

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

**CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO PRELIMINAR DO PEIXE *Prochilodus*
argenteus, UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.**

Beatriz Cutilak Bianchi

Orientadora: **Dra. Terumi Hatanaka**

SÃO CARLOS - SP
Agosto, 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução

CONSTRUÇÃO DO MAPA GENÉTICO PRELIMINAR DO PEIXE *Prochilodus argenteus*, UTILIZANDO MARCADORES MICROSSATÉLITES.

Beatriz Cutilak Bianchi

Dissertação 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.

SÃO CARLOS - SP
Agosto, 2009

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

B577cm

Bianchi, Beatriz Cutilak.

Construção do mapa genético preliminar do peixe *Prochilodus argenteus*, utilizando marcadores microssatélites / Beatriz Cutilak Bianchi. -- São Carlos : UFSCar, 2009.
58 f.

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

1. Genética. 2. *Prochilodus argenteus*. I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)


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

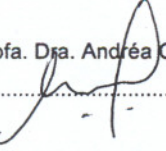
**Construção do mapa genético preliminar do peixe *Prochilodus argenteus*
utilizando marcadores microssatélites**

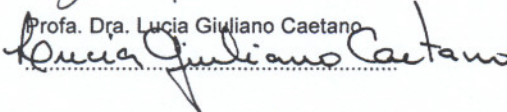
Beatriz Cutilak Bianchi

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Submetida à defesa pública no dia 28/08/2009, tendo sido aprovada.

Presidente: Profa. Dra. Terumi Hatanaka



Membros: Profa. Dra. Andréa Cristina Peripato


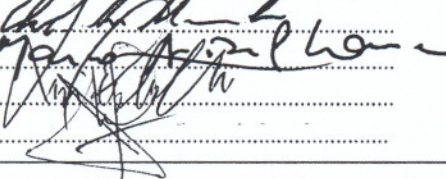
Profa. Dra. Lucía Giuliano Caetano


Dissertação 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 obtenção do título de Mestre em Genética e Evolução, área de concentração: Genética e Evolução.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

Homologado na ____ Reunião Ordinária da CPG,
em ____/____/____.

Presidente: 

Membros: 

AGRADECIMENTOS

- À minha orientadora, Dra. Terumi Hatanaka, pela oportunidade cedida.

- À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

- Ao Prof. Dr. Flávio e ao seu aluno Fernando, por suas colaborações.

- Ao meu noivo, Daniel, amor da minha vida, por me proporcionar momentos maravilhosos que me ajudaram a recuperar a energia! Pelo alicerce, companheirismo, amor absoluto, amparo e compreensão. Obrigada pelo constante carinho e pela ternura com a qual abraça e apóia as minhas causas. Obrigada pela escuta, pelas brincadeiras e incentivos nos momentos difíceis. Agradeço por todos os conselhos e, mais ainda, por compartilhar a vida comigo. EU TE AMO MUITO. Obrigada por tudo, meu Amor.

- Aos meus amigos: Marina, Cervini, Renatinha e Luci, pela amizade e por me acolherem em uma etapa marcante em minha vida. Vocês são muito importantes pra mim e pretendo manter essa amizade pelo resto da vida.

- Ao Pedro, Otávio e Naná, pela sinceridade, carinho, apoio, incentivo e amizade verdadeira.

- À Michelle, por estar presente em todos os momentos, com sua amizade incondicional, palavras sinceras, de conforto e apoio, por sempre torcer por mim e por ser exemplo de pessoa e bondade. Obrigada Amiga!

- Ao meu irmão, Nilo, que mesmo estando a 17.027 km de distância, sempre esteve presente em minha vida. Obrigada pelo seu amor, carinho, apoio, preocupação e compreensão. Você é um presente que ganhei do céu. Tenho muito orgulho e admiração por você!

- Às minhas amigas: Carla, Cris, Dany e Marina, por serem pessoas maravilhosas, amigas, companheiras, se mostrando sempre dispostas a ajudar até mesmo nos momentos mais impertinentes.

- Aos colegas e professores do Departamento de Genética e Evolução, pela convivência e ensinamentos.

- Ao Bruno, amigo de todas as horas, pelo apoio, atenção e incentivo nos momentos difíceis.

- Às minhas eternas amigas, Marcela e Xanda, pelos muitos anos de uma amizade sincera e transparente. Vocês foram (são e serão) muito importantes para o meu

amadurecimento. Obrigada pela amizade verdadeira, pelo carinho, apoio, dedicação, cumplicidade e pela paz que vocês me proporcionam.

- Aos meus amigos: Felipe Galzerani e Pedro Cattony, irmãos que ganhei da vida, pelas conversas e amizade.

- A todos os meus familiares, primos, primas, tios e tias. Pelo convívio, amor, dedicação e ternura.

- Aos amigos: Fefê, Renatinha e Cris, por serem pessoas incríveis e pela grande ajuda nos momentos finais.

- Aos meus pais, Marco e Tereza, sinônimos de força e garra, ensinando-me sempre a seguir em frente, a traçar os melhores caminhos com os melhores valores. Obrigada pelo amor, ensinamentos e exemplos de vida. Sem vocês eu não teria conseguido.

- Aos meus avôs e avós. Muitas saudades de seus carinhos e mimos.

- Ao Enzo, que possui o sorriso mais lindo que já vi e que preenche minha vida de alegria. Por sua pureza e encanto de criança. Por me alegrar em todos os momentos, com carinho, amor e, principalmente, por vir correndo ao me ouvir chegar e me abraçar tão forte, que eu perco até o ar. Eu amo você, Pitoco.

- Aos que sempre torceram por mim e aos que me influenciaram positivamente ao longo da vida. Obrigada a todos vocês!

RESUMO

Um mapa genético preliminar foi construído para a espécie *Prochilodus argenteus*, um peixe endêmico da bacia hidrográfica do rio São Francisco, através de 23 marcadores moleculares microsatélites em uma progênie com 95 indivíduos provenientes de um único cruzamento através da estratégia “*pseudo-testcross*”. Os genitores masculino e feminino foram coletados em diferentes regiões, à jusante da barragem de Três Marias (MG). Apenas 11 (52.4%) marcadores foram alocados em algum grupo de ligação e os restantes não estavam ligados. Vinte e um (91.5%) marcadores segregaram de acordo com a herança mendeliana e apenas dois (8.7%) apresentaram distorção da segregação. O mapa cobriu 297.58 cM do genoma, de acordo com a função de Kosambi. O número de grupos de ligação (3) encontrado no presente trabalho foi muito inferior ao esperado para a espécie (equivalente ao número de cromossomos haplóides, $n = 27$), demonstrando a importância da utilização de um número maior de marcadores moleculares em estudos futuros. Os dados obtidos no presente trabalho serão compilados com as marcas AFLP obtidas por Rojas (2008), visando um mapa genético mais denso. Embora o número de grupos de ligação encontrado tenha sido inferior ao esperado para a espécie, os resultados podem ser considerados como promissores na área de Genética de Peixes do Brasil, já que estudos de mapeamento genético são praticamente inexistentes em peixes neotropicais.

PALAVRAS CHAVE: *Prochilodus argenteus*, Microsatélites, *Pseudo-testcross*, Mapa genético.

ABSTRACT

A preliminary genetic linkage map was constructed for the species *Prochilodus argenteus*, an endemic fish from the São Francisco river basin, using 23 microsatellite markers in a progeny with 95 individuals from a single cross by the pseudo-testcross strategy. The male and female parents were collected in different regions, downstream of the dam of the Três Marias (MG). Only 11 (52.4%) markers grouped in some linkage group and the remaining was unlinked. Twenty-one (91.5%) markers appeared to segregate according to Mendelian inheritance, and only two (8.7%) showed segregation distortion. The map covered 297.58 cM of the genome, according to the Kosambi's function. The number of linkage groups (3) found in this study was much lower than expected for the species (equivalent to the haploid number of chromosomes, $n = 27$), demonstrating the importance of using a larger number of molecular markers in future studies. The data obtained in this work will be compiled with the marks obtained by AFLP by Rojas (2008) in order to obtain a denser genetic map. Although the number of linkage groups found have been lower than expected for the species, the results can be considered promising for the Brazilian Fish Genetics, since genetic mapping studies are virtually absent in Neotropical fish.

KEYWORDS: *Prochilodus argenteus*, Microsatellites, *Pseudo-testcross*, Linkage map. genético.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
1.1. Aspectos Gerais da Bacia do Rio São Francisco	8
1.2. O Peixe Reofílico Curimatá-Pacu (<i>Prochilodus argenteus</i>).....	10
1.3. O Impacto da Construção da Barragens de Três Marias	11
1.4. Importância Econômica.....	13
1.5. Marcadores Moleculares.....	14
1.6. Mapeamento Genético.....	16
1.7. Estudos de Mapas Genéticos em Peixes.....	19
2. OBJETIVO	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1. Local de Coleta e o Cruzamento Realizado	23
3.2. Hipofisacão	25
3.3. Extração do DNA Genômico	25
3.4. Quantificação do DNA	26
3.5. Marcadores Microssatélites	27
3.5.1. Amplificação dos loci de microssatélites.....	27
3.5.2. Visualização dos Resultados das Amplificações dos loci de microssatélites	29
3.5.3. Genotipagem.....	30
3.5.4. Preparo das Amostras.....	30
3.5.5. Análises dos Dados da Genotipagem	31
3.6. Construção do Mapa Genético	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1. Extração e Quantificação do DNA Genômico.....	34
4.2. Integridade do DNA extraído de <i>Prochilodus argenteus</i>	35
4.3. Amplificação dos loci de microssatélites.....	36
4.4. Análise dos Dados da Genotipagem	36
4.5. Construção do Mapa Genético em <i>Prochilodus argenteus</i>	38
5. CONCLUSÕES	44
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais da Bacia do Rio São Francisco

A bacia do rio São Francisco (Figura 1) é a terceira bacia hidrográfica do Brasil e a única totalmente brasileira (KOHLENER, 2003; GABRIEL NETO *et al.*, 2007). Drena uma área de 640.000 km² e ocupa 8% do território nacional (ANDRADE 2002; GODIM FILHO *et al.*, 2004). Na classificação mundial, o rio São Francisco é considerado o 34º rio de maior vazão e o 31º em extensão (GODINHO ; GODINHO, 2003).

O rio nasce no Parque Nacional da Serra da Canastra, no sudoeste do Estado de Minas Gerais, drenando áreas dos Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e o Distrito Federal, além de cortar três biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (KOHLENER, 2003).

Sua calha está situada na depressão São-Franciscana, entre os terrenos cristalinos a leste (serra do Espinhaço, Chapada Diamantina e Planalto Nordeste) e os planaltos sedimentares do Espigão Mestre a oeste, conferindo diferenças quanto aos tipos de águas dos afluentes, onde os rios da margem direita, que nascem nos terrenos cristalinos, possuem águas mais claras, enquanto os da margem esquerda, terrenos sedimentares, são mais barrentos (GABRIEL NETO *et al.*, 2007).

Nos seus 2.700 km de extensão, o rio descarrega uma vazão média de 2.810 m³/s no Oceano Atlântico (GODIM FILHO *et al.*, 2004), e é dividido em quatro trechos denominados regiões fisiográficas: o *Alto São Francisco*, que vai de suas cabeceiras até Pirapora, em Minas Gerais; o *Médio São Francisco*, de Pirapora, onde começa o trecho navegável, até Remanso, na Bahia; o *Submédio São Francisco*, de Remanso até Paulo Afonso, também na Bahia; e o *Baixo São Francisco*, de Paulo Afonso até sua foz, no Oceano Atlântico, na divisa dos Estados de Sergipe e Alagoas (GODIM FILHO *et al.*, 2004; LEDO, 2006).

