direto do conceito unidade reprodutiva (ESU – *Evolutionary Significant Unity*) que segundo WAPLES (1995) pode ser definida como uma população ou um grupo de populações que está reprodutivamente isolada de outras unidades populacionais relacionadas. Além disso, a ESU representa um importante componente no legado evolutivo da espécie (WAPLES, 1995). Comparações de diferentes populações de mesma espécie têm mostrado que populações naturais podem encontrar-se geneticamente estruturadas, ou seja, constituem sub-populações com composição genética definida, e que estão adaptadas e equilibradas a determinadas condições ambientais (FORESTI *et al.*, 1992; PANARARI, 2006; WASKO & GALETTI 2002, HATANAKA & GALETTI, 2003; HATANAKA *et al.*, 2006; SANCHES & GALETTI, 2007). Essa biodiversidade genética detectada nos peixes tropicais não se encontra espalhada ao acaso dentro da área geográfica onde vive historicamente uma determinada espécie, mas está contida nos chamados Bancos Genéticos Selvagens (SMITH & WAYNE, 1996; TOLEDO-FILHO *et al.*, 1999). O conhecimento e a manutenção da integridade genética de subunidades populacionais ou populações locais são aspectos fundamentais em programas de preservação e manejo da espécie (PANARARI, 2006; PIORSKI *et al.*, 2008).

Constata-se que a ocorrência de maior polimorfismo genético em populações naturais é esperada, posto que normalmente os cruzamentos ocorram ao acaso e a possibilidade de consanguinidade é menor. No entanto, alguns fatores podem levar a um declínio da diversidade genética. Entre eles, incluem-se a deterioração dos ambientes aquáticos por poluição, assoreamento e barramento de rios, pesca predatória e introdução de espécies exóticas (BRUTON, 1995). Além disso, a captura intensiva de populações naturais ou estabelecimento de programas de peixamento em larga escala com populações produzidas em centrais de produção de alevinos por muitas gerações pode alterar a estrutura genética da espécie. Já que esses fatores podem gerar rápida diminuição da população e/ou do tamanho efetivo da mesma.

Para que esta alteração não ocorra, ou ainda, torne-se minimizada, é importante que os reprodutores utilizados nos cruzamentos para produção de alevinos, com finalidade de repovoamento, sejam representantes da variabilidade genética presente no ambiente natural (PANARARI, 2006). A variabilidade genética pode ser reduzida em uma população recentemente introduzida, e está relacionada a eventos, tais como o efeito de gargalo de garrafa (*bottleneck*) onde uma população é reduzida drasticamente, ou devido ao baixo número de colonizadores iniciais (efeito fundador), que torna expressiva a deriva genética. Este efeito será mais forte quando todos os colonizadores são derivados de uma mesma população. Sendo assim, a nova população estabelecida provavelmente será menos diversa geneticamente do que a população que a originou (SAKAI *et al.*, 2001). Deve-se ressaltar que existe uma diferença entre *bottleneck* e efeito fundador, já que *bottleneck* se refere a diminuição de uma população pré-existente a um número reduzido de indivíduos. Já o efeito fundador é quando inicia-se uma população com um número reduzido de indivíduos. Do ponto de vista estatístico, o que é de fato relevante, é se os fundadores da população ou os indivíduos restantes de uma população que sofreu a redução por *bottleneck*, são ou não aparentados, já que isso pode gerar ou não uma alta heterozigosidade inicial. No caso desse texto por mera convenção, nomearemos como *bottleneck* recente, a gerações advindas de poucos progenitores não aparentados que conseqüentemente tendem a ter uma heterozigosidade alta inicial.

Fenômenos como *bootleneck* e efeito fundador, levam ao aumento da endogamia que leva a um aumento da homozigose, possibilitando que alelos deletérios raros e detrimenais tenham maior chance de se expressarem, o que afeta o crescimento, o desempenho reprodutivo, o aumento de anormalidades e de mortalidade (HANSSON &

WESTERBERG, 2002; POVH *et al.*, 2005; PANARARI, 2006) tendo que isso é o cerne do problema quando se fala em populações depredadas.

Trabalhos analisando populações de piscicultura (*e.g.* PANARARI, 2006), constataram alto grau de similaridade genética. Este fato pode estar relacionado a fatores como o uso de poucos peixes reprodutores, o emprego de estratégias de reprodução inapropriadas, deriva genética e cruzamentos consanguíneos (WASKO *et al.* 2004). Resultados de estudos comparativos populacionais de cultivo e naturais de peixes como os obtidos por Chilcote (2003), sugerem que há uma associação significativa entre a produtividade da população e a proporção média de peixes selvagens inserido na população de matrizes. Populações de truta (*Oncorhynchus mykiss*) com altas frequências de peixes selvagens tendem ser mais produtivas que aquelas com uma baixa frequência de peixes selvagens (mais peixes de cultivo).

Apenas recentemente um grande número de espécies de vertebrados tem sido apontado em situação de risco ou até mesmo de extinção. O ecossistema aquático representa um dos ambientes mais afetados quanto à redução/extinção de muitas espécies ou de populações de peixes. Algumas causas têm sido relatadas, tais como: a degradação dos *habitats* e de pesca predatória, introdução de espécies exóticas, sedimentação de rios, desmatamento, poluição, redução de recursos para alimentação e construção de barragens hidrelétricas (WASKO *et al.*, 2004, PIORSKI *et al.*, 2008).

Estudos das populações naturais de peixes viabilizam a seleção de indivíduos com variado grau de diversidade, que nestes casos, seriam utilizados como reprodutores em programas de repovoamento da espécie, introduzindo as gerações obtidas em locais onde elas se encontram ameaçadas ou extintas. E assim, para que o novo estabelecimento seja bem sucedido, a diversidade genética das populações naturais deve ser mantida nas populações produzidas em estações de piscicultura. Em locais onde a pressão de pesca é maior, este procedimento ainda se torna mais relevante, porque através do uso de um número adequado de matrizes, os indivíduos capturados podem ser repostos no ambiente pelas gerações obtidas em instalações de piscicultura, sem perda da sua diversidade genética (PANARARI, 2006).

Realizada uma cuidadosa seleção de estoques naturais apropriados, baseada em critérios genéticos, pode-se oferecer um grande potencial de sucesso na recuperação de espécies e manutenção de programas de conservação (QUATTRO & VRIJENHOEK, 1989). Estudos que se fundamentam no DNA de animais em recuperação são os mais interessantes

por gerar informações a respeito da diversidade, da conservação biológica e permitir análises populacionais (O'BRIEN, 1994; AVISE, 1996; SNOW & PARKER, 1998).

Desta forma, considerando o repovoamento de rios que são realizados na região à montante da barragem de Três Marias desde 1983 com alevinos cultivados de *P. argenteus*, o presente estudo visou comparar dados de variabilidade genética de um estoque de alevinos cultivados em um cruzamento F<sub>1</sub> com dados produzidos na literatura sobre populações naturais, já que não existem relatos quantitativos da eficiência desta prática no rio São Francisco.

## **2. OBJETIVOS**

Considerando o repovoamento periódico realizado pela CODEVASF com a espécie *Prochilodus argenteus*, em que milhares de alevinos são constantemente liberados no rio São Francisco, e a significativa importância econômica que esta espécie representa para a pesca artesanal e profissional desta bacia, o presente projeto possuiu como objetivos:

- 1) analisar exemplares da progênie F<sub>1</sub> de *P. argenteus* provenientes de um cruzamento realizado pela CODEVASF, visando identificar a variabilidade genética deste estoque através de microssatélites previamente descritos;
- 2) comparar estes dados com os descritos na literatura, de estoques naturais, e assim, contribuir com estudos relacionados ao manejo de pesca, piscicultura e conservação biológica deste grupo de peixes.

## **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1 MATERIAL**

#### **3.1.1 ESPÉCIE ESTUDADA**

No presente trabalho foi analisada a espécie *Prochilodus argenteus* (Figura 2). O desenvolvimento do cruzamento para a obtenção da geração F<sub>1</sub> foi realizado em colaboração com o pesquisador Dr. Yoshimi Sato da CODEVASF. Para o cruzamento, realizado em dezembro de 2005, foi coletado um macho procedente da região à jusante da confluência dos rios São Francisco e Abaeté, e uma fêmea da região imediatamente abaixo da barragem de Três Marias. Após a reprodução induzida, os alevinos foram transportados para tanques (Figura 3) de 600 m<sup>2</sup>, onde permaneceram por três meses, em uma proporção de 200 larvas/m<sup>2</sup>. Passado este tempo, cerca de 500-600 alevinos foram mantidos em tanques de 200 m<sup>2</sup>, por um período aproximado de nove meses. Aproximadamente 300 indivíduos foram

coletados aleatoriamente do tanque de 200 m<sup>2</sup> no mês de setembro de 2006, sendo então medidos, pesados e sacrificados para a retirada dos tecidos, tais como fígado, músculo e nadadeira caudal. Estes tecidos foram então armazenados em Etanol 100% (Baker). No presente projeto, analisou-se 93 exemplares.