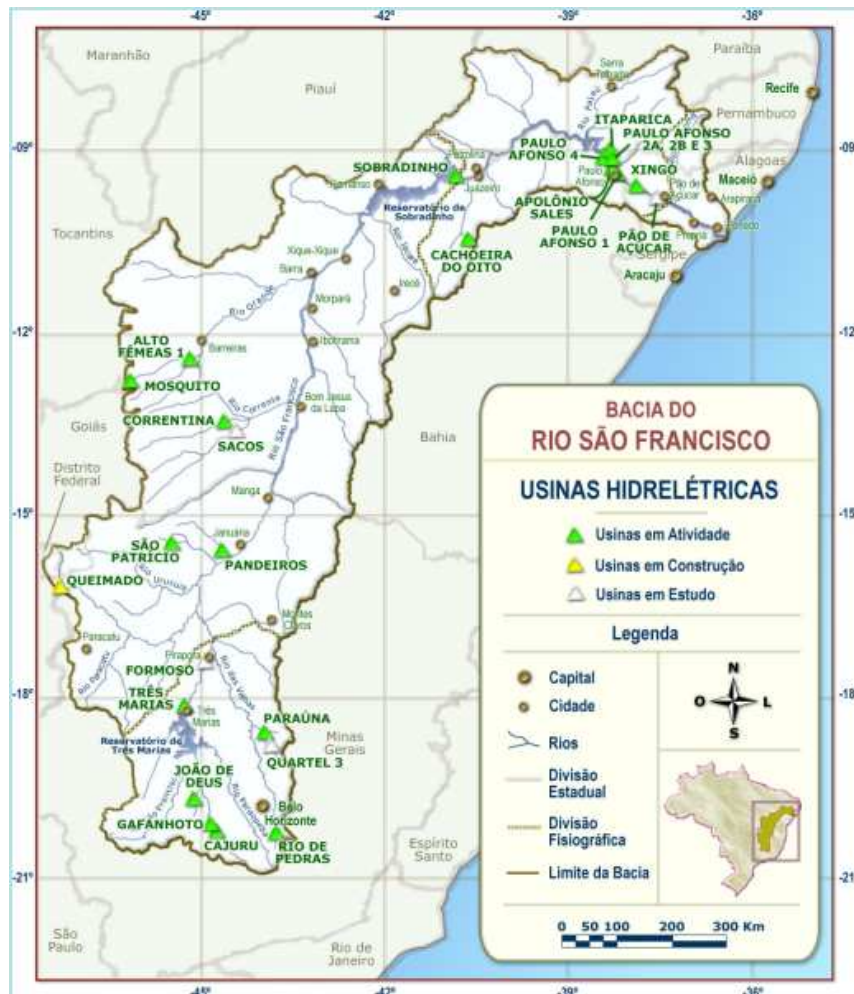


Figura 1: Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco, dividida em regiões fisiográficas e suas principais usinas hidrelétricas (www.ana.gov.br).

Segundo o Plano Diretor para o Desenvolvimento do Vale do São Francisco, PLANVASF (1989), aproximadamente 70% da vazão descarregada no mar é proveniente de Minas Gerais e as maiores vazões são observadas no verão e as menores no inverno, proporcionando um potencial hidroenergético total de 92.522,8 GWh, dos quais 54.713,8 GWh encontram-se em operação nas usinas de Itaparica (PE), Moxotó (AL), Paulo Afonso IV (BA), Sobradinho (BA) e Três Marias (MG), perfazendo uma área total inundada de 5.856,2 km² (KÖHLER, 2003).

Se considerarmos a ausência de estudos específicos, a bacia torna-se um vasto laboratório ímpar de pesquisa e, desde épocas históricas, o rio São Francisco vem sofrendo impactos ambientais antrópicos (HAPONSKI *et al.*, 2007). Na cabeceira principal do rio, o maior problema é o desmatamento para produção de carvão vegetal utilizado pela indústria siderúrgica de Belo Horizonte, que tem reduzido as matas ciliares a 4% da área original (ANDRADE, 2002; GISLER; VASCONCELOS, 2004).

As gaiolas e os barcos a vapor, no trecho navegável da bacia, também destroem a mata ciliar ocasionando alargamento de seu leito e abaixamento de suas águas (KOHLER, 2003). Várzeas, antes alagáveis, deixam de receber água, comprometendo o seu papel de berçários de jovens peixes migradores, pois as barragens constituem uma barreira intransponível na rota migratória dos peixes de piracema, reduzindo seu sucesso reprodutivo (GODINHO ; GODINHO, 2003).

De modo geral, a ictiofauna da bacia do rio São Francisco encontra-se bastante ameaçada em várias regiões, principalmente no trecho à jusante da barragem de Sobradinho até o Oceano Atlântico, à montante da barragem de Três Marias e nos rios Paraopeba e das Velhas, devido, principalmente, ao desmatamento ciliar, à construção de grandes barragens, à poluição industrial e doméstica, ao garimpo, à pesca predatória e à destruição de várzeas e lagoas marginais pelos projetos agrícolas (SATO *et al.*, 2003).

1.2. O Peixe Reofílico Curimatá-Pacu (*Prochilodus argenteus*)

As espécies do gênero *Prochilodus* são amplamente distribuídas em toda a América do Sul, sendo encontradas nas bacias hidrográficas do Brasil (SILVA *et al.*, 2005). A família Prochilodontidae é composta por três gêneros (*Ichthyoelephas*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus*) e 21 espécies (CASTRO ; VARI, 2004), sendo que a espécie *Prochilodus argenteus* apresenta número diplóide de 54 cromossomos (HATANAKA ; GALETTI JR., 2004).

As três espécies do gênero *Prochilodus* encontradas na Bacia do São Francisco são: *P. costatus*, *P. vimboides* e *P. argenteus* (SATO *et al.*, 2003). Popularmente conhecido como Curimatá-Pacu ou Curimatã-Pacu, *Prochilodus argenteus* é uma espécie endêmica da bacia do Rio São Francisco e com hábito alimentar iliófago, ou seja, são peixes que ingerem substrato formado por lodo ou areia (BROOKS *et al.*, 1995; SAMPAIO, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Essa espécie possui corpo alargado, lábios espessos e protáteis, providos de dentículos que servem para raspar o leito do rio, e uma nadadeira dorsal, precedida por um espinho procumbente (SANTOS, 2004). Migram rio acima para desova e possuem alta fecundidade (SATO *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2005; GODINHO, 2006).

Essa espécie apresenta o seu período reprodutivo e sua desova total

estendendo-se de novembro a janeiro na estação chuvosa, coincidindo com a ocorrência de cheias, altas temperaturas e longos fotoperíodos (RIZZO *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008).

Na natureza, a reprodução de peixes teleósteos é regulada por mecanismos endógenos que determinam o período adequado à desova (SANTOS, 2004). Porém, quando as espécies reofílicas (aquelas que migram na época de reprodução) são criadas em cativeiro, essas apresentam uma disfunção no processo reprodutivo, e isso provavelmente é decorrente da ausência de condições ambientais naturais adequadas, (sobretudo fotoperíodo e temperatura), além do estresse provocado pelo confinamento (SANTOS, 2004; SANTOS *et al.*, 2008).

A partir disso, estudos demonstram que, em função da necessidade de controlar a reprodução de peixes em laboratório e disponibilizar alevinos para executar programas de repovoamento e/ou viabilizar o cultivo comercial de espécies de importância econômica, algumas técnicas são desenvolvidas para induzir artificialmente a reprodução de peixes, como, por exemplo, a hipofisação (SANTOS, 2004). Essa técnica vem sendo comumente utilizada nos trabalhos de desova induzida para as espécies do gênero *Prochilodus* (SANTOS, 2004; SATO *et al.*, 2003), onde os primeiros resultados positivos de indução à desova de peixes da bacia do São Francisco foram conseguidos com o Curimatá-Pacu (*Prochilodus argenteus*) e com o Piau-Verdadeiro (*Leporinus elongatus*), no Posto de Piscicultura de Lima Campos, localizado em Icó, no Ceará, do Departamento Nacional de Obras Contra as Secas – DNOCS (SATO *et al.*, 2003).

1.3. O Impacto da Construção da Barragens de Três Marias

Apesar de ser considerado um dos meios de regularização do regime hidrológico de um rio, a construção de barragens ocasiona uma forte degradação do habitat de águas interiores, alterando o próprio regime hidrológico natural, bem como a qualidade da água, além de gerar mudanças nos habitats de desova e nos gatilhos do ciclo de vida, como aqueles que desencadeiam a desova (GODINHO ; GODINHO, 2003; VALENCIO *et al.*, 2003; GISLER ; VASCONCELOS, 2004; SALVADOR, 2006; LOPES *et al.*, 2008).

Quando os reservatórios das grandes barragens não são adequadamente monitorados, a agricultura ribeirinha rouba suas águas que, quando voltam ao seu leito,

vêm impregnadas de agrotóxicos que poluem seu curso, matando a biodiversidade nele existente (KOHLENER, 2003). Outro aspecto importante ocasionado pela construção de barragens ocorre através da penetração de peixes por sucção das máquinas das usinas hidrelétricas, onde o fluxo da água turbinada atrai os peixes para o canal de “fuga” e, na busca de uma via para ultrapassar a barragem, muitos peixes acabam penetrando pelo tubo por sucção (LOPES *et al.*, 2008).

Na calha principal do rio São Francisco são encontradas as principais usinas hidrelétricas, sendo que a maioria delas (Sobradinho, Itaparica, Moxotó, o complexo de Paulo Afonso e Xingó) situa-se no terço inferior do rio e, apenas uma, a de Três Marias, está localizada no terço superior, onde juntas, têm capacidade de geração de 7.902 MW de energia (GODINHO ; GODINHO, 2003).

Localizada no alto São Francisco (S 18° 12' 51" W 45° 15' 51"), a barragem de Três Marias apresenta uma área aterrada de 2.700 m de extensão e altura máxima de 75 metros (SAMPAIO *et al.*, 2003). Em 1961 deu-se sua implantação, sendo, dos grandes reservatórios brasileiros, o mais antigo (PINTO-COELHO, 2006). O reservatório tem como principais objetivos: a regularização do rio São Francisco, aumento do tirante d'água para a navegação, controle de cheias, irrigação, aumento da potência da usina de Paulo Afonso, facilitar a navegação entre Pirapora e Juazeiro, viabilizar a implantação de projetos de irrigação, melhorar o funcionamento das usinas hidrelétricas no Sub-Médio São Francisco, controle de inundação e produção de energia elétrica (GODIM FILHO *et al.*, 2004; SATO *et al.*, 2005).

Em sua cota máxima, o reservatório apresenta uma área de inundação de cerca de 100 mil ha, com volume de 21 bilhões de m³ de água (SATO *et al.*, 2003; PINTO-COELHO, 2006). Possui estratificação térmica no verão, no período de novembro a fevereiro, onde a temperatura da água, nas regiões mais profundas, é mais baixa, variando entre 22,5 a 23,5°C (SAMPAIO *et al.*, 2003; SATO *et al.*, 2005).

No caso do Curimatá-Pacu, tem sido observado que a espécie tem sido afetada pelas condições desfavoráveis oriundas da construção da barragem de Três Marias, apresentando menor tamanho corporal e problemas reprodutivos provavelmente relacionados às mudanças ambientais observadas na região imediatamente abaixo do reservatório (SATO *et al.*, 2003). Por outro lado, na região à jusante do rio Abaeté, onde há condições mais apropriadas para a sua desova durante a piracema, com temperaturas acima de 24°C, vazão e teor de oxigênio dissolvido mais elevados e transparência mais baixa do que o trecho imediatamente abaixo da barragem de Três Marias, tem sido

observada uma alta frequência de peixes em atividade reprodutiva, com fêmeas exibindo ovários com características de desova recente e baixa frequência de atresia folicular (SATO *et al.*, 2003).

1.4. Importância Econômica

Historicamente, o rio São Francisco tem sido uma das principais fontes brasileiras de pescado e sua importância está relacionada ao fornecimento de peixes para a população ribeirinha (BAZZOLI, 2003). Aproximadamente 13% das espécies da bacia do rio São Francisco têm valor comercial para consumo humano, sendo que 80% dessas não conseguem reproduzir-se naturalmente em condições de cativeiro, o que ressalta a importância do desenvolvimento de trabalhos de indução artificial à desova (SATO *et al.*, 2003). No caso dos Curimatás, a espécie produz numerosos ovos após a desova induzida e é considerado um dos peixes mais consumidos e comercializados na bacia do São Francisco (SANTOS, 2004; SANTOS *et al.*, 2008).

A família Prochilodontidae é considerada como uma das mais importantes para a pesca comercial, de subsistência e desportiva em várias regiões do Brasil, especialmente no Nordeste brasileiro (SILVA *et al.*, 2005). Na década de 1980, 20% de todo o pescado capturado no Brasil eram de peixes dessa família (BRITSKI *et al.*, 1988; HATANAKA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008). Na região de Três Marias, *Prochilodus argenteus* é a espécie de piracema mais abundante, representando 50% de toda a produção de pescado (HATANAKA *et al.*, 2006). Com o maior porte dessa família, *Prochilodus argenteus* pode atingir até 15 kg de peso corporal, e maturação sexual quando chegam a 27-28 centímetros de comprimento (BROOKS *et al.*, 1995; SILVA *et al.*, 2005; GODINHO, 2006).

Um levantamento foi realizado entre os meses de Maio de 2000 e Abril de 2001 a respeito das espécies mais capturadas pela pesca artesanal na represa de Três Marias, e foi constatado que *P. argenteus* foi a espécie mais capturada, demonstrando sua importância comercial na bacia do São Francisco (SANTOS, 2004). Segundo o IBAMA, a produtividade média nacional de Curimatás ultrapassou 30.000 toneladas em 2003. Em 2004, o Estado de Minas Gerais produziu 1.277,5 toneladas referentes à pesca extrativa do *Prochilodus*, representando 12% da produção total de pesca extrativa continental (IBAMA, 2004). Em 2005 a produção foi de 1.690,0 toneladas, com 14.5%

da produção total de pesca extrativa continental (IBAMA, 2005). O último boletim feito pelo IBAMA foi em 2006, onde a região Nordeste obteve uma produção total de 36.049 toneladas, representa 18,9% da produção da aquicultura continental. Já para o gênero *Prochilodus*, 1.521 toneladas foram produzidas no estado de Minas Gerais, onde a pesca representou 14.5% da pesca total extrativa continental (IBAMA, 2006).

Devido à importância da espécie em questão, a Estação de Piscicultura de Três Marias – CODEVASF, em Minas Gerais, vem, periodicamente, realizando repovoamentos com espécies nativas na região de Três Marias, desde os meados da década de 1980 (GODINHO ; GODINHO, 2003; SAMPAIO, 2006). De acordo com Pinto-Coelho (2006), já foram liberados cerca de 8 milhões de alevinos das espécies *Prochilodus argenteus* (curimatá-pacu), *P. costatus* (curimatã pioa), *Brycon orthothenia* (matrinchá), *Salminus sp.* (dourado), *Leporinus elongatus* (piauí verdadeiro), *Pseudoplatystoma corruscans* (surubim) e *Lophiosilurus alexandri* (pacamã), com tamanhos de 5 a 20 cm em vários riachos, rios e reservatórios do Alto São Francisco. Porém, de acordo com Sato *et al.* (2003), a CODEVASF encontra dificuldades em induzir a desova dos peixes migradores quando se utiliza a água proveniente do reservatório de Três Marias, cuja tomada encontra-se no mesmo nível daquela que movimentada as turbinas do fundo do reservatório. Do mesmo modo, quando submetidas à hipofisacção, as fêmeas de Curimatás-Pacu não respondem ao tratamento quando a temperatura da água apresenta-se abaixo de 23°C, mas ao elevar essa temperatura para 25°C, ocorre uma melhora gradativa na resposta ao tratamento hormonal (SATO *et al.*, 2003).

1.5. Marcadores Moleculares

Nos últimos anos tem aumentado significativamente a aplicação de marcadores moleculares na detecção da variabilidade genética, ao nível do DNA, tanto em estudos genéticos como na prática do melhoramento vegetal e animal, bem como em pesquisas de mapeamentos genéticos (ALMEIDA, 2007). Marcadores moleculares são definidos como todo e qualquer fenótipo oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (correspondentemente a regiões expressas ou não do genoma), podendo ser utilizados como marcadores genéticos, caso

se comportem segundo as leis básicas de herança mendeliana (FERREIRA ; GRATTAPAGLIA, 1998).

Conforme a metodologia empregada para identificá-los, os principais tipos de marcadores moleculares são classificados em dois grupos: hibridização ou amplificação de DNA. Entre os identificados por hibridização estão os marcadores RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) e os Minisatélites ou *locus* VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”). Já aqueles revelados por amplificação incluem os marcadores do tipo: RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”); SCAR (“Sequence Characterized Amplified Regions”); STS (“Sequence Tagged Sites”) ou ASA (“Amplified Specific Amplicon”); Microssatélites (SSR- “Simple Sequence Repeats”) e AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”) (Dias-Salman *et al.*, 2009). Em um mapa genético, tanto os marcadores dominantes (RAPD; AFLP), como os co-dominantes (RFLP; SSR) podem ser empregados, porém os microssatélites (SSR) têm sido a ferramenta mais valiosa para as realizações de estudos de mapeamento (MELANIA *et al.*, 2006).

Os microssatélites são sequências simples de DNA repetitivo distribuídas ao longo do genoma de organismos eucariotos e procariotos, sendo caracterizados por repetições de 1 a 6 pares de bases (pb) dispostas em *tandem* (TAUTZ, 1989; ZANE *et al.*, 2002; WRIGHT ; BENTZEN, 2004). Esses marcadores apresentam todas as qualidades requeridas de um bom marcador molecular, ou seja, são altamente polimórficos, exibem um padrão de herança mendeliana, são multialélicos e possuem característica co-dominante (PAIXÃO *et al.*, 2008; ELLEGREN, 2004). Além disso, também são considerados um dos principais marcadores a serem beneficiados pela utilização da técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction), devido à redução significativa no tempo despendido para a identificação dos genótipos (ZANE *et al.*, 2002; SCHLOTTERER, 2004; ELLEGREN, 2004).

Desse modo, os microssatélites se tornaram uma excelente ferramenta no mapeamento genético, pois as diferenças de comprimento do número de repetições podem ser evidenciadas na PCR, através de iniciadores (*primers*) correspondentes às sequências que os flanqueiam (XU *et al.*, 2009).

1.6. Mapeamento Genético

Os estudos de mapeamento visam encontrar marcadores moleculares que possam cobrir o genoma de uma espécie (MELANIA *et al.*, 2006). A construção de mapas genéticos permite evidenciar as distâncias estimadas entre marcadores a partir de recombinações em cruzamentos experimentais, definindo a ordem linear dos genes sobre os cromossomos e as distâncias que os separam (FERREIRA, 2006; XU *et al.*, 2009).

Para que um mapa seja considerado completo, todos os marcadores genéticos deverão estar ligados, sugerindo que todas as regiões do genoma estejam representadas, e quando o número de grupos de ligação obtido for igual ao número de cromossomos haplóides da espécie estudada (TEIXEIRA, 2004; MORAES, 2005). No entanto, outros requisitos são fundamentais quando se têm por objetivo a construção de um mapa genético, como: i) o tamanho da população de mapeamento; ii) a escolha dos genitores e, iii) o tipo de cruzamento a ser realizado (SILVA, 2007; FARIA, 2007).

Em mapas genéticos, os marcadores genômicos só são informativos quando são polimórficos, pois dessa forma permitem identificar a posição e acompanhar a herança de genes que possuem efeito fenotípico e que estão ligados (SILVA, 2007). A construção desses mapas é feita através de dados oriundos de populações segregantes, usualmente, retrocruzamentos, geração F₂, RILs (Recombinant Inbred Lines) e duplo-haplóides (Ferreira, 2006). Entretanto, a partir de 1994, uma nova técnica de cruzamento, desenvolvida por Grattapaglia & Sederoff, vem sendo explorada por diversos autores. Essa estratégia, denominada “*pseudo-testcross*” ou “pseudocruzamento-teste”, permite que a construção de mapas de ligação seja baseada em uma progênie F₁, a partir de genitores altamente heterozigotos (GRATTAPAGLIA ; SEDEROFF, 1994). Portanto, para essa abordagem, a configuração do cruzamento não precisa ser planejada *a priori*, como em um cruzamento teste clássico, mas pode ser inferida *a posteriori*, após a análise de segregação dos marcadores na progênie (GRATTAPAGLIA ; SEDEROFF, 1994).

Essa estratégia tem sido comumente aplicada em estudos com plantas (GRATTAPAGLIA ; SEDEROFF, 1994) e, de maneira crescente, vem sendo utilizada em peixes. Em *Paralichthys olivaceus*, o linguado japonês, foram obtidos dois mapas de ligação, um para cada genitor, com 352 marcas de AFLP e 111 *loci* de microssatélites. O mapa de ligação do genitor masculino foi formado com 25 grupos de ligação,

enquanto o do genitor feminino apresentou 27 grupos de ligação. O comprimento total do mapa foi estimado em 1000-1200 cM e 96% das marcas estavam ligadas (COIMBRA *et al.*, 2003).

Em *Salmo salar*, foi também analisada a F1 resultante do cruzamento de genitores de famílias distintas e o mapa de ligação do genitor feminino foi caracterizado por 33 grupos de ligação, enquanto o do masculino, 31 grupos foram observados. Marcadores AFLP presentes em ambos os genitores, com segregação 3:1 e marcadores microssatélites foram eficazmente utilizados como marcadores pontes na integração dos dois mapas (MOEN *et al.*, 2004).

Uma outra espécie bastante explorada no Japão, o *yellowtail*, teve seu mapa de ligação construído a partir da análise de segregação de 217 *loci* de microssatélites em uma progênie de 90 indivíduos procedentes também da F1 e oriundos do cruzamento entre *Seriola quinqueradiata* e *S. lalandi* (OHARA *et al.*, 2005). O mapa da fêmea (*S. quinqueradiata*) consistiu de 25 grupos de ligação, com um comprimento de 473.3 cM e uma distância de 2.7 cM entre os marcadores. Por outro lado, no do macho (*S. lalandi*) foram observados 21 grupos, com um comprimento de 584.3 cM e uma distância entre os marcadores de 4.8 cM. O comprimento total estimado foi de 1.715,3 cM.

Em outro estudo, utilizando a mesma estratégia acima, foi reportado para duas espécies de carpa *Hypophthalmichthys molitrix* e *Aristichthys nobilis*, em que a F1 foi obtida do cruzamento utilizando um genitor de cada espécie. O mapa para *H. molitrix* com 271 marcadores (48 microssatélites e 223 AFLP), resultou em 27 grupos de ligação. Por outro lado, para o mapa de *A. nobilis*, os 153 marcadores analisadas (27 microssatélites e 126 AFLPs) foram caracterizadas em 30 grupos de ligação. No final, 18 marcadores microssatélites apresentaram-se comuns aos dois mapas (LIAO *et al.*, 2007).