**Figura 2.** Foto ilustrando um dos exemplares de *Prochilodus argenteus* da F<sub>1</sub>.



**Figura 3.** Foto ilustrando a CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco) em Três Marias (MG).

## 3.2 MÉTODOS

### 3.2.1 EXTRAÇÃO DE DNA DE TECIDOS SÓLIDOS UTILIZANDO TAMPÃO SALINO (ALJANABI & MARTINEZ, 1997)

Aproximadamente 100 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de um bastão. Foram adicionados 400 µl de tampão salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 10 mM pH=8,0 e EDTA pH=8,0 2mM). Em seguida, foram adicionados 40µl de SDS 20% (CF = 2%) e 8µl de Proteinase K 20 mg/ml (Cf = 400µg/µl). As amostras foram incubadas a

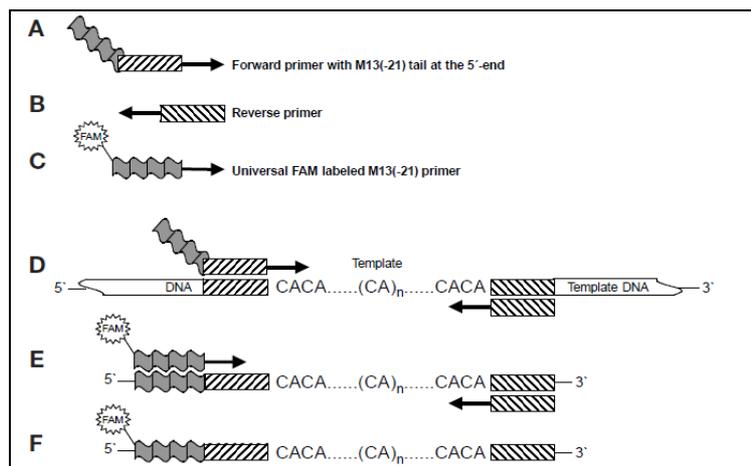
55°C por aproximadamente 3 h. Transcorrido este prazo, foram adicionados 300µl de NaCl 6M e as amostras foram agitadas por 30s a velocidade máxima e centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm em microcentrífuga. O sobrenadante foi transferido para outro tubo. Um volume igual de isopropanol foi adicionado e as amostras foram incubadas a -20°C por 1 h. As amostras foram então novamente centrifugadas por 20 min a 13.000 rpm em microcentrífuga. O *pellet* foi lavado com etanol 70%, as amostras foram secas em estufa a 37°C e o *pellet* foi ressuscitado em 200µl de TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1 mM pH 8,0).

### 3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DO DNA

A quantificação e a análise da integridade do DNA foram realizadas em gel de agarose 0,8 %, comparando-se as amostras com um marcador contendo concentrações de DNAs conhecidas (Low DNA Mass Ladder<sup>TM</sup> e High DNA Mass Ladder, Invitrogen Life Technologies®).

### 3.2.3 AMPLIFICAÇÃO DOS *LOCI* DE MICROSSATÉLITES

As amplificações dos alelos por PCR foram realizadas de acordo com o protocolo descrito por SCHUELKE (2000), denominado “*one-tube, single-reaction nested PCR method*”. É um procedimento mais econômico para fragmentos de PCR marcados com fluorescência, permitindo assim a realização da genotipagem mais rápida em sequenciador. As reações de PCR são realizadas com a utilização de três *primers*, sendo que a sequência específica do *primer forward* do *locus* a ser amplificado apresenta uma fusão em sua extremidade com uma cauda universal M13(-21) (Figura 4, A); já a sequência do *primer reverse* não contém a citada cauda (Figura 4, B). Existe, além disso, um *primer* universal M13(-21) marcado com fluorescência (Figura 4, C). De acordo com o autor, durante os primeiros ciclos o *primer forward* com a cauda M13(-21) é incorporado e acumula-se no produto de PCR, até que este seja esgotado (Figura 4, D). Então a temperatura de anelamento é reduzida para facilitar o anelamento do *primer* universal M13(-21) marcado, que assume a posição de *primer forward* e incorpora a marcação fluorescente no produto de PCR (Figura 4, E), essa fluorescência integrada na fita *forward* permite a verificação do tamanho do alelo em um sequenciador automático com uma precisão de dois nucleotídeos de diferença (Figura 4, F).



**Figura 4.** Esquema da amplificação de um fragmento com marcação com cauda M13(-21), retirado de Schuelke (2000)

As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ-Research), programado para uma desnaturação inicial de 94°C (5 min) e 30 ciclos de 94°C (30 s), 47-65° - temperatura de anelamento específica do primer - (45s) e 72°C (45 s), seguido de 8 ciclos de 94°C (30 s), 53°C (45 s) e 72°C (45 s) e uma extensão final de 72°C (10min). Em cada reação foram utilizados 0,2 mM de dNTPs, tampão de amplificação 1x, 1,5-3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2 pmoles do *primer Forward*, 8 pmoles do *primer Reverse* e 8 pmoles do *primer M13* marcado com NED, 6-FAM ou HEX, 0,5 U de *Taq DNA Polimerase* e 100 ng de DNA, completando um volume total de 10µl. Os *loci* de microssatélites que foram utilizados encontram-se na tabela abaixo (Tabela 1.).

**Tabela 1.** Descrição dos *loci* que foram utilizados com relação à unidade repetitiva dos microssatélites, amplitude da variação em pares de bases (pb), temperatura de anelamento (Ta) e números de acesso do GenBank.

<i>Locus</i>	Unidade repetitiva	Amplitude (pb)	Ta (°C)	Número de Acesso GenBank
Par10 <sup>1</sup>	(TC) <sub>11</sub>	178-208	56,0	DQ367227
Par12 <sup>1</sup>	(AAAC) <sub>7</sub>	192-232	56,0	DQ367228
Par14 <sup>1</sup>	(TGTC) <sub>5</sub>	232-278	48,0	DQ367230
Par21 <sup>1</sup>	(ATGA) <sub>6</sub>	165-193	47,2	DQ367233
Par26 <sup>1</sup>	(GA) <sub>3</sub> (CAGA) <sub>9</sub>	256-266	47,2	DQ367234
Par31 <sup>1</sup>	(GAGT) <sub>4</sub> (GA) <sub>5</sub> (GGGA) <sub>3</sub> (GA) <sub>4</sub>	267-279	56,0	DQ367235
Par35 <sup>1</sup>	(GA) <sub>3</sub> (GTGA) <sub>6</sub> (GAAA) <sub>2</sub> (GA) <sub>6</sub>	252-274	61,6	DQ367240
Par53 <sup>1</sup>	(GTT) <sub>2</sub> A(GTTT) <sub>6</sub>	164-192	48,0	DQ367238
Par66 <sup>2</sup>	(AACA) <sub>12</sub>	153-185	47,0	DQ524172
Par69 <sup>2</sup>	(TTAT) <sub>7</sub> (TCAT) <sub>6</sub>	222-256	55,6	DQ524173
Par76 <sup>2</sup>	(CAGT) <sub>16</sub>	226-242	53,4	DQ524175
Par80 <sup>2</sup>	(CT) <sub>37</sub>	221-279	51,3	DQ524176
Par82 <sup>2</sup>	(CT) <sub>27</sub>	177-209	51,3	DQ524177
Par83 <sup>2</sup>	(CACT) <sub>11</sub>	264-300	55,6	DQ524178
Par85 <sup>2</sup>	(AG) <sub>25</sub>	227-271	51,3	DQ524179
Par86 <sup>2</sup>	(GA) <sub>46</sub>	135-181	57,8	DQ524180
Par115 <sup>3</sup>	(TAGA) <sub>11</sub>	134-196	53,4	EU255784

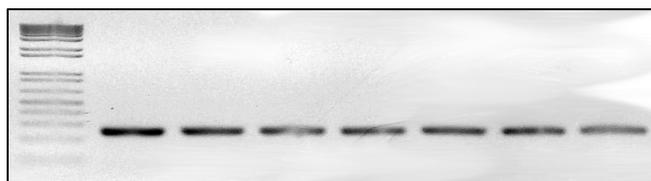
<sup>1</sup> Barbosa *et al.* (2006)

<sup>2</sup> Barbosa *et al.* (2008)

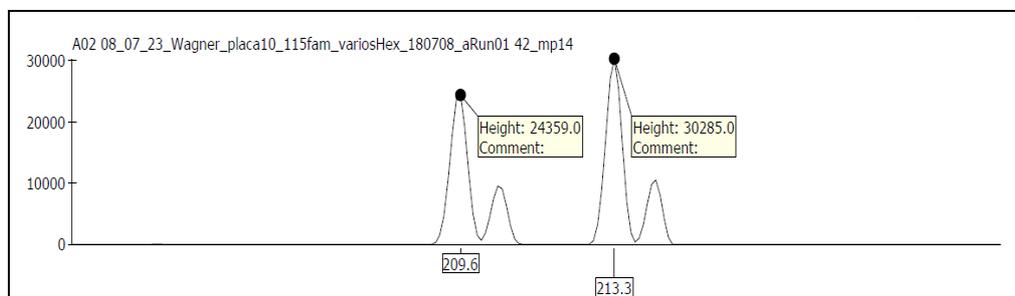
<sup>3</sup> Não publicado

### 3.2.4 VISUALIZAÇÃO DOS RESULTADOS

Após uma prévia verificação do sucesso da amplificação feita em gel de agarose 1% (Figura 5), os produtos de amplificação foram analisados em um sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare Life Sciences) com auxílio de um marcador de tamanho ET-550R (GE Healthcare Life Sciences). Os tamanhos dos alelos foram identificados através do *software* Fragment Profiler 1.2 (GE Healthcare Life Sciences) (Figura 6).



**Figura 5.** Verificação da amplificação do produto de PCR em gel de agarose 1 %, usando *ladder* 1 Kb plus (Invitrogen®).



**Figura 6.** Ilustração de um eletroferograma evidenciando os alelos do Par 14, e à esquerda, os valores indicam a intensidade da fluorescência.

### 3.2.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para análise de possíveis artefatos de genotipagem como *stutter*, *dropout* e alelos nulos foi usado o programa MICRO-CHECKER (versão 2.2.3) (OOSTERHOUT, *et al.*, 2006) com nível de significância de 0,05 (Figura7).

A variabilidade genética intrapopulacional foi analisada mediante a determinação dos níveis de heterozigosidade (ROUSSET & RAYMOND, 1995), e a diversidade gênica, que consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as frequências alélicas observadas, através do programa GENEPOP (versão 1.2) (RAYMOND & ROUSSET, 1995). O calculo do valor de P (nível de significância 0, 01572, levando em consideração Narum, 2006), e teste de desequilíbrio de ligação e o cálculo do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) (WEIR & COCKERHAM, 1984), usando o FSTAT 1.2 (GOUDET, 1995).

Teste de *bottleneck* recente foi feito pelo programa BOTTLENECK versão 5.1 (CORNUET & LUIKART, 1996), variância por T.P.M – 95%; e proporção de S.M.M. de 90%.

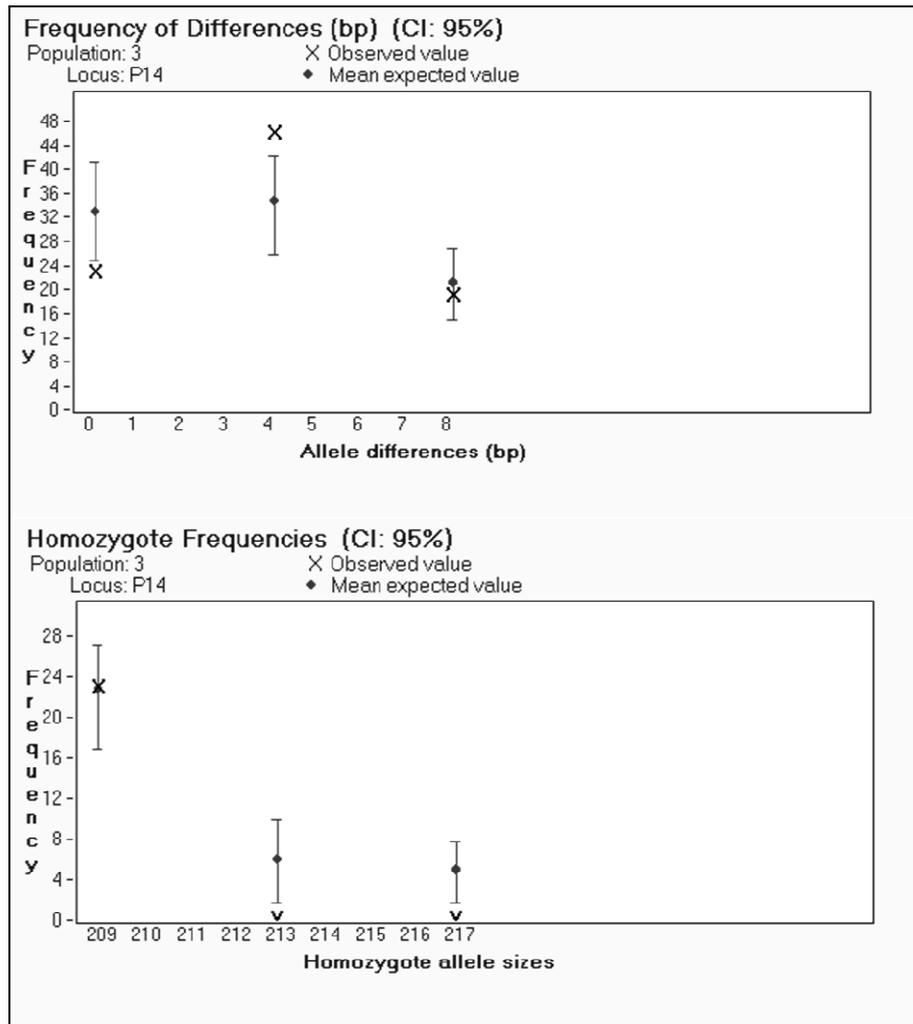


Figura 7. Ilustração do resultado do programa MICRO-CHEKER com relação ao locus Par14.

### 3.2.6 CONSIDERAÇÕES SOBRE AS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dois modelos mutacionais foram inicialmente propostos para descrever a variação. O modelo de mutação de alelos infinitos ou I.A.M. (*Infinite Allele Mutation Model*) assume que a mutação originará um novo alelo pela adição de unidades repetitivas (KIMURA & CROW, 1964). Em contraste, o modelo de mutação por passos ou S.M.M. (*Stepwise Mutation Model*) assume que a mutação ocorre pelo ganho ou perda de uma unidade repetitiva, o que significa admitir a ocorrência de homoplasia (KIMURA & OTHA, 1978). Porém, existem muitas controvérsias sobre qual modelo é o mais adequado para estudos com populações. Muito provavelmente o modo de mutação dos microssatélites seja locus específico, tendo que alguns podem estar no modelo I.A.M., e outros no S.M.M. (O'CONNELL & WRIGHT, 1997).

Em caso de *bottleneck* recente, aponta-se como principal evidência o excesso da heterozigosidade, essa característica só se apresenta em *loci* envolvidos no modelo de alelos infinitos (I.A.M.) (MARUYAMA & FUERST, 1985). Se os *loci* estiverem estritamente sob o modelo de mutação por passos (S.M.M.), então pode ser que situações de excesso de heterozigosidade não sejam observadas (CORNUET & LUIKART, 1996). Entretanto, poucos *loci* seguem estritamente o modelo de S.M.M., sendo que esses aos poucos, no decorrer do tempo, podem se enquadrar no modelo de mutação restrito para o I.A.M. e exibir um excesso de heterozigosidade como uma consequência de *bottleneck* genético. Tendo isso, resultados significativos para *bottleneck* recente em uma população analisadas usando *loci* de microssatélite com o modelo mutacional S.M.M. podem ser desconsiderados. Porém, por causa desses poucos *loci* que podem seguir estritamente S.M.M., em um primeiro momento, é recomendado o uso do modelo de mutação de duas fases ou T.P.M. (*Two-phased model*) no teste de *bottleneck*. O T.P.M. é intermediário entre o S.M.M. e o I.A.M.. Muitos dados de microssatélites são mais adequados ao T.P.M. do que ao S.M.M. ou ao I.A.M. (DI RIENZO *et al.*, 1994).

No presente trabalho, embora a análise das genotipagens tenha sido realizada com base nos genótipos dos parentais e sua progênie, foi utilizado o programa MICRO-CHECKER (OOSTERHOUT *et al.*, 2006) na tentativa de eliminar possíveis erros. Alguns artefatos técnicos de genotipagens podem resultar em análises errôneas. Os *stutters*, por exemplo, são alelos que não aparecem como banda discreta (principalmente *locus* dinucleotídeo), e sim como uma série de bandas. Isto provavelmente ocorre devido ao deslizamento ou *slippage* da *Taq* polimerase durante a PCR (SCHLOTTERER & TAUTZ, 1992; HAUGE & LIT, 1993). Já *dropout* ocorre quando alelos menores são amplificados intensamente em relação aos alelos de maior tamanho, o que poderia ser explicado pela competição entre os alelos (BANKS *et al.*, 1999). E finalmente, temos os alelos nulos resultantes da não amplificação de alguns alelos devido a substituições, inserções ou deleções no sítio de anelamento dos *primer* (CALLEN *et al.*, 1993).

O MICRO-CHECKER (OOSTERHOUT *et al.*, 2006) reamostra os alelos de cada *locus* através da simulação de Monte Carlo (*bootstrap*), criando um intervalo de confiança entre da frequência esperada de homozigotos e de heterozigotos para cada classe de tamanho de alelo. Gráficos são gerados indicando no primeiro momento as frequências de homozigotos observados e esperados para cada *locus*, no segundo diferenças em pares de bases para os genótipos heterozigotos observados e esperados, ambos a partir da reamostragem do programa. O programa apresenta também a probabilidade de encontrar um número maior ou

igual de homozigotos comparado com o observado para cada *locus*. Isso é feito pela distribuição binomial cumulativa (WEIR & COCKERNHAN, 1984), pela fórmula  $p = 1 - 0.5[4 - 4(PAA + PA^*)]^{0.5}$ . O valor obtido para *p* é utilizado para estimar a probabilidade de cada classe de homozigoto baseado no teste Exato de Fisher. Os desvios em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg são obtidos (diferença entre homozigosidade esperada e observada) e indicam se estão relacionados com presença de alelos nulos, *dropout* de alelos ou *stutter*.