Desse modo, a partir da escolha da população de estudo, dos marcadores moleculares a serem utilizados e do tipo de cruzamento a ser realizado, espera-se encontrar, para cada marcador, um padrão de segregação mendeliano típico, possibilitando analisar as relações genótípicas e estimar as recombinações a partir de pressupostos provenientes de modelos probabilísticos. O teste de aderência de qui-quadrado (χ^2) é comumente utilizado em estudos de mapeamento para verificar se um *locus* está segregando de acordo com as leis Mendelianas (MORAES, 2005). Para isso, é feita uma comparação entre o número de indivíduos observados em cada classe com o

esperado, de acordo com a razão de segregação e com o tipo de população estudada (FERREIRA, 2006). Este teste é bastante útil e eficiente, pois além de levar em consideração os desvios ocorridos entre os valores esperados e observados, também é sensível ao tamanho da amostra (FERREIRA, 2006). Ocorrendo a presença de marcadores que fogem da segregação mendeliana clássica, diz-se ter ocorrido a Distorção da Segregação (WANG *et al.*, 2009; XU, *et al.*, 2009).

Para estimar a distância relativa entre duas características ligadas, utiliza-se a frequência de recombinação. Em 1913, Sturtevant estabeleceu que a frequência de quiasmas entre dois genes ligados é proporcional à distância física entre ambos e esse princípio é a base para qualquer mapeamento genético (STURTEVANT, 1913). As unidades de mapa são descritas em centiMorgan (cM) e uma unidade de mapa equivale a aproximadamente 1% de recombinação quando os marcadores estão bastante próximos, ou podem diferir da porcentagem de recombinação quando estão mais distantes em vista da ocorrência de “*crossing-over*” duplo, triplo etc (STURTEVANT, 1913). É oportuno salientar que 1 cM corresponde a cerca de 1.000.000 pares de bases de DNA (WEIR, 1990; NAVIDI ; ARNHEIM, 1994).

Quanto as funções de mapeamento, duas são frequentemente utilizadas na correção das distâncias calculadas em porcentagem de recombinação para a distância em centiMorgan (FERREIRA ; GRATTAPAGLIA, 1998). Essas funções são: Kosambi (1944) e Haldane (1919). Porém, essas se distinguem pelo fato de que a função de Kosambi admite a possibilidade da interferência na ocorrência de recombinação entre regiões próximas, enquanto que a de Haldane não pressupõe tal interferência (KOSAMBI, 1944).

Tendo em vista todos os requisitos citados, a construção de mapas genéticos é considerada um passo importante para uma variedade de aplicações genômicas, tais como reprodução seletiva em aquicultura, estudos comparativos da evolução cromossômica e identificação de *locus* que desempenham papéis importantes na evolução de uma espécie e em sua conservação (MCCLELLAND & NAISH, 2008).

1.7. Estudos de Mapas Genéticos em Peixes

Nos últimos anos, as tecnologias baseadas em DNA têm possibilitado a obtenção de mapas genéticos de qualquer espécie em um período de tempo relativamente curto, desde que algum grau de variação genética exista nas famílias que estão sendo analisadas (DAVIS *et al.*, 1998; SCHLOTTERER, 2004; LEE *et al.*, 2005). Desta forma, a utilização de técnicas de biologia molecular tem mostrado significativos avanços em estudos com algumas espécies de peixes, abrindo um novo horizonte para o melhoramento genético, beneficiando o setor produtivo de cultivo de peixes como para o salmão do Atlântico, catfish, truta e tilápia (LIU *et al.*, 1999; LUNDIN *et al.*, 1999; PALTI *et al.*, 1999; AGRESTI *et al.*, 2000). Entretanto, no Brasil, são escassos os estudos relacionados ao mapeamento genético de espécies de peixes de interesse econômico ou potencialmente úteis em programas de piscicultura (HATANAKA *et al.*, 2006).

Postlethwait *et al.* (1994) construíram o primeiro mapa genético da espécie *Danio rerio*, conhecida popularmente como paulistinha ou “zebrafish”, através de um painel com 94 embriões haplóides, 401 marcadores RAPD e 13 marcadores microssatélites a partir de *primers* já publicados na literatura. Neste estudo, foram identificados 29 grupos de ligação e, para os autores, a construção desse mapa genético pode auxiliar na identificação de genes candidatos a mutações, na caracterização de rearranjos cromossômicos e no estudo da evolução do genoma.

Em outras espécies como *Oreochromis niloticus* (tilápia), foi desenvolvido um mapa genético a partir de 62 microssatélites e 112 fragmentos AFLPs, a fim de identificar QTLs, caracterizar bancos de germoplasma de fazendas de criação de tilápias e auxiliar a produção de melhores peixes para a aquicultura (KOCHER *et al.*, 1998). Nesse estudo, foram descritos 30 grupos de ligação cobrindo 22 cromossomos da espécie, sendo que 24 desses grupos possuíam ao menos um marcador microssatélite.

Lee *et al.* (2005) deram continuidade ao mapeamento genético em tilápias a partir da geração F2 do cruzamento entre *O. niloticus* e *O. aureus*. O mapa continha 525 marcadores microssatélites distribuídos em 24 grupos de ligação. Com uma produção mundial de mais de dois milhões de toneladas ao ano, espera-se que o desenvolvimento desse mapa genético auxilie o cultivo econômico de tilápias como alimento nos vários países em que a espécie foi introduzida.

O mapa genético de *Sparus aurata* L., conhecida popularmente como dourada,

foi construído utilizando 204 marcadores microssatélites, sendo encontrados 26 grupos de ligação e o comprimento total do mapa foi de 1.241,9 cM. Segundo os autores, esse mapa de ligação fornece um sólido quadro comparativo para análises de QTL em *S. aurata*, sendo um passo importante para a identificação de *loci* genéticos envolvidos na determinação das características economicamente importantes (FRANCH *et al.*, 2006).

Um mapa genético foi elaborado para a espécie *Oncorhynchus mykiss*, conhecida como truta arco-íris, baseado na análise de segregação de mais de 900 marcadores microssatélites em duas linhagens genotipicamente haplóides. Foram encontrados 31 grupos de ligação, obtendo um mapa com o tamanho total de 2.750 cM. Os centrômeros foram mapeados para todos os 31 grupos de ligação e a estrutura metacêntrica ou acrocêntrica do centrômero foi confirmada posteriormente com hibridação *in situ* fluorescente. Os autores sugerem que através desse novo mapa será possível cobrir todo o conjunto dos braços dos cromossomos, além de fornecer, futuramente, um quadro útil para a integração de mapas da truta arco-íris. Isso facilitará a identificação de genes candidatos nos estudos de QTL (GUYOMARD *et al.*, 2006).

O primeiro mapa genético da espécie *Lates calcarifer* foi realizado por Wang *et al.* (2007). Duzentos e quarenta microssatélites foram utilizados neste estudo e foram encontrados 24 grupos de ligação. O comprimento total do mapa da fêmea foi de 873.8 cM e do macho foi de 414.5 cM, com uma média entre os marcadores de 6.20 cM e 4.70 cM, respectivamente. Os autores ressaltam que este mapa não somente será útil para mapear *loci* de características quantitativas (QTLs), como também para o entendimento da evolução do genoma do peixe.

Reid *et al.* (2007) construíram um mapa genético para a espécie alabote-do-atlântico (*Hippoglossus hippoglossus* L.), com 258 marcadores microssatélites e 346 AFLPs. Vinte e quatro grupos de ligação foram identificados, coerentes com os 24 cromossomos da espécie. A distância total do mapa foi de 1562,2 cM na fêmea e 1459,6 cM no macho, com uma média de resolução de 4,3 cM e 3,5 cM, respectivamente. A localização do centrômero foi estimada em 19 dos 24 grupos de ligação.

Recentemente, Sanetra & Meyer (2008) construíram um mapa genético da espécie *Astatotilapia burtoni*, usando 208 marcadores microssatélites, dos quais 148 foram recentemente desenvolvidos. O mapeamento foi derivado de duas linhagens puras de laboratório para a obtenção de uma progênie F2. Este mapa revelou 20 grupos de ligação, cobrindo 2.265 cM do genoma, com uma média entre os marcadores de 10,7 cM.

Kang *et al.* (2008) construíram uma mapa para *Paralichthys olivaceus* baseado em 180 marcadores microssatélites e 31 ESTs. Vinte e quatro grupos de ligação foram identificados, consistentes com os 24 cromossomos da espécie. O comprimento estimado do mapa foi de 1.001,3 cM, de acordo com a função de Kosambi. A média da distância entre os marcadores foi de 4,7 cM. Os autores sugerem que este mapa de ligação pode ser utilizado para análises de QTLs, além de ser útil em programas de melhoramento.

Em *Prochilodus argenteus*, Rojas (2008) estabeleceu 9 grupos de ligação, utilizando 15 combinações de *primers* AFLP e 189 indivíduos de um cruzamento F1, através da estratégia *pseudo-testcross*. Os *primers* utilizados geraram 46 marcas heterozigóticas para os genitores, com segregação mendeliana de 1:1. O mapa referente ao genitor feminino apresentou 3 grupos de ligação e o comprimento do genoma analisado foi de 128,45 cM, e o mapa do genitor masculino também consistiu em 3 grupos de ligação com comprimento total de 192,67 cM. Marcadores comuns aos dois genitores, com segregação mendeliana de 3:1, foram utilizados como pontes na integração dos mapas. O mapa integrado foi formado por 9 grupos de ligação, o que correspondeu a 442,08 cM de genoma analisado.

2. OBJETIVO

Tendo em vista a importância econômica de *Prochilodus argenteus* na bacia do Rio São Francisco e, considerando a ausência de estudos de mapeamento genético em peixes neotropicais, o presente estudo teve como objetivo:

- ◆ Construir o mapa genético preliminar de *P. argenteus* por meio da identificação dos grupos de ligação, com base na análise da progênie F1, através da estratégia “*pseudo-testcross*”, utilizando marcadores microssatélites.

Desta forma, os dados do presente trabalho poderão subsidiar futuros estudos de identificação de regiões que controlam características de importância econômica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de Coleta e o Cruzamento Realizado

A coleta e o desenvolvimento do cruzamento para a obtenção da geração F1 foram feitos em colaboração com o pesquisador Dr. Yoshimi Sato da Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF).

Visando uma progênie altamente heterozigótica, foi realizada a estratégia *pseudo-testcross* (GRATTAPAGLIA ; SEDEROFF, 1994). Essa técnica é considerada muito eficiente para a construção de mapas genéticos de ligação e pode ser aplicada a qualquer espécie, mesmo sem o conhecimento genético prévio, permitindo utilizar qualquer população F1 derivada do cruzamento entre dois indivíduos geneticamente divergentes (BORTOLOTO, 2006). Dessa forma, a geração F1 obtida do cruzamento de uma mesma espécie heterozigota, é equiparada a uma progênie F2 (COIMBRA *et al.*, 2003; MOEN *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2009).

Desse modo, dois indivíduos da espécie *Prochilodus argenteus* (Figura 2) foram coletados na região do alto-médio São Francisco e o cruzamento foi realizado a partir de um genitor masculino, procedente da região à jusante da confluência dos rios Abaeté e São Francisco, a cerca de 30 km à jusante da barragem de Três Marias (MG), e um genitor feminino capturado imediatamente abaixo da barragem (Figura 3). O planejamento deste cruzamento foi baseado em trabalhos de variação genética anteriormente realizados com a espécie, onde Hatanaka & Galetti, 2003, através de estudos com microssatélites e RAPD, observaram que na região próxima a barragem de Três Marias a espécie apresenta menor variabilidade genética, além de menor número de alelos exclusivos quando comparados aos indivíduos da região abaixo da confluência dos rios São Francisco e Abaeté.

O desenvolvimento do cruzamento e coleta dos alevinos foram realizados na estação de Hidrobiologia e Piscicultura de Três Marias (CODEVASF).



Figura 2: Foto ilustrando um dos exemplares de *Prochilodus argenteus* da F1.

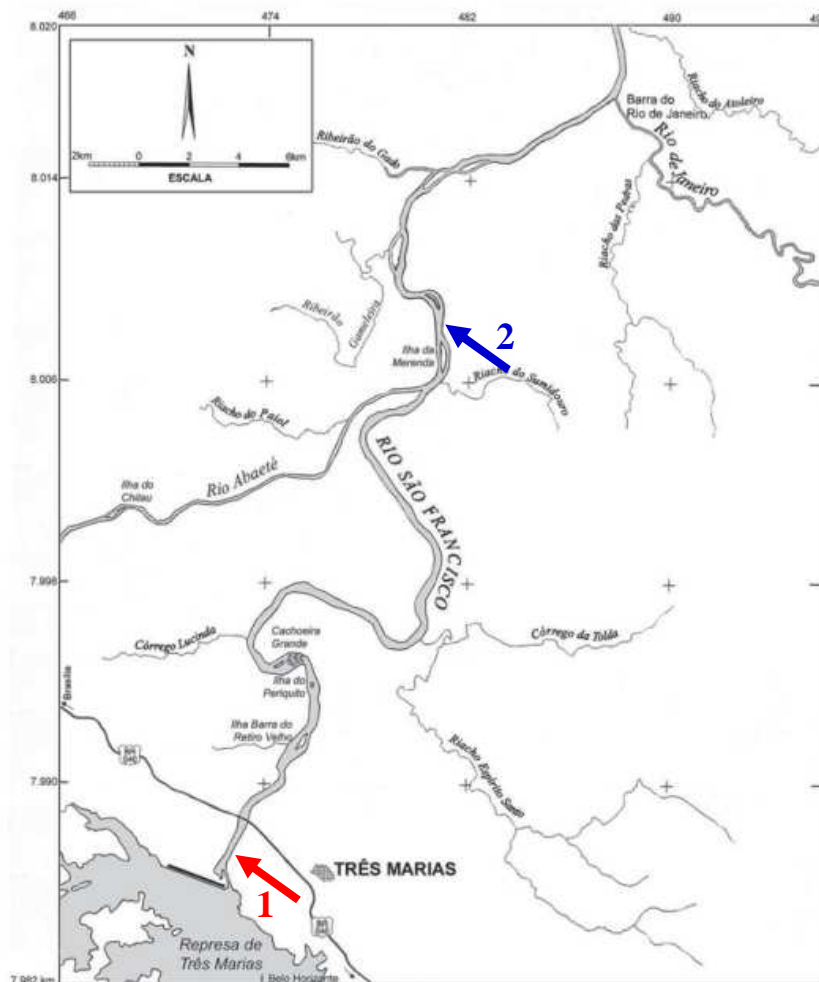


Figura 3: Mapa do local da coleta de ambos os parentais de *P. argenteus*, na Bacia do Rio São Francisco. O genitor feminino foi capturado imediatamente abaixo da barragem de Três Marias (MG), representado no mapa pelo algarismo 1, em vermelho. O genitor masculino, procedente da região à jusante da confluência dos rios Abaeté e São Francisco, ilustrado pelo algarismo 2, em azul, no mapa. (Ilustração retirada e modificada de Sato *et al.*, 2003).

3.2. Hipofisação

Também realizada na CODEVASF, a hipofisação ocorreu por meio de uma dose de extrato bruto de hipófise de carpa (contendo 2,8 mg/Kg de peso corporal) no genitor masculino, e duas doses no genitor feminino. Essas doses foram aplicadas com um intervalo entre elas de, aproximadamente, 16 horas, sendo que a primeira dose continha 0,8 mg/Kg e a segunda, 6,0 mg/Kg.

A extrusão dos ovos se deu $227,3 \pm 9,3$ horas - grau (tempo necessário para a desova em hora x temperatura da água em °C) após a aplicação da segunda dose na fêmea (Sato *et al.*, 1996).

O procedimento utilizado na fertilização dos ovos foi o método “seco”, onde os gametas são misturados sem o contato direto com a água e, somente após a fertilização, são então colocados na água. Em 30 de Dezembro de 2005, cerca de 100 alevinos pós-larvas foram adicionados em um tanque de 600 m³. Nos dias 11 e 12 de Setembro de 2006, foram coletados 189 alevinos com, aproximadamente, 9 meses de idade.

3.3. Extração do DNA Genômico

O DNA genômico de cada indivíduo foi extraído a partir de amostras de fígado e tecido muscular, ambos fixados em etanol 100%, seguindo o protocolo proposto por Sambrook *et al.* (1989), (método fenol /clorofórmio / álcool isoamílico), com algumas modificações.

Aproximadamente 100 mg do tecido foi macerado em nitrogênio líquido, com auxílio de um cadinho e um pistilo, até a obtenção de um pó homogêneo e fino. Posteriormente, foi adicionado 1,0 mL de solução de digestão (NaCl 0,4M; EDTA 0,1M pH 8,0; Tris HCl 0,01M; RNase-100 µg/mL; SDS 0,1% e água ultra pura autoclavada q.s.p) e homogenizado bem. Feito isso, essa suspensão foi transferida para microtubos de 2,0 mL e mantidos em banho-maria à 37°C durante 1,5 horas. Após essa etapa, foi adicionado 100 µg/mL de Proteínase K (20mg/mL) e esse material foi incubado novamente em banho-maria por 2 horas, a 55°C. Em seguida, foi acrescentando o mesmo volume de solução: fenol/ clorofórmio/ álcool isoamílico (50:48:2). As amostras

foram agitadas suavemente por 20 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi transferido para outro microtubo de 2,0 mL.

Após esse procedimento, foram acrescentados NaCl 1M e 2 volumes iguais de etanol absoluto gelado, homogeneizando as amostras suavemente, visando a precipitação do DNA. As amostras foram mantidas a -80°C por 30 minutos. Decorrido esse período, o material foi centrifugado a 10.000 rpm por 10 minutos e em seguida, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* que se formou nessa centrifugação foi lavado com 200µl de etanol 70% gelado e uma nova centrifugação a 10.000 rpm foi feita durante 5 minutos, onde o sobrenadante foi descartado novamente. Para finalizar todo o procedimento, o DNA foi seco em uma estufa a 37°C, ressuspensionado em TE (Tris- HCl 10mM; EDTA 1mM) e armazenado a -20°C.

A verificação da integridade do DNA das amostras ocorreu por meio de eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão de corrida TBE 1X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3), através da comparação com um marcador de concentrações de DNA conhecidas (Low DNA Mass LadderTM, Invitrogen Life Technologies).

3.4. Quantificação do DNA

Todas as bases nitrogenadas absorvem a luz ultravioleta, e os ácidos nucleicos são caracterizados por uma forte absorção em comprimentos de onda próximos aos 260 nm. Em vista disso, a quantificação do DNA foi realizada por espectrofotometria com luz ultravioleta, utilizando a relação $1 \text{ DO} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$ de DNA (Maniatis *et al.*, 1982). Além da concentração de DNA, também foi observada a relação 260/280 (ácidos nucleicos/proteínas) para a verificação da pureza e qualidade do DNA. Segundo Sambrook *et al.* (1989), o ideal é que esta relação esteja entre 1.7 a 2.0. Posteriormente, cada amostra foi diluída com TE, visando à padronização da concentração final do DNA em 50 ng/µl.

3.5. Marcadores Microssatélites

3.5.1. Amplificação dos loci de microssatélites

Para as reações de amplificação (PCR), dos 37 loci microssatélites existentes no GenBank, foram utilizados 30 loci (Tabela 1) (BARBOSA *et al.*, 2006; BARBOSA *et al.*, 2008).

Para essas amplificações foi utilizado o protocolo de Schuelke (2000) (Figura 4), onde uma calda universal de 18 pares de bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), é adicionada à sequência *foward* dos *primers* na posição 5'- 3'. Durante os primeiros ciclos da PCR essa sequência *foward* é incorporada ao produto de amplificação. Um *primer* universal M13 marcado com fluorescência (NED ou HEX ou FAM) é incorporado ao produto da PCR nos ciclos subsequentes da reação, permitindo que o fragmento amplificado possa ser detectado pelo sistema de laser do sequenciador automático.

Essa metodologia vem sendo comumente empregada, pois além de ser mais econômica, permite que o M13 seja adicionado em todos os *primers foward* utilizados no presente estudo.

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

<i>Loci</i>	Unidade repetitiva	Amplitude (pb)	Número de Acesso GenBank
Par10 ¹	(TC) ₁₁	178-208	DQ367227
Par12 ¹	(AAAC) ₇	192-232	DQ367228
Par13 ¹	(GT) ₂₄	242-290	DQ367229
Par14 ¹	(TGTC) ₅	232-278	DQ367230
Par15 ¹	(CT) ₁₉ (GTCT) ₁₀ (GT) ₂	144-196	DQ367231
Par21 ¹	(ATGA) ₆	165-193	DQ367233
Par26 ¹	(GA) ₃ (CAGA) ₉	256-266	DQ367234

Par31 ¹	(GAGT) ₄ (GA) ₅ (GGGA) ₃ (GA) ₄	267-279	DQ367235
Par34 ¹	(CA) ₈	350-384	DQ367240
Par35 ¹	(GA) ₃ (GTGA) ₆ (GAAA) ₂ (GA) ₆	252-274	DQ367240
Par43 ¹	(GA) ₆ (CA) ₂ (CAGA) ₄ (GA) ₂₁	241-299	DQ367237
Par53 ¹	(GTT) ₂ A(GTTT) ₆	164-192	DQ367238
Par54 ¹	(GT) ₄₄	214-262	DQ367239
Par66 ²	(AACA) ₁₂	153-185	DQ524172
Par69 ²	(TTAT) ₇ (TCAT) ₆	222-256	DQ524173
Par712	(GA) ₂₄	237-281	DQ524174
Par76 ²	(CAGT) ₁₆	226-242	DQ524175
Par80 ²	(CT) ₃₇	221-279	DQ524176
Par82 ²	(CT) ₂₇	177-209	DQ524177
Par83 ²	(CACT) ₁₁	264-300	DQ524178
Par85 ²	(AG) ₂₅	227-271	DQ524179
Par86 ²	(GA) ₄₆	135-181	DQ524180
Par89	(TCTA) ₇	259-267	EF433324
Par91	(CAAA) ₈	183-211	EF433325
Par101	(GA) ₇	216-236	EF433329
Par103	(GTCTCT) ₃ (CT) ₆	258-304	EU252617
Par104	(GA) ₂₁	218-280	EF433331
Par110	(CAGA) ₁₄ (TAGA) ₁₀	235-279	EU252628
Par115	(TAGA) ₁₁	136-204	EU255784
Par118	(ATT) ₂ (CATT) ₆	200-220	EU255785
Par119	(CTGT) ₆	206-234	EU255786

¹ Barbosa *et al.* (2006)

² Barbosa *et al.* (2008)