Já a combinação dos testes de excesso de homozigotos e a distribuição uniforme desta homozigose entre as classes de alelos indicam alelos nulos. Caso não haja essa uniformidade, o programa MICRO-CHECKER (OOSTERHOUT *et al.*, 2006) alerta sobre uma possível endogamia na população. Além disso, outros tipos de erros associados a excesso de homozigotos também são considerados. A presença de *stutter* como fator que influencia na genotipagem é detectado por baixa frequência de heterozigotos que diferem por uma unidade repetitiva em relação ao esperado e há uma grande quantidade de homozigotos em alelos maiores, já que *stutters* são mais comuns nesses alelos. Nesse caso, o programa calcula que bandas que foram consideradas *stutter* podem ser de indivíduos heterozigotos. *Dropout* é considerado quando a maior quantidade de homozigotos está nos extremos das distribuições alélicas, tendo que a amplitude da amplificação deve ultrapassar 150 pares de bases.

Visto que o *bottleneck* recente reduz radicalmente o número de homozigotos e que, como descrito acima, todos os testes do MICRO-CHECKER (OOSTERHOUT *et al.*, 2006) são baseados na presença de homozigotos, o programa pode se tornar ineficiente nesse tipo de situação específica. Identificar populações que tenham experimentado uma severa redução de tamanho é importante porque *bottlenecks* podem incrementar a aleatoriedade demográfica, a taxa de endogamia, a perda de variedade genética e a fixação moderada de alelos deletérios. Além disso, reduz o potencial evolutivo e aumenta a probabilidade de extinção populacional (e. g. VRIJENHOEK, 1998; LUIKART *et al.*, 1998).

#### 4. RESULTADOS

Foram genotipados 17 *loci* de microssatélites para análise da variabilidade genética de uma população F1, totalizando 93 indivíduos irmãos. Os parentais também foram genotipados, para se verificar a segregação mendeliana dos alelos e minimizar erros como *stutters*, *drop out*, alelos nulos e bandas espúrias. Verificou-se que os *loci* Par66 e Par69 apresentaram uma série de indivíduos com os genótipos discrepantes dos parentais (provavelmente devido ao fenômeno *drop out*, já que muitas proles se mostravam mostraram homozigótica sem um alelo maior que necessariamente teria herdado de uns dos pais), e, portanto, não foram utilizados para as análises estatísticas, genótipos dos parentais também não foram utilizados para o mesmo, e nem os *loci* monomórficos. Dos 17 *loci*, dois se mostraram monomórficos, (35 e 53) (Tabela 2), que foram descartados das análises estatísticas, embora o *locus* 35 tenha apresentado 11 alelos em trabalhos anteriores com populações selvagens (Tabela 3) (GALZERANI, 2007). Posteriormente, foram realizados testes com o programa MICRO-CHECKER (versão 2.2.3) (OOSTERHOUT *et al.*, 2006) nos 13 *loci* restantes e nenhum deles apresentaram *stutters*, *dropout* ou alelos nulos, dando mais confiabilidade aos dados. O programa mostrou que a homozigosidade esperada foi quase sempre maior do que a observada para todos os *loci*, com exceção do *locus* Par12 (Tabela 4).

Testes feitos com o programa GENEPOP (version 1.2) (RAYMOND & ROUSSET, 1995) mostraram que nenhum dos 13 *loci* estavam ligados, nível de significância  $P=0,00987$ , conforme o fator de correção de Bejamini e Yekutieli (2001) indicado em Narum *et al.* (2006). Desta forma, todos os *loci* puderam ser usados nos tratamentos estatísticos sem maiores restrições. Foi calculado também a heterozigosidade e esta foi comparada à população selvagem (Tabela 5).

**TABELA 2.** Frequência e número total de alelos detectados em 15 *loci* de microsatélites de *Prochilodus argenteus*.

<b>Loco</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>	<b>Loco</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>
Par10	187	0,382	Par12	217	0,478
	191	0,618		221	0,522
	N*	93		N*	69
Par14	209	0,506	Par21	175	0,702
	213	0,261		184	0,298
	217	0,233		N*	89
N*	88	N*	89		
Par26	248	0,471	Par31	263	0,657
	256	0,267		277	0,343
	260	0,262		N*	89
N*	86	N*	89		
Par76	220	0,244	Par80	234	0,038
	224	0,256		238	0,500
	228	0,500		244	0,317
N*	82	252	0,145		
N*	82	N*	93		
Par82	186	0,474	Par83	264	0,180
	188	0,269		273	0,500
	190	0,256		281	0,320
N*	78	N*	86		
N*	78	N*	86		
Par85	229	0,264	Par86	150	0,180
	235	0,270		160	0,325
	248	0,236		164	0,320
254	0,230	168	0,174		
N*	87	N*	89		
N*	87	N*	89		
Par115	150	0,184	Par53**	171	1,000
	159	0,287			
	195	0,213			
207	0,316				
N*	87	N*	92		
N*	87	N*	92		
Par35**	246	1,000	Par53**	171	1,000
	N*	88		N*	92
N*	88	N*	92		

\* N: número de indivíduos testados para o *locus*

\*\* Primers monomórficos

**TABELA 3.** Comparação de número de alelos para cada *locus* entre as populações de cativo e selvagem

<i>Locus</i>	No. de alelos	Pop. Cativo	Pop. Selvagem*
Par12		2	16
Par14		3	18
Par21		2	11
<b>Par35</b>		<b>1</b>	<b>11</b>
Par76		3	10
Par80		4	31
Par82		3	20
Par85		4	22

\*Dados disponíveis em Galzerani (2007)

**TABELA 4.** Homozigose esperada e observada em 13 *loci* de uma população cultivada de *Prochilodus argenteus* calculada pelo programa MICRO-CHECKER (versão 2.2.3) (OOSTERHOUT *et al.*, 2006).

<b>Locus</b>	<b>HomExp</b>	<b>HomObs</b>
Par10	0,527978	0,236559
<b>Par12</b>	<b>0,500942</b>	<b>0,594203</b>
Par14	0,378284	0,261364
Par21	0,581798	0,404494
Par26	0,361744	0,232558
Par31	0,525849	0,301075
Par76	0,375073	0,000000
Par80	0,433725	0,000000
Par82	0,618667	0,487179
Par83	0,386419	0,000000
Par85	0,290851	0,287356
Par86	0,268764	0,000000
Par115	0,260402	0,195402

**TABELA 5.** Heterozigosidade esperada e observada em 13 *loci* de uma população cultivada e 6 *loci* de uma população selvagem de *Prochilodus argenteus*.

<i>Locus</i>	População Cultivada		População Selvagem*	
	HetExp	HetObs	HetExp	HetObs
Par10	0,621621	0,763441	-----	-----
<b>Par12</b>	<b>0,502697</b>	<b>0,405797</b>	<b>0,694102</b>	<b>0,632653</b>
Par14	0,846506	0,738636	0,427002	0,367347
Par21	0,706215	0,595506	0,620543	0,530612
Par26	0,836523	0,767442	-----	-----
Par31	0,661016	0,685393	-----	-----
Par 35	-----	-----	0,174502	0,142857
Par76	0,628760	1,000000	-----	-----
Par80	0,630282	1,000000	0,424376	0,322380
<b>Par82</b>	0,819461	0,782051	<b>0,796817</b>	<b>0,812500</b>
Par83	0,618863	1,000000	-----	-----
Par85	0,753106	1,000000	0,892556	0,875000
Par86	0,732338	0,988764	-----	-----
Par115	0,742741	1,000000	-----	-----
<b>Total</b>	<b>0,756632</b>	<b>0,825156</b>	<b>0,600920</b>	<b>0,560162</b>

\*Dados disponíveis em Galzerani (2007)

Posteriormente, foi calculado pelo programa GENEPOP (version 1.2) (RAYMOND & ROUSSET, 1995) o coeficiente de endogamia. Com exceção do *locus* Par12, todos os *loci* mostraram valores negativos contrastando com os dados em população selvagem de GALZERANI (2007). Outra exceção é Par82 que contrariando a tendência na população selvagem apresentou um valor negativo (Tabela 6). Finalmente, comparações feitas entre a diversidade gênica da população cultivada e natural resultaram em valores sempre menores para a população cultivada (Tabela 8).

**TABELA 6.** Coeficiente de endogamia para cada *locus* e total na população cultivada e selvagem de *Prochilodus argenteus*.

<i>Locus</i>	$F_{is}$		
	População cultivada	P $F_{is}$ <i>smaller</i> ** Pop. cultivada	População selvagem*
Par10	-0,614	0,0038	-----
<b>Par12</b>	<b>+0,194</b>	<b>0,9769</b>	<b>+0,089</b>
Par14	-0,183	0,0077	+0,141
Par21	-0,419	0,0038	+0,146
Par26	-0,197	0,0192	-----
Par31	-0,517	0,0038	-----
Par35	-----	0,0038	+0,183
Par76	-0,596	0,0038	-----
Par80	-0,592	0,0077	+0,242
<b>Par82</b>	<b>-0,222</b>	<b>0,0038</b>	<b>-0,020</b>
Par83	-0,622	0,0038	-----
Par85	-0,330	0,0038	+0,020
Par86	-0,368	0,0038	-----
Par115	-0,349	0,0038	-----
Fis Total	-0,368	0,0038	+0,084

\* Dados disponíveis em Galzerani (2007)

\*\* P *smaller*, verificação de excesso de heterozigotos, nível de significância 0,05

**Tabela 7.** Diversidade gênica por *locus* em *Prochilodus argenteus*

<b>Locus</b>	<b>Diversidade População Cultivada</b>	<b>Diversidade População Selvagem*</b>
Par10	0,473	-----
Par12	0,503	0,740
Par14	0,625	0,456
Par21	0,420	0,662
Par26	0,641	-----
Par31	0,452	-----
Par35	0,000	0,190
Par76	0,626	-----
Par80	0,628	0,879
Par82	0,640	0,850
Par83	0,617	-----
Par85	0,752	0,952
Par86	0,731	-----
Par115	0,741	-----

\* Dados disponíveis em Galzerani (2007)

Os testes realizados no programa para os três modelos BOTTLENECK versão 5.1 (CORNUET & LUIKART, 1996) resultaram em valores idênticos e significativos indicando o possível efeito de gargalo na população cultivada, destacando-se o teste de Wilcoxon que se mostrou mais robusto e apropriado para essa situação. Os resultados foram comparados com os de população selvagem de Galzerani (2007), cujos dados foram submetidos ao mesmo teste (Tabela 8).