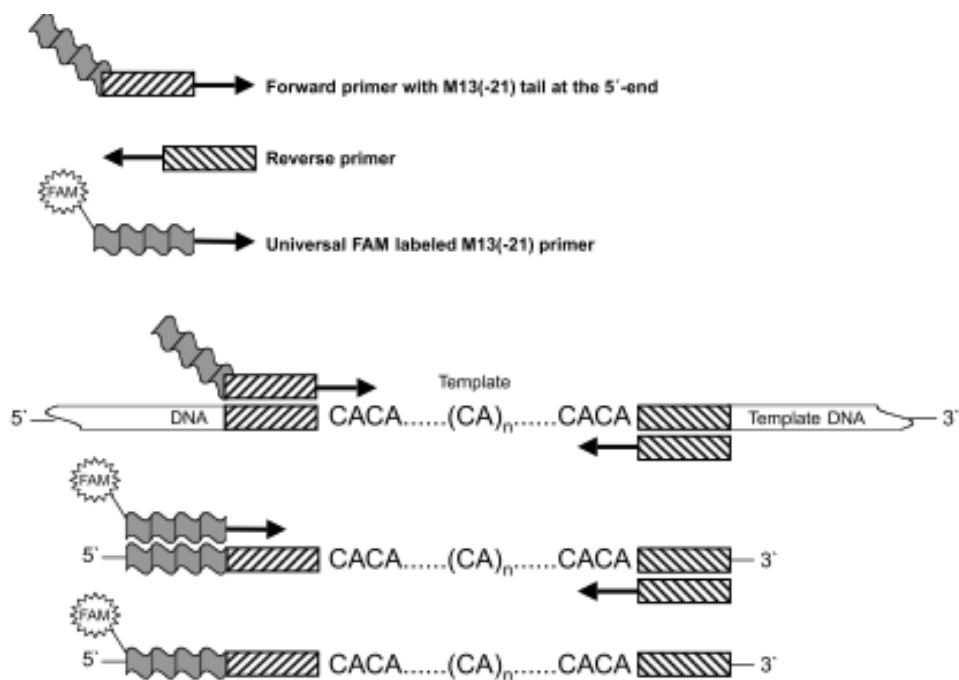


Figura 4: Esquema ilustrativo do funcionamento do protocolo desenvolvido por Schuelke (2000) para amplificação de um fragmento de interesse, onde um conjunto de 3 *primers* é utilizado (*primer* M13 marcado com fluorescência NED, HEX ou 6-FAM; *primer Forward* com adição de uma cauda complementar ao M13 na região 5° e *primer Reverse* de cada *locus*). Nos últimos ciclos da PCR, o *primer* M13 marcado com fluorescência é incorporado ao produto final.

As amplificações foram feitas em um termociclador PTC-100 (MJ-Research), programado para uma desnaturação inicial de 94°C (5 min), seguido de 30 ciclos de 30s a 94°C, 47-65° por 45s e 8 ciclos adicionais, iniciando a 94°C por 30s, 53° por 45s, finalizando a uma temperatura de extensão de 72°C por 10 min. Em cada reação foram utilizados 0.2 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão de amplificação 1x, 1.5 mM de MgCl₂, 1 pmol do *primer Forward*, 4 pmoles do *primer Reverse* e do *primer* M13, 0,5 U de *Taq* DNA Polimerase e 100 ng/μl de DNA, completando com água milli-Q para um volume final de 10 μl.

3.5.2. Visualização dos Resultados das Amplificações dos loci de microssatélites

As amostras de PCR foram visualizadas em gel de agarose 1%. Esse gel foi preparado com 100 mL de TBE 1X (Tris 89 mM; Ácido Bórico 89 mM e EDTA 2,5 mM, pH 8,3) e 1,0 g de agarose. Posteriormente, esse material foi levado ao microondas

por, aproximadamente, 3 minutos, sem deixar ferver, até o momento em que as partículas se dissolveram por completo. Logo em seguida, o gel foi esfriado até atingir uma temperatura próxima a 40°C. Atingindo essa temperatura, acrescentou-se o Brometo de Etídio, homogeneizando cuidadosamente. Esse gel foi vertido em um suporte de uma cuba média de eletroforese, com o pente previamente posicionado, e deixado solidificar por cerca de 20 minutos, à temperatura ambiente.

Após este período, 2 µl de cada amostra foram aplicados no gel, juntamente com um tampão de carregamento (TBE 1X). Um marcador de peso molecular padrão (Ladder 1Kb Plus) também foi aplicado no gel, a fim de identificar o tamanho da banda amplificada em cada amostra. Em seguida, ocorreu a migração das amostras por eletroforese, por aproximadamente 40 minutos.

3.5.3. Genotipagem

Após o término das reações e das visualizações dos fragmentos amplificados em gel de agarose 1%, os produtos de PCR foram submetidos à genotipagem em sequenciador *MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare life Science Inc.)* de 48 capilares, pertencente ao Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos –UFSCar, SP. Os eletroferogramas foram analisados por meio do *software MegaBACE Fragment Profiler 1.2 (Amersham Biosciences)*, visando a identificação dos genótipos de cada *locus* para todos os indivíduos amostrados.

3.5.4. Preparo das Amostras

Uma placa de PCR de 96 poços foi utilizada para a diluição do produto de PCR, sendo que em cada poço dessa placa continha 6 µl do produto de três PCR distintas, ou seja, 2 µl referentes a um *locus* marcado com FAM; 2 µl de um segundo *locus* marcado com NED e, o terceiro *locus* com a fluorescência HEX. Posteriormente, 24 µl de água

milli-Q autoclavada foram adicionados em cada poço dessa placa, e um adesivo foi colocado para que as amostras não se misturassem. A placa foi então vortexada e em seguida centrifugada.

Dessa diluição, 2 µl de cada *well* foi transferido para uma placa de genotipagem. Um mix foi feito onde, para cada amostra, foi aplicado 0,25 µl de um marcador de tamanho conhecido ETROx 550 (*Amersham Biosciences*), juntamente com 7,75 µl de Tween 20 (0,1%). Posteriormente, as amostras foram vortexadas, centrifugadas e logo em seguida, desnaturadas por 5 minutos a 95°C e então genotipadas no *MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare life Science Inc.)*.

3.5.5. Análises dos Dados da Genotipagem

Os arquivos brutos gerados pelo sequenciador *MegaBACE 750 DNA Analysis System (GE Healthcare life Science Inc.)* foram analisados pelo *software MegaBACE Fragment Profiler 1.2*, possibilitando a análise dos eletroferogramas, com a determinação dos tamanhos dos alelos em pares de base (bp), visando a identificação dos genótipos de cada *locus* para todos os indivíduos amostrados. Os eletroferogramas são gráficos informativos a respeito tanto do tamanho dos fragmentos obtidos, em pares de base, como sobre a qualidade de definição da banda e, portanto, sobre sua confiabilidade. Valores de picos acima de 1000 geralmente são os mais confiáveis, entretanto, valores menores podem ser aceitos, dependendo do tipo de *primer* que está sendo utilizado e de testes preliminares que confirmam a reprodutibilidade do padrão obtido (FREITAS, 2005).

3.6. Construção do Mapa Genético

A construção do mapa de ligação foi baseada na análise de 95 indivíduos F1 oriundos do cruzamento entre um genitor masculino proveniente da região à jusante da confluência dos rios Abaeté e São Francisco, e de um genitor feminino capturado imediatamente abaixo da barragem de Três Marias, em Minas Gerais, por meio da estratégia *pseudo-testcross*. Estas 97 amostras (parentais e F1) foram genotipadas para

um total de 30 *loci*. Após a obtenção dos dados moleculares, isto é, a leitura dos *loci* polimórficos, uma tabela (matriz) foi construída para que os dados fossem adicionados no *software* GQMOL para a construção do mapa genético de *P. argenteus*. Este *software* foi desenvolvido pelo professor Cosme Damião Cruz, da Universidade Federal de Viçosa (UFV), disponível no site <http://www.ufv.br/dbg/gbol/gbol.htm>.

Essa matriz foi elaborada da seguinte maneira: para cada *locus*, o algarismo 1 e/ou o algarismo 2 foram utilizados para identificar os dois alelos do progenitor masculino. Desse modo, se o parental masculino fosse heterozigoto para o *locus* analisado, teria a configuração 12. Caso fosse homozigoto, 11. Para a fêmea, repetiu-se o mesmo processo, inserindo os algarismos 3 e 4 no caso dos alelos serem diferentes aos do macho. Portanto, quando os alelos do progenitor masculino apresentaram-se totalmente diferentes do feminino, a configuração gerada para esse cruzamento era 12 X 34, respectivamente. A partir da numeração dos parentais, os alelos da progênie foram nomeados. Assim, a tabela foi composta por 23 linhas, indicando os marcadores microsatélites polimórficos e 97 colunas, sendo as duas primeiras, os parentais e o restante, a progênie.

Após a elaboração da tabela, foi feita a verificação do padrão de segregação de cada *locus*, no *software* GQMOL, onde os *loci* foram submetidos ao teste de aderência de “qui-quadrado” (χ^2), e os padrões esperados de segregação mendeliana foram analisados. Ocorrida à presença de marcadores que fugiram da segregação mendeliana clássica, os mesmos foram descartados. De acordo com Ferreira (2006), os *loci* que apresentam Distorção da Segregação podem afetar os testes estatísticos usados para detectar a ligação, podendo gerar falsos positivos. Para cada teste foi obtido o valor de P, ou seja, a probabilidade sob H_0 de se obter um valor igual ou superior ao χ^2 calculado com base na amostra. O valor de P utilizado foi $P = 0,01$ e, apenas os *loci* que apresentaram um valor $\geq P$ foram incluídos nas análises, pois não rejeitaram a hipótese nula (H_0).

A estatística LOD *score* se baseia na razão de verossimilhanças, em que no denominador é disposta a função de verossimilhança considerando uma distância entre marcas de 0,5 ($r = 0,5$; ausência de ligação; hipótese de nulidade) e, no numerador, a função que possui a estimativa de máxima verossimilhança de r (hipótese alternativa). Essa razão é colocada no logaritmo com base 10, sendo esse termo definido como LOD *score*. O termo LOD é a abreviação de *log of the odds*, ou seja, razão de chances (Liu, 1998). Portanto, para o presente trabalho, o valor atribuído foi $LOD \geq 2,0$, ou seja, a

hipótese alternativa é 10^2 vezes mais provável de ocorrer que a hipótese de nulidade.

A função de Kosambi (KOSAMBI, 1944) foi utilizada para converter a frequência de recombinação nos valores de distância de mapa (centiMorgan), e a frequência de recombinação máxima utilizada foi de 40 para o mapa em questão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extração e Quantificação do DNA Genômico

A extração do DNA genômico dos tecidos musculares de *Prochilodus argenteus* é uma etapa importante no estudo de marcadores moleculares microssatélites, onde se espera a obtenção de amostras puras, íntegras, de boa qualidade, de maneira a não inibir ou interferir nas amplificações por PCR, nos padrões de migração e amplificação em gel de eletroforese (FERREIRA ; GRATTAPAGLIA, 1998). Em estudos genéticos, são necessários que as amostras sejam identificadas corretamente para que se possa entender o comportamento dessas populações com relação à possível troca de alelos que ocorrem entre elas.

Na tabela a seguir, estão apresentadas as concentrações médias em ng/μL e as relações 260/280 (ácidos nucleicos/proteínas) de algumas amostras dos DNAs extraídos de tecido muscular, obtidas por Biofotômetro (Eppendorf).

Tabela 2. Concentração de DNA em ng/μL e a relação 260/280 (ácidos nucleicos/proteínas) extraído de tecidos musculares de alguns exemplares de *Prochilodus argenteus* pelo método proposto por Sambrook *et al.* (1989), com algumas modificações.

N° Amostra (DNA)	Relação ng/μL	Relação 260/280
265	1088	1.94
264	1652	1.76
262	1077	1.87
267	1091	1.87
269	691	1.85
271	1131	1.86
272	1117	1.89
273	1124	1.85
274	1056	1.88
275	923	1.87

276	822	1.86
277	1125	1.89
278	1365	1.85
279	704	1.86
280	1559	1.79
Genitor Masculino	1725	1.99
Genitor Feminino	1919	2.04

Dentre os 97 indivíduos, os produtos obtidos da extração de DNA das amostras de *P. argenteus* apresentaram boa qualidade e quantidade, livres de polissacarídeos e proteínas, dessa forma prontos para as reações de PCR.