**Tabela 8.** Resultado do teste de *bottleneck* com três modelos de mutação adotado: T.P.M. - Modelo de Duas Fases (*Two-Phased Model*); S.M.M. - Modelo de Mutação por Passos (*Stepwise Mutation Model*) e I.A.M. - Modelo de Alelos Infinitos (*Infinite Allele Model*).

<b>Modelo de Mutação</b>	<b>Teste Wilcoxon</b>	
	<b>População Cultivada</b>	<b>Populacao Selvagem*</b>
<i>T.P.M</i>	<i>0,00012</i>	<i>0,01367</i>
<i>S.M.M.</i>	<i>0,00012</i>	<i>0,00293</i>
<i>I.A.M</i>	<i>0,00012</i>	<i>0,69531</i>

\* Nível de significância de 0,05

\* Disponível em Galzerani (2007)

Considerando uma população em equilíbrio de deriva e mutação, na qual o tamanho efetivo se manteve constante no passado recente, há uma probabilidade aproximadamente igual que um *locus* mostre um excesso ou um déficit na heterozigidade. Assim, para se verificar se uma determinada população exibe um significativo número de *loci* com heterozigidade, podem-se utilizar alguns testes chamados de “*sing test*”. Um deles é o teste de “*Wilcoxon sing-rank*”, que segundo Luikart (1997) requer pelo menos 20 *loci* polimórficos, mas devido ao alto poder, pode ser usado com poucos *loci*, como por exemplo,

quatro *loci* em qualquer número de indivíduos (entre 15-40 indivíduos e 10-15 *loci* polimórficos são recomendados para alcançar alto poder de detecção de *bottleneck*). Tal situação foi encontrada no presente trabalho, com 13 *loci* analisados e aproximadamente 86 indivíduos em média, indicando que o teste de Wilcoxon pode ter sido a escolha mais adequada.

## 5. DISCUSSÃO

Com exceção do *locus* Par12, os valores de heterozigosidade observada da população cultivada foram maiores para todos os *loci* em comparação com a heterozigosidade esperada, diferentemente dos dados da população selvagem. Além disso, os valores negativos dos coeficientes de endogamia da população em cativeiro, excetuando também o *locus* Par12 (Tabela 7), conjuntamente com a perda da diversidade gênica na mesma população, demonstraram uma distribuição alélica evidentemente diferente, quando comparada à população selvagem (Tabela 3).

Esses resultados podem indicar um possível efeito de gargalo (*bottleneck*) recente na população, principalmente quando contrastados com os dados da população selvagem, já que segundo Luikart *et al.* (1998), populações que experimentaram uma recente redução no seu tamanho efetivo exibem uma correlativa redução do número de alelos e efetivo aumento da heterozigosidade observada. Testes feitos com o programa BOTTLENECK corroboraram a hipótese na população de cativeiro, obtendo resultados idênticos independentemente do modelo de mutação adotado, os quais são expressivos principalmente quando comparados com os da população selvagem. No modelo S.M.M., a população selvagem mostra valor significativo (abaixo 0,05) para o *bottleneck*, porém esse modelo de mutação é pouco preciso no caso de microssatélites, mostrando-se inadequados, por isso foram desconsiderados. Embora os parentais tenham sido coletados aleatoriamente no rio, e conseqüentemente não passaram por um processo de endogamia envolvendo várias gerações sucessivas, estes dados podem ser alarmantes, uma vez que os alevinos resultantes destes cruzamentos têm sido liberados na região à montante da barragem há mais de duas décadas sem um devido monitoramento, e pode ao longo das gerações gerar uma consistente perda da diversidade gênica, como visto em nossa população cultivada.

Dados de Barroso *et al.* (2005) com *Brycon opalinus* utilizando um conjunto de sete *loci* de microssatélites contrastam com o presente trabalho. Em uma comparação entre

populações selvagens e uma de cativeiro não foram encontradas grandes diferenciações entre as populações. Os coeficientes de endogamia (Fis) nas populações selvagens do trabalho de Barroso *et al* (2005) foram +0,360, +0,330, +0,148, +0,275, +0,363 e na população cultivada +0.275. No presente estudo, o Fis da população selvagem é de +0.084, ao contrário da população cultivada onde Fis é de -0,368, onde não há endogamia. As taxas de endogamia aproximadamente similares entre as populações selvagens e cultivada observada no trabalho de Barroso *et al.* (2005) podem ser o reflexo direto de alguns fatores, tais como o uso de um número menor de marcadores e/ou suscetibilidade espécie específica, ou mesmo, o número de casais parentais e grau de parentesco dos mesmos, usados para produzir essa população. Além disso, em casos de *bottleneck* recente, este pode ser difícil de ser detectado, tendo como prejuízo a perda de alelos e a diversidade gênica.

Aho *et al.* (2006) utilizando sete *loci* de microssatélite em 17 populações cultivadas de *Salmo trutta* relata que o menor valor observado de alelos por *locus* foi de sete e o maior de 18. Comparando estes dados com o presente trabalho, como foi analisada uma única população cultivada, a perda alélica é mais pronunciada, mas dados referentes às populações selvagens mostram uma variação de 10 a 30 alelos nestes *loci* de microssatélites (GALZERANI, 2007). Uma outra constatação pertinente de Aho *et al.* (2006) é o fato de que quanto mais antiga é a fundação da população cultivada, mais drástica é sua perda alélica e conseqüentemente a diversidade genética, que cultivos diminuí muito o tamanho efetivo da população, deprimindo o número e permitindo a fixação alélica rapidamente por deriva.

Em um estudo realizado com a mesma população do presente trabalho por Rojas (2008) utilizando marcadores AFLP demonstrou uma baixa heterozigosidade esperada ( $He = 0,321$ ), distante do valor observado no presente trabalho ( $He = 0,757$ ), porém o próprio autor pondera que AFLP é um marcador dominante e dessa forma, não se consegue separar heterozigotos (1/0) de homozigotos (1/1), o que dificulta a comparação com marcadores codominantes, como é o caso de microssatélites. Em um estudo com populações naturais de *Prochilodus costatus*, usando um conjunto de seis *loci* microssatélites, foram observados valores de  $He$  variando entre 0,420 a 0,660, abaixo da população cultivada desse trabalho, e não se identificou-se estruturação populacional (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008).

Em *P. argenteus*, Galzerani (2007) estudou duas localidades do rio São Francisco (as mesmas utilizadas nos trabalhos de Hatanaka & Galetti, 2003 e Hatanaka *et al.*, 2006) no intuito de verificar uma possível estruturação populacional. No presente estudo, estes mesmos dados foram utilizados, sendo, no entanto, considerada como somente uma única população selvagem para tornar a comparação mais consistente. No trabalho de

Galzerani (2007), mesmo analisando os dois grupos separadamente, não foi encontrado *bottleneck* nos grupos e também não foi observada diferenciação populacional, resultados semelhantes aos obtidos em *P. costatus* (Carvalho-Costa *et al.*, 2008). Por outro lado, os resultados de Galzerani (2007) se contrapuseram aos encontrados por Hatanaka & Galetti (2003) e Hatanaka *et al.* (2006), nos quais houve indicação de diferenciação populacional.

Estas discrepâncias podem ter sido geradas pelo fato de que os espécimes analisados por Galzerani (2007) foram coletados durante a época não-reprodutiva, fase do ano em que os peixes não estão realizando o processo de migração rio acima, em contraste à estruturação de populações de *P. argenteus* detectada durante a época reprodutiva (Hatanaka *et al.*, 2006). Isso é crítico em análise de estruturação populacional e consequente diversidade gênica, já que se a estruturação for de fato sazonal, delinear o perfil genético da população pode se torna muito complexo, necessitando de trabalhos de amostragem sucessivos em diferentes épocas do ano até detectar um padrão bem estabelecido.

No entanto, resultados similares aos do presente trabalho foram observados em um estudo com estoques de *Lates calcarifer* do sudeste da Ásia, que mostraram que a diversidade genética encontrada para os dois estoques cultivados e uma população selvagem foi alta, apresentando valores de *He* próximos aos obtidos nesse trabalho, variando de 0,720 a 0,760. Além disso, foi encontrada uma significativa diferenciação genética entre os estoques cultivados e selvagem, além de terem sido detectados alelos privados, indicando assim que a criação de uma cultura pode ser mantida através da combinação de exemplares de diferentes amostras para elevar a diversidade genética (ZHU *et al.*, 2006).

A variabilidade genética populacional é usualmente medida por números de alelos (variante genético) e heterozigosidade (JUANES *et al.*, 2007, PIORSKI *et al.*, 2008). Estudos realizados têm mostrado diferenças entre populações de peixes selvagens e cultivadas que poderiam diminuir o *fitness* dos indivíduos selvagens (REISENBICHLER & RUBIN, 1999). A situação em cultivos tradicionais tem sido limitar o número de indivíduos com características que favoreçam a produção de centenas de proles (WEDEKIND, 2002). Um macho pode, por exemplo, ser usado para fertilizar poucas fêmeas por muitas gerações, o que inevitavelmente faz com que o mesmo macho fertilize suas proles. Isto poderá gerar uma diminuição do tamanho efetivo e aumento da endogamia, que fortemente contribui para depredação da diversidade genética (AHO *et al.*, 2006).

A liberação de indivíduos geneticamente depredados produzidos em cativeiro no ambiente selvagem pode promover algumas consequências desastrosas, tais como: depredação da diversidade genética, contaminação por doenças e incremento da competição

(BOHLIN *et al.*, 2002; HEGGENES *et al.*, 2002, AHO *et al.*, 2006). Destaca-se que um dos impactos genéticos da liberação de peixes cultivados em populações selvagens é a redução do tamanho efetivo da população, uma situação específica que ocorre nos casos de peixamentos com peixes nativos (programas de cultivo) (SOUSA *et al.*, 2006).

Ryman *et al.* (1995) definem como introgressão a introdução com posterior fixação de um material genético novo em uma determinada população da população selvagem. A introgressão de material genético exógeno em uma população nativa acontece quando as características genéticas da população cultivada são diferentes da população selvagem, assim, um cruzamento entre a população cultivada e a selvagem é passível de ocorrer. Os autores citam que a constituição genética da população nativa pode ser permanentemente alterada pela perda de material genético importante, onde genes ou complexos gênicos favorecidos pela seleção artificial ou domesticação podem não ser adaptados ao ambiente natural, provocando assim, erosão do *pool* gênico nativo, como o enfraquecimento ou mesmo a perda da população natural, pela competição entre peixes nativos e peixes introduzidos, que por último demonstram baixo sucesso reprodutivo. Logo, essa perda de *fitness* na população natural por introdução de indivíduos exógeno pode ser definida como introgressão deletéria.

Para evitar esse introgressão deletéria, na maioria dos casos, temos apenas predições gerais podem ser feitas, baseando-se nas teorias da genética de populações, se alguns parâmetros forem conhecidos, como o tamanho e a história evolutiva da população cultivada e natural, as forças seletivas atuantes, etc.; teríamos maior controle nesse fenômeno. Mas normalmente há poucas informações sobre as características genéticas das populações, especialmente as selvagens (RYMAN *et al.*, 1995).

A liberação de peixes cultivados no ecossistema aquático natural é uma ação comum no Brasil, especialmente depois da significativa expansão da aquicultura na última década (SOUSA *et al.*, 2006). Essa liberação pode ser intencional, no caso de peixamentos (introdução, reintrodução, intensificação), ou acidental, no caso de escapes de estações de aquicultura. A ótima utilização de estoques de peixes sob domesticação geralmente requer conhecimento das relações familiares (pais, irmãos). Por exemplo, em programas de criação de aquicultura, a progênie de um cruzamento é geralmente confinada em um único ambiente para minimizar a variação ambiental. Tais condições são geralmente impostas por causa do limitado espaço de confinamento por pequenas conveniências comerciais (FERGUSON *et al.*, 1995).

Apesar da introdução de material genético em determinadas situações, por exemplo, quando um estoque natural foi exaurido por um longo tempo, na maioria dos casos essa prática é de riscos a respeito da integridade genética do estoque receptor (SOUSA *et al.*, 2006). O delineamento desse experimento apresenta como intenção mostrar o panorama desse tipo de depredação utilizando o perfil da progênie advindo de um único casal. No caso do cultivo do *P. argenteus*, os cultivos são feitos com dois ou três parentais, o que é deficitário, já que em populações selvagens, há uma diversidade de casais formados e sistemas de cruzamento. Já que em um sistema hidrográfico, peixes de rios podem constituir uma grande e panmítica população como observado em *P. costatus* (CARVALHO-COSTA *et al.*, 2008) ou podem formar populações genéticas diferenciadas, como já anteriormente observado em *P. argenteus* (HATANAKA & GALETTI, 2003; HATANAKA *et al.*, 2006), *Brycon orthotaenia* (WASKO & GALETTI, 2002) e *Brycon hilarii* (SANCHES & GALETTI, 2007), tornando o conhecimento do perfil genético (selvagem e cultivado) mais crítico ainda para questões de conservação.

Fleming *et al.* (2000) realizaram um trabalho de monitoramento em larga escala de salmão (*Salmo salar*), incluindo populações selvagem, cultivada e híbrida em um rio da Noruega. Experimentos de comportamento de corte e nidificação, utilizando marcadores enzimáticos e DNAmT para identificação de *pedigree* no ambiente natural, além de medidas biométricas como peso da desova, tamanho e peso do peixe. Segundo os autores, os salmões nativos têm um sucesso de sobrevivência maior de 16% com relação aos híbridos e peixes cultivados. Os autores ainda relatam que há uma competição nos primeiros estágios de vida entre híbridos, cultivados e selvagens, sendo que os cultivados por serem maiores tendem a exercer uma maior pressão por comida e ambiente sobre os selvagens.

Uma situação ideal de cultivo recomendada é de criar um tamanho populacional efetivo moderado, algo entre 25 e 94 indivíduos matrizes (PANTE *et al.*, 2001). Isso é concordante com o tamanho efetivo mínimo de 50 indivíduos sugerido no programas do Instituto Finlandês de pesca para produção e esportiva (AHO *et al.*, 2006). No entanto, sob o ponto de vista prático, pode ser virtualmente difícil de realizar e, lançar mão dos mais recentes avanços genéticos, tais como a utilização dos marcadores moleculares, pode oferecer novas possibilidades no monitoramento do impacto genético de peixes cultivados em estoques naturais (SOUSA *et al.*, 2006). Assim, avanços tecnológicos em biologia molecular e bioquímica têm permitido o desenvolvimento de uma variedade de marcadores genéticos que podem ser usados para responder questões de relevância para manejo e conservação de peixes. Marcadores de DNA são extremamente úteis para desenvolvimento de um plano de

manejo mais adequado para populações naturais de peixes neotrópicos (PIORSKI *et al.*, 2008). Tal qual, verificação e manipulação de alelos em cruzamento de peixamento otimizando a variabilidade. uma medida viável e de fácil aplicação com esse tipo tecnologia.

Porém atribuir o fracasso em programas de peixamentos somente às características genéticas é um reducionismo ineficiente e simplista, já que as comunidades biológicas refletem as condições de uma bacia hidrográfica, sendo sensíveis a uma ampla variedade de fatores ambientais (KARR, 1981). Piorski *et al.* (2008) faz uma detalhada descrição sobre os tratamentos de recuperação da bacia do rio Paraná, demonstrando os agentes de sua degradação, modificações do ambiente e consequências a fauna local, terminando por apontar os sucessivos fracassos nos programas de recuperação (peixamentos, construções de passagens e escadas para peixes migratórios e programas de controle de pesca), devido ao fato de não serem ações integradas, respaldadas em dados científicos consistentes e finalmente refletindo uma alteração ambiental drástica, difícil de ser revertida nesse ambiente aquático.

Segundo Barroso *et al.* (2005), a manutenção de populações em cativeiro tem um papel importante na conservação da diversidade biológica. De fato, populações mantidas em cativeiro têm uma importante função, como por exemplo, suprir de indivíduos para a formação de possíveis planteis ou incrementar o tamanho de populações selvagens. É importante, entretanto, que o manejo de estoques se apóie na manutenção de variabilidade genética dos planteis em cativeiro, podendo desta forma, colaborar com a conservação das espécies.

Os resultados do presente estudo fomentam a questão do impacto de peixes cultivados em populações naturais que tem sido discutido intensivamente nos últimos tempos (RHYMER, 1996). Os represamentos têm remodelado os ambientes aquáticos em termos estrutural e funcional, e a conservação da diversidade dos peixes demandará muitos esforços políticos, sociais e científicos para ser bem sucedida. Pesca e programas de manejo de biodiversidade devem incorporar uma ampla perspectiva recuperação (ambiente, pescadores e peixe) e que preveja uma permanente avaliação do ecossistema através do monitoramento e estudos específicos de análises genéticas.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Populações obtidas através de cruzamento de um único casal tem uma perda alélica muito expressiva; principalmente quando comparada a diversidade de uma população selvagem.
- ✓ Cruzamentos de parentais não aparentados, pode gerar uma alta heterozigosidade;
- ✓ Combinação heterozigosidade alta e baixa diversidade alélica é indicativo de *bottleneck* recente;

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHO, T. *et al.* Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, n. 253, p. 244–248, 2006.
- ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic. Acids. Res.**, Vol. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=147078&tools=bot>>. Acesso em: 04 abr. 2007.
- ALVES, C.B.M.; POMPEU, P.S. **Peixes do rio das Velhas: passado e presente**. Belo Horizonte: Segrac, 2001. 194 p.
- AVISE, J.C. **Introduction: the scope of conservation genetics**. In: AVISE, J.C.; HAMRICK, J.L. (ed.). *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York: Chapman & Hall, 1996.
- BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, n.11, p.155-165 2002.
- BANKS, M.A. *et al.* Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Heredity**, n. 90, v. 2, p. 281-288, 1999.
- 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*. **Genet. Mol. Biol.**, São Paulo, n. 1, v. 31, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-47572008000200032&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47572008000200032&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 12 Mar. 2009. doi: 10.1590/S1415-47572008000200032.
- BARBOSA, A.C.D.R. *et al.* Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Mol. Ecol. Notes**, n. 6, p. 936-938, 2006.