4.2. Integridade do DNA extraído de *Prochilodus argenteus*

A verificação dos resultados e análise da integridade do DNA ocorreu por meio de uma quantificação em gel de agarose 0,8 % (Figura 5).

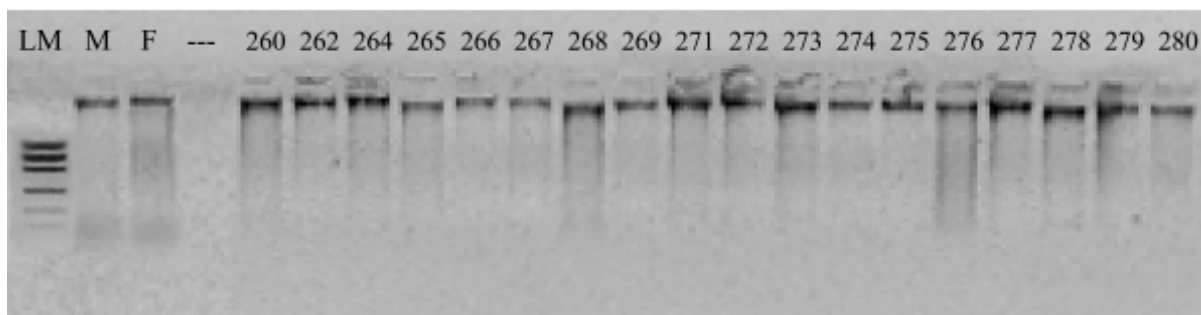


Figura 5: Padrões de bandejamento de fragmentos de DNA resultantes da extração obtida pela metodologia proposta por Sambrook *et al.* (1989). (LM = Low DNA Mass LadderTM); M = Genitor Masculino; F = Genitor Feminino).

Através dos padrões de bandejamento e da relação obtida pelo Biofotômetro, pode-se constatar uma boa integridade e qualidade dos DNAs utilizados no presente estudo.

4.3. Amplificação dos *loci* de microssatélites

Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose 1% e a visualização das bandas no gel ocorreu por meio de um transiluminador com luz ultravioleta/365nm, onde o tamanho e a integridade da banda foram analisados (Figura 6).

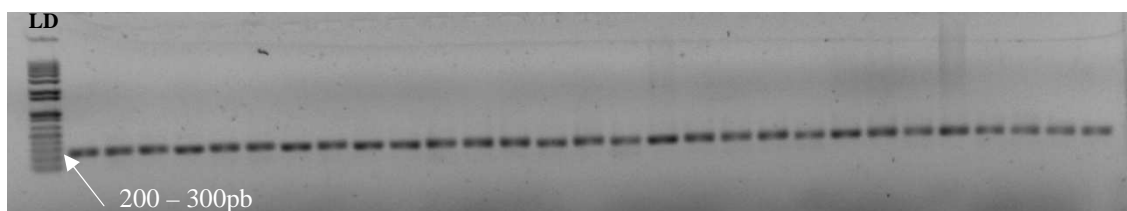


Figura 6: Foto ilustrando fragmentos amplificados de alguns indivíduos do *locus* 14, com a fluorescência FAM, em gel de agarose 1%, analisado em um transiluminador ultravioleta, evidenciando o tamanho das amostras entre 200 e 300pb; **LD** = Ladder 1Kb Plus.

De um modo geral, os *loci* apresentaram um excelente padrão de bandejamento, livre de impurezas, arrastes de DNA, bandas espúrias e excesso de *primers* na reação. No caso de ausência de amplificação, várias tentativas foram feitas a fim de otimizar as condições da PCR, incluindo aumento ou redução da temperatura de anelamento, ajustes das concentrações de $MgCl_2$ e dos *primers* (*Forward* e *Reverse*). Apesar dos ajustes, em alguns casos não foi observada amplificação e o *primer* foi descartado.

4.4. Análise dos Dados da Genotipagem

Em todos os *loci* analisados, os picos apresentaram valor muito acima de 1000, demonstrando a excelente qualidade dos eletroferogramas gerados (Figuras 7 e 8).

Dos 30 *loci* microssatélites propostos, 23 mostraram-se polimórficos e, portanto, utilizados na confecção do mapa. Os sete restantes foram descartados devido ao padrão monomórfico (Par10, Par35 e Par53) e à ausência ou problemas de amplificação (Par15, Par104, Par110 e Par119). O número de alelos encontrados variou, basicamente, de 2 a 4 alelos por *locus*.

Os indivíduos heterozigotos para os *loci* estudados foram caracterizados pela presença de dois picos bem definidos, enquanto os homozigotos apresentaram um pico

apenas (Figura 7 e 8). As *stutter bands* se fizeram presentes, normalmente apresentando picos de menor intensidade ao lado dos picos representativos, não havendo interferência para as análises dos dados, ou prejudicando a interpretação dos resultados.

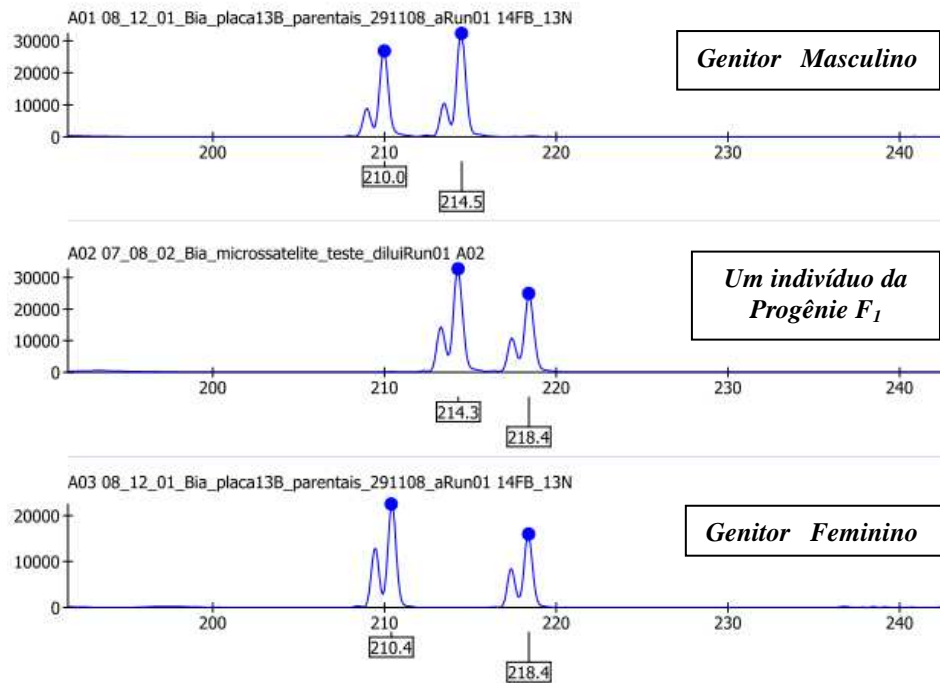


Figura 7: Eletroferogramas obtidos com o locus 14 e fluorescência FAM.

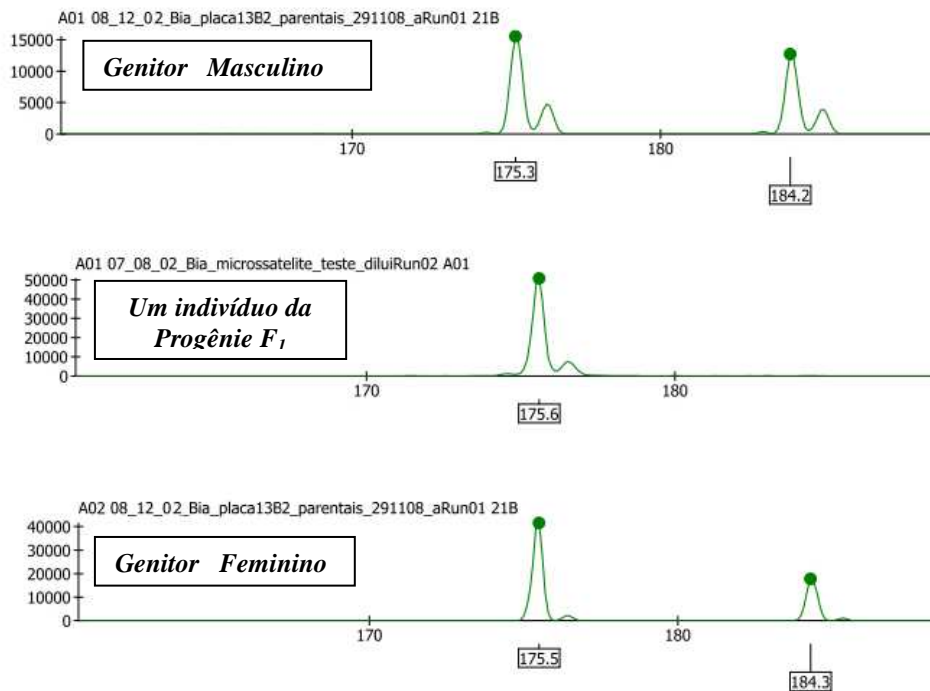


Figura 8: Eletroferogramas obtidos com o locus 21 e fluorescência HEX.

4.5. Construção do Mapa Genético em *Prochilodus argenteus*

Os 23 marcadores microssatélites polimórficos, submetidos ao teste de aderência de qui-quadrado (χ^2), $P \geq 0.01$, realizados no *software* GQMOL, obtiveram resultados satisfatórios quanto aos padrões esperados de segregação mendeliana (Tabela 3). Apenas dois marcadores (Par66 e Par69) apresentaram distorção da segregação e esses foram descartados, pois a presença desses marcadores podem comprometer a qualidade do mapa (FERREIRA, 2006).

Tabela 3: Segregação dos 23 *loci* polimórficos obtida através do teste de qui-quadrado (χ^2), $P \geq 0.01$, pelo *software* GQMOL.

Marcador	País	Classes											Hipótese	GL	Qui-quadrado	Probabilidade(%)	
		11	12	13	14	22	23	24	33	34	44	-					
x12	12x12	25	58			12								1:2:1	2	7,926	1,9003 ns
x13	11x12	50	45											1:1	1	0,263	60,7959 ns
x14	12x23		18	28		18	31							1:1:1:1	3	5,758	12,4002 ns
x21	12x12	26	48			21								1:2:1	2	0,537	76,4586 ns
x26	12x12	16	56			23								1:2:1	2	4,074	13,044 ns
x31	12x12	22	47			26								1:2:1	2	0,347	84,0562 ns
x43	12x33			43			52							1:1	1	0,853	35,5809 ns
x54	12x13	19	25	20			31							1:1:1:1	3	3,821	28,1447 ns
x66	12x13	32	40	7			16							1:1:1:1	3	28,326	0,0003 *
x69	11x12	33	62											1:1	1	8,853	0,2927 *
x71	12x23	19	37			21	18							1:1:1:1	3	10,053	1,8124 ns
x76	11x23		55	40										1:1	1	2,368	12,3812 ns
x80	11x23		36	59										1:1	1	5,568	1,8287 ns
x82	12x23		20	31		22	22							1:1:1:1	3	3,063	38,199 ns
x83	11x23		52	43										1:1	1	0,853	35,5809 ns
x85	12x34			30	23		22	20						1:1:1:1	3	2,389	49,5597 ns
x86	12x34			23	26		18	28						1:1:1:1	3	2,389	49,5597 ns
x89	11x12	47	48											1:1	1	0,011	91,8282 ns
x91	12x22		43			52								1:1	1	0,853	35,5809 ns
x101	11x12	52	43											1:1	1	0,853	35,5809 ns
x103	12x34			26	27		25	17						1:1:1:1	3	2,642	45,0156 ns
x115	12x34			27	25		21	22						1:1:1:1	3	0,958	81,1439 ns
x118	12x34			27	24		22	22						1:1:1:1	3	0,705	87,1965 ns

*Aqueles que apresentaram Distorção da segregação estão representados por um asterisco.