- BARROSO, R.M.; *et al.* Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture**, v. 247, p. 51-65, 2005.
- BENJAMIN, Y.; YEKUTIELI, D.; The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **Ann. Stat.**, Vol. 29, n. 4, p. 1165-1188, 2001.
- BOHLIN, T.; *et al.* Density-dependent growth in brown trout: effects of introducing wild and hatchery fish. **J. Anim. Ecol.**, n. 71, p. 683-692, 2002.
- BONETTO, A.A. The Paraná river system. In: DAVIES, B. R.; WALKER, K. F. (ed.). **The Ecology of River**. Dordrecht: Dr. W. Junk Publishers, 1986. p. 541-555.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco. 3 Brasília: Câmara Dos Deputados/ Codevasf, 1988. 115 p.
- BRUTON, M.N. Have fishes had their chips?: The dilemma of threatened fishes. **Environmental Biology Of Fishes**, v. 47, p. 1-27. 1995.
- CALLEN, D. F. *et al.* Incidence and origin of null alleles in the (AC)*n* microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p 922-927, 1993.
- CARVALHO, G.R.; HAUSER, L. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. **Rev. Fish Biol. Fish.**, v 4, p. 326-350, 1994.
- CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; GALETTI Jr, P.M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics And Molecular Biology**, v. 31, n .1 (suppl), p. 377-380, 2008.
- CASTRO, R.M.C.; VARI, R.P. **Dentritives of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes)**: A Phylogenetic and Revisionary Study. Washington: Smithsonian, 2004. 187 p.
- CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 11, p. 455-476, 2000.
- CHILCOTE, M.W. Relationship between natural productivity and the frequency of wild fish in mixed spawning populations of wild and hatchery steelhead (*Oncorhynchus mykiss*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 60, n. 9, p. 1057-1067, 2003. Disponível em: <[http://article.pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ppv/RPViewDoc?\\_handler\\_=HandleInitialGet&journal=cjfas&volume=60&calYLang=fra&articleFile=f03-092.pdf](http://article.pubs.nrc-cnrc.gc.ca/ppv/RPViewDoc?_handler_=HandleInitialGet&journal=cjfas&volume=60&calYLang=fra&articleFile=f03-092.pdf)>. Acesso em: 30 mar. 2007.
- CHILCOTE, M.W.; LEIDER, S.A.; LOCH, J.J. Differential reproductive success of hatchery and wild summerrun steelhead under natural conditions. **Transactions Of The American Fisheries Society**. v. 115, p. 726-735. 1986.

- CORDIVIOLA DE YUAN, E. Fish populations of lentic environments of the Paraná River. **Hydrobiologia**, v. 237, n.3, p. 159-173, 1992.
- CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**. v. 144, p. 2001-2014, 1996
- COSTA, C.M.R. *et al.* (Org.). **Biodiversidade em Minas Gerais: um atlas para sua conservação**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1998. 94 p.
- COSTA, L.F.C. Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes Prochilodontidae) na bacia do rio São Francisco, região de Três Maria (MG). 2006. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Departamento de Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- COWX, I.G. Strategic approach to fishery rehabilitation. In: COWX, I.G. (ed.). **Rehabilitation of freshwater fisheries**. Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 3-10.
- DANZMANN, R.G.; IHSEN, P.E. A phylogeographic survey of brook charr (*Salvelinus fontinalis*) in Algonquin Park, Ontario based upon mitochondrial DNA variation. **Mol. Ecol.**, v. 4, p. 681-697, 1995.
- DEWOODY, J. A.; AVISE, J. C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 461-473, 2000.
- DI RIENZO, A. *et al.*, Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, p. 3166-3170, 1994.
- ENERGIA, Ministério De Minas E; S.A., Centrais Elétricas Brasileiras; ELÉTRICO, Comitê Coordenador Das Atividades De Meio Ambiente Do Setor (Org.). **SEMINÁRIO SOBRE FAUNA AQUÁTICA E O SETOR ELÉTRICO BRASILEIRO: REUNIÕES TEMÁTICAS PREPARATÓRIAS**. Disponível em: <[http://www.eletrobras.gov.br/downloads/EM\\_MeioAmbiente/Comase\\_FaunaAq\\_Cad5.pdf](http://www.eletrobras.gov.br/downloads/EM_MeioAmbiente/Comase_FaunaAq_Cad5.pdf)>. Acesso em: 01 mar. 2007.
- FERGUSON, A. *et al.* The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **J. Fish Biol.** v. 47(Suppl. A), p. 103-126, 1995.
- FERGUSON, M.M.; DANZMANN, R.G.; Role of genetic markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting? **Can. J. Fish. Aquat. Sci.**, v. 55, p. 1553-1563, 1998.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. 3ª ed. Embrapa-Cenargen, Brasília, 1998.
- FLEMING, I.A.; *et al.* Lifetime success and interactions of farm salmon. **Proc. R. Soc. Lond. B.** v.267, p. 1517-1523, 2000.

- FORESTI, F.; TOLEDO-FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. Manejo de recursos genéticos em populações de peixes. In: AGOSTINHO, A.A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. (ed.). **Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil**. Maringá: Editora da UEM, 1992. p. 58-68.
- GALZERANI, F. **Análise da variabilidade genética de *Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae) do rio São Francisco, região de Três Marias, através de marcadores microsatélites.**, 2007, 34f, (Monografia) Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Genética e Evolução – Universidade Federal de São Carlos – São Carlos - 2007
- 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. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: Sografe**, 2003. 458 p.
- GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. **Acta Limnol. Bras.**, v. 5, p. 187-197,1994.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **J. Hered.** Vol. 86, n. 6, p. 485-486, 1995.
- GRODZICKER *et al.* Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenovirus. In: Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology 39, Cold Spring Harbor, p.439-446, 1974.
- HANSEN, M.M.; *et al.* Brown trout (*Salmo trutta*) stocking impact assessment using microsatellite DNA markers. **Ecological Applications**, Vol. 11, n. 1, p. 148-160, 2001.
- HANSEN, M.M.; RUZZANTE, D.E.; MENSBERG, K.D. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). **Molecular Ecology**, v. 9, n. 5, p. 583-594, 2000.
- HANSSON, B.; WESTERBERG, L. On the correlation between heterozygosity. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2467-2474, 2002.
- HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 1, p. 19-25, 2003.
- HATANAKA, T.; SILVA, F.H.; GALETTI Jr., P.M. Population substructure in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, n. 1-2, p. 153-159, 2006.
- HAUGE, W.Y., LITT, M. A study of origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by PCR. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p 411-415, 1993.

- HEGGENES, J. *et al.* Microsatellite diversity assessment of brown trout (*Salmo trutta*) population structure indicate limited genetic impact of stocking in a Norwegian alpine lake. **Ecol. Freshw. Fish**, v. 11, p. 93–100, 2002.
- HICKLEY, P. Stocking and introduction of fish: a synthesis. In: COWX, I.G. (ed.). **Rehabilitation of freshwater fisheries**. Oxford: Fishing News Books, 1994. p. 247-254,
- HINDAR, K.; RYMAN, N.; UTTER, F.M. Genetic effects of cultured fish on natural fish populations. **Can.J. of Fisheries And Aquatic Sci.**, v. 48, p. 45-957, 1991.
- JUANES, F., PEREZ, J., GARCIA-VAZQUEZ, E. Reproductive strategies in small populations: using Atlantic salmon as a case study. **Ecol. Freshw. Fish**, v. 16, n. 4, p. 468-475, 2007.
- KARR, J.R. Assessment of biotic integrity using fish communities. **Fisheries**, v. 6, n. 6, 1981.
- KIMURA, M., OHTA, T. Stepwise mutation model and the distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proce. of the Nati. Academy of Scie. of the U.S.A.**, v. 75, p. 2868-2872, 1978.
- KIMURA, M.; CROW, F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-738, 1964.
- KIRSTI, M., *et al.* Power of microsatellite markers for fingerprinting and parentage analysis in *Eucalyptus grandis* breeding populations. **Journal of Heredity**, v. 96, n. 2, p. 161-166. 2005.
- KNAPIK, E.W. *et al.* A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). **Nature Genetics**, v. 13, p. 338-343, 1998.
- LARGIADÈR, C.R.; SCHOLL, A. Genetic introgression between native and introduced brown trout (*Salmo trutta* L.) populations in The Rhône River Basin. **Molecular Ecology**, v. 5, p. 417-426, 1996.
- LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. **Mol. Bio. and Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.
- LITT, M.; LUTY, J.A.A. hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Human Genet.**, v. 44, p. 397-401, 1989.
- LOWE-McCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge University Press, Cambridge, 1987.
- LUIKART G., 1997. Usefulness of molecular markers for detecting population bottlenecks and monitoring genetic change. Tese de Ph D. University of Montana, Missoula, USA.
- LUIKART, G. *et al.* Molecular genetic test identifies endangered populations. **Conserv. Biol.** v. 12, p. 228–237, 1998.

- MARUYAMA, T.; FUERST, P.A. Population bottlenecks and non equilibrium models in population genetics. II. Number of alleles in a small population that was formed by a recent bottleneck. **Genetics**, v. 111, p. 675-689, 1985.
- MENIN, E.; MIMURA, O.M. Anatomical aspects of the epibranchial organs of *Prochilodus marggravii* (Walbaum, 1792) and *Prochilodus affinis* Reinhardt, 1874 (Characiformes, Prochilodontidae). **Revista Ceres (Brazil)** v. 38, n. 217, p. 229-239, 1991.
- NARUM, S.R. Beyond Bonferroni: Less conservative analyses for conservation genetics. **Conservation Genetics**, v. 7, p. 783–787, 2006.
- MORITZ, C. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, n. 9, p. 373-375, 1994.
- NIELSEN, E.E.; HANSEN, M.M.; LOESCHCKE, V. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 5, p. 487-492, 1997.
- O'BRIEN, S.J.A. role for molecular genetics in biological conservation. **Proce. Of The Natural Academy Of Scie.**, v. 91, p. 5748-5755, 1994.
- O'CONNELL, M.; WRIGHT, J. M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p 331-363, 1997.
- O'REILLY, P.T.; WRIGHT, J.M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 29-55, 1995.
- OHARA, E. *et al.* Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). **Aquaculture**, v. 244, p. 41-48, 2005.
- OOSTERHOUT, C.V.; WEETMAN, D.; HUTCHINSON, W. F. Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, 255–256, 2006.
- PANARARI, R.S. **Variabilidade Genética, Evidenciada Por Marcadores Nucleares E Do Genoma Mitocondrial, De Espécies Do Gênero Brycon (Characiformes: Characidae) De Três Bacias Hidrográficas.** 2006. 75 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ecologia de Ambientes, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2006. Disponível em: <[http://www.pea.uem.br/PEA-WEB-SIT-docum2006/Tese\\_Renata2006.pdf](http://www.pea.uem.br/PEA-WEB-SIT-docum2006/Tese_Renata2006.pdf)>. Acesso em: 10 mar. 2007.
- PANTE, M.; GJERDE, B.; MCMILLAN, I. Inbreeding levels in selected populations of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Aquaculture** v. 192, p. 213–224, 2001.
- PARKINSON, D.; PHILIPPORT, J.C.; BARAS, E. A preliminary investigation of spawning migration of grayling in a small stream a determined by radio-tracking. **J. of Fish Biol.**, v. 55, p. 172–182, 1999.
- PETTS, G.E. Perspectives for ecological management of regulated rivers. In: GORE, A.; PETTS, G. E. (ed.). **Alternatives in regulated river management.** Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 3-24.

- PIORSKI, N.M., *et al.* Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Braz. J. Biol.**, v. 68, n. 4, (Suppl.), p. 1039-1050, 2008.
- POKE, F.S. *et al.* Genomic research in Eucalyptus. **Genetica**, v. 125, p. 79-101, 2005.
- POTEAUX, C.; BONHOMME, F.; BERREBI, P. Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in Mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). **Heredity**, v. 82, p. 645-653. 1999.
- POVH, J.A. *et al.* Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica RAPD. **Acta Scientiarum**, v. 27, n. 1, p. 1-10. 2005.
- QUATTRO, J.M.; VRIJENHOEK, R.C. Fitness differences among remnant populations of endangered Sonoran topminnow. **Science**, v. 245, p. 976-978. 1989.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA, M.; BOLIBOK, H.. Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 9, p. 221-238, 2004.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. An Exact Test for Population Differentiation. *Evolution*, **Montpellier**, v. 49, n. 6, p. 1280-1283, 1995.
- REISENBICHLER, R.R., RUBIN, S.P. Genetic changes from artificial propagation of Pacific salmon affect the productivity and viability of supplemented populations. **J. Mar. Sci.**, v. 56, p. 459-466, 1999.
- RHYMER, J. M.; Simberloff, D. Extinction by hybridization and introgression. **Annu. Rev. Ecol. Syst.** n. 27, p. 83-109, 1996.
- ROFF, D.A., BENTZEN, P. The statistical analysis of mitochondrial DNA polymorphisms: chi-square and the problem of small samples. **Mol. Biol. Evol.**, v. 6, p. 539-545, 1989.
- ROJAS, T.C.G., **Utilização de AFLP para estudos genéticos em *Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae)**. 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2008.
- RYDER, O.A. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. **Trends In Ecology And Evolution**, v. 7, p. 9-10, 1986.
- RYMAN N, UTTER F, HINDAR K. Introgression, supportive breeding, and genetic conservation. *In: Ballou JD, Gilpin M, Foose TJ (Ed.) Population management for survival and recovery*. New York: Columbia University Press, 1995. p.341-365.
- SAKAI, A.K.; *et al.* The population biology of invasive species. **Annual Review Ecology And Systematics**, v. 32, p. 305-332, 2001.

- SANCHES, A; GALETTI JR, PM. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Braz. J. Biol.**, São Carlos, v. 67, n. 4, 2007.
- SATO, Y. *et al.* Influence of the abaeté river on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *prochilodus argenteus* in the são francisco river, downstream from the três marias dam, southeastern brazil. **River Res. Applic.** v. 21, p. 939–950, 2005.
- SATO, Y. *et al.* Padrões reprodutivos de peixes da bacia do rio São Francisco. In: GODINHO, H.P; GODINHO, A. L. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: Sografe, 2003. Cap. 13, 458 p.
- 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 conservation status**. Victoria: IDRC, 2004. 380 p.
- SATO, Y.; GODINHO, H.P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. p. 401-413.
- SCHLOTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 20, p 211-215, 1992.
- SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, p. 233-234. 2000.
- SEAL, U.S. Intensive technology in the care of ex situ populations of vanishing species. In: SEAL, U. S.. **Genetics and Plant Populations**. Menlo Park: Benjamin/cummings Pub. Co., Inc., 1988.
- SHANBHAG, B.; SAIDAPUR, S.K.; Atretic follicles and corpora lutea in the ovaries of fishes: structure-function correlations and significance. In **Fish Morphology–Horizons of New Research**, DATTA MUNSHI, J.S.; DUTTA, M.H.M. BALKEMA, A.A. (eds). Brookfield; p.147–168, 1996.
- SHIMODA, N. *et al.* Zebrafish genetic map with 2000 microsatélites markers. **Genomics**, v. 58, p. 219-232, 1999.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus* : Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 407-417, 2000.
- SMITH, L. M. *et al.* Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. **Nature**, v. 321, p. 674-679, 1986.
- SMITH, T.B.; WAYNE, F.W. **Molecular Genetic Approaches in Conservation**. New York: Oxford Univ. Press., 1996. 483 p.
- SNOW, A.A.; PARKER, P.G. Molecular markers for population biology. **Ecology**, v. 79, p. 359-360, 1998.

- SOUSA, A.B. *et al.* A utilização de baixo número de matrizes em piscicultura: perda de recursos genéticos para programas de repovoamento : The effect of a reduced number of breeders on fish culture: loss of genetic resource for stocking programs. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.100-104, 2006.
- SWALES, S. Habitat restoration methods: a synthesis. In: COWX, I. G. (ed.). **Rehabilitation of freshwater fisheries**. Oxford: Fishing News Books, p. 133-137, 1994.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, n. 17, p. 6463-6471, 1989.
- TOLEDO-FILHO, S.A. *et al.* Projeto de Bancos Genéticos na Piscicultura Brasileira. In: **Cadernos de Ictiogenética** São Paulo: Usp, 1999. Vol. 5.
- VOS, P. *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, Wageningen, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- VRIJENHOEK, R.C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal Of Fish Biology**, Vol. 53, p. 394-412. 1998.
- WAPLES, R.S. Evolutionary significant units and the conservation of biological diversity under the endangered species act. In: NIELSEN, J.L. (Org.). **Evolution and the Aquatic Ecosystem: Defining Unique units in population conservation**. Bethesda: American Fisheries Society, 1995.
- 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.
- WASKO, A.P.; GALETTI JR, P.M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia** v. 474, p. 131–137, 2002.
- WEDEKIND, C. Sexual selection and life-history decisions: implications for supportive breeding and the management of captive populations. **Cons. Biol.** v. 16, p. 1204–1211, 2002.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.
- WELCOMME, R.L. **Fisheries Ecology of Floodplain Rivers**. Lodon: Longman Group Limited, 1979. 316 p.
- WELCOMME, R.L. Floodplain fisheries management. In: GORE, J. A.; PETTS, G. E.. **Alternatives in regulated river management**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 210-233.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, n. 24, p. 7213-7218, 1990.

- WILLIAMS, J.G.K. *et al.* DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- ZANIBONI-FILHO, E.; NUÑER, A.P. Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes. In: CYRINO, J.E.P. *et al.* (ed.). **Tópicos especiais em piscicultura de água doce tropical intensiva**. Sociedade Brasileira de Aqüicultura e Biologia, 2004. p. 45-73.
- ZAYKIN, D.V.; PUDOVKIN, A.I. Two programs to estimate significance of chi-square values using pseudo-probability tests. **J. Hered.** v. 84, n. 152, 1993.
- ZHU Z. Y. *et al* Genetic analyses of Asian seabass stock using novel polymorphic microsatellites. **Aquaculture**, v. 256, p.167-173,2006.