Quatorze marcadores polimórficos (60.8%) apresentaram o padrão de segregação mendeliano esperada para marcadores co-dominantes (4 marcadores segregando 1:2:1 e 10 segregando 1:1:1:1), e 9 (39.2%) marcadores exibiram padrões de segregação de marcadores dominantes (1:1). Isso pode ser explicado pelo tipo de cruzamento utilizado no presente trabalho, pois essa estratégia, *pseudo-testcross*, não garante que ambos os parentais sejam heterozigotos, como uma F2. Ela apenas supõe essa possibilidade através da utilização de indivíduos provenientes de locais muito distintos, supondo que haja uma alta variação genética entre eles.

Desse modo, vinte e um marcadores polimórficos (91.5%) segregaram de acordo com a herança mendeliana e apenas dois (8.7%), apresentaram distorção da segregação (Tabela 3). Resultados similares referentes a mesma taxa de distorção da

segregação têm sido observados em tilápia (8.0%) (KOCHER *et al.* 1998) e no peixe *scallop* japonês (8.2%) (XU, *et al.*, 2009), porém valores mais elevados têm sido relatados em *catfish* (16%) (LIU *et al.*, 2003), *Lates calcarifer* (16.2%)(WANG *et al.*, 2007), truta arco-íris (13.3%) (YOUNG *et al.*, 1998), truta (5.4%) (WORAM *et al.*, 2004), linguado (18.2%) (KANG *et al.*, 2008) e até mesmo em *P. argenteus* (87,4%) (ROJAS, 2008). Já em outras espécies aquáticas, como o molusco australiano *Abalone blacklip*, aproximadamente 20% dos marcadores apresentaram distorção da segregação (BARANSKI *et al.*, 2006). No crustáceo *Dadhnia pulex* foi observada uma DS de 21% (CRISTESCU *et al.*, 2006), na ostra plana, 32.8% (LALLIAS, *et al.*, 2007) e na ostra oriental, 8.2% (YU ; GUO, 2003).

O nível da distorção varia muito entre as espécies e provavelmente reflete características únicas nos diferentes genomas (XU *et al.*, 2009). De um modo geral, a distorção da segregação pode ser ocasionada por efeito de amostragem ou viabilidade diferencial de gametas, bem como danos no DNA e erros na genotipagem (LIAO *et al.*, 2007; XU, *et al.*, 2009). Em carpas, Liao *et al.* (2007) encontraram uma distorção na taxa da segregação de apenas 2%, e os autores relatam que a pequena população de mapeamento utilizada no estudo (60 indivíduos) pode ter sido a causa da baixa taxa de distorção da segregação.

Para a construção do mapa de ligação foram selecionados 21 marcadores microssatélites polimórficos que estavam de acordo com a segregação mendeliana esperada, porém, apenas 11 marcadores (52.4%) foram alocados em algum grupo de ligação. Os 10 marcadores (47.6%) polimórficos restantes não estavam ligados e por isso não foram inseridos no mapa. Conseqüentemente, apenas 3 grupos de ligação foram encontrados no presente estudo (Figura 9). O tamanho observado de cada um dos 3 grupos de ligação foi de 224.9 cM, 34.79 cM e 37.89 cM, respectivamente. A cobertura estimada do genoma foi de 297.58 cM, de acordo com a função de Kosambi (KOSAMBI, 1944). Sete marcadores (Par82, Par86, Par26, Par71, Par12, Par83 e Par85, respectivamente) foram agrupados no primeiro grupo de ligação, dois (Par54 e Par89) no segundo e dois (Par14 e Par43) no terceiro, com uma distância média entre os marcadores alocados no primeiro grupo de 42.51 cM.

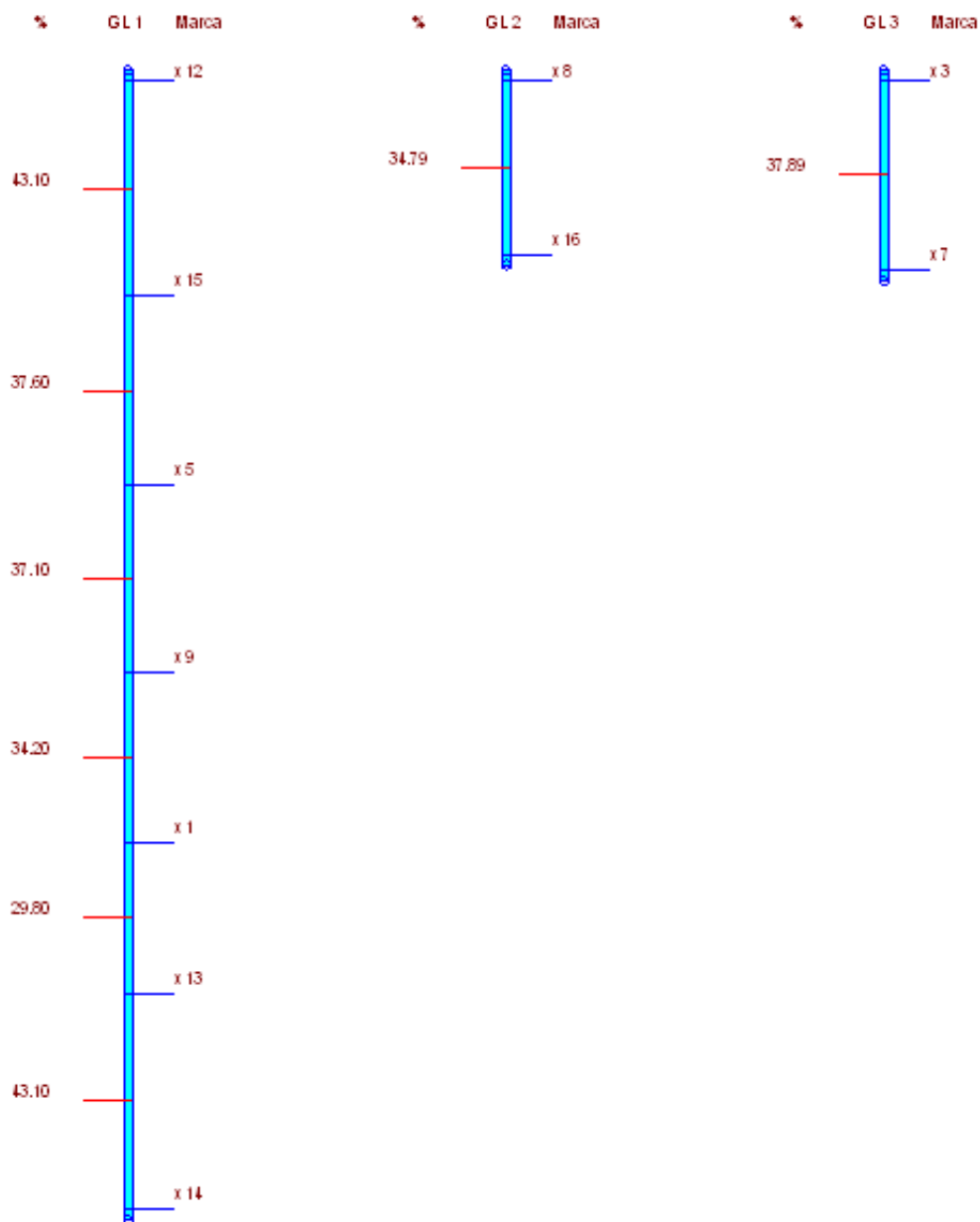


Figura 9: Mapa genético de ligação preliminar do peixe *Prochilodus argenteus*. Marcadores microsatélites estão dispostos no lado direito de cada grupo e o espaçamento entre os marcadores, em cM, é indicado no lado esquerdo, através da função de Kosambi (Kosambi, 1944).

A presença de marcadores não ligados é notória em vários trabalhos. Em um estudo prévio realizado com *P. argenteus* por Rojas (2008), utilizando marcadores AFLP, foi observado um valor relativamente próximo ao encontrado no presente estudo (47.6%), onde, aproximadamente 54% dos marcadores com segregação 1:1 não estavam ligados no genitor masculino, e 59% no genitor feminino. Em carpas, Liao *et al.* (2007) localizaram marcadores moleculares não ligados em 6.25% dos microsatélites e

11.21% em AFLP. Já McClelland & Naish (2008) encontraram uma taxa elevada em marcadores microssatélites (64%) e uma mais baixa frequência para AFLP (28.4%), no mapa de ligação do salmão *Oncorhynchus kisutch*.

A não ligação dos marcadores está diretamente relacionada com a proporção encontrada na segregação observada dos marcadores. No processo de recombinação, os dois alelos de um marcador são separados (segregados) para a formação dos gametas, o qual irá apresentar metade da informação genética do indivíduo. Quando os marcadores estão em cromossomos separados, estes são ditos não ligados e a segregação dos alelos de diferentes marcadores ocorre de forma independente, apresentando na respectiva prole, genótipos em proporções Mendelianas previsíveis. No entanto, quando os marcadores estão presentes em um mesmo cromossomo, a segregação não é independente e a proporção genotípica irá depender da taxa de recombinação entre os marcadores (GRIFFITHS *et al.*, 2006).

Prochilodus argenteus é uma espécie diplóide com $2n = 54$ cromossomos e, portanto, a obtenção de 27 grupos de ligação é esperada. No entanto, isso não foi possível devido ao baixo número de marcadores polimórficos utilizados na construção do mapa.

Diversos estudos demonstraram a importância da utilização de uma alta quantidade de marcadores moleculares para a construção de mapas genéticos. Wang *et al.* (2007) estabeleceram a primeira geração de um mapa genético do peixe *Lates calcarifer* com 240 marcadores microssatélites, encontrando 24 grupos de ligação, estando de acordo com o número haplóide de cromossomos ($n = 24$) da espécie. O comprimento total dos mapas da fêmea e do macho foi: 873.8 cM e 414.5 cM, respectivamente. Para o mapa da espécie popularmente conhecida como paulistinha, 2000 marcadores microssatélites foram utilizados, obtendo 25 grupos de ligação, correspondendo aos 25 cromossomos haplóides da espécie. Os marcadores definiram 713 posições exclusivamente mapeadas com uma média de espaçamento entre os marcadores de 3,0 cM. O mapa atingiu um comprimento total de 2.295 cM (SHIMODA *et al.*, 1999). Em *Daphnia pulex*, Cristescu *et al.* (2006) utilizaram 185 microssatélites, alcançando 12 grupos de ligação ($n = 12$), cobrindo, aproximadamente, 87% do genoma, com o tamanho observado em 1.206 cM. No mapa construído para o robalo europeu, Chistiakov *et al.* (2005) usaram 162 marcadores microssatélites, mapeados em 25 grupos de ligação e cobrindo 814.2 cM do genoma da espécie ($n=24$). O tamanho total genoma do robalo europeu foi estimado em 1769.5 cM. Essa estimativa é similar

aos valores encontrados em tilápia (KOCHER *et al.*, 1998), medaka (NARUSE *et al.*, 2000) e linguado japonês (COIMBRA *et al.*, 2003).

Resultados similares são encontrados quando diferentes tipos de marcadores são empregados na construção de mapas de ligação. Reid *et al.* (2007) construíram uma mapa genético para a espécie alabote-do-atlântico (*Hippoglossus hippoglossus* L.), com 258 marcadores microssatélites e 346 AFLPs. Vinte e quatro grupos de ligação foram identificados, coerentes com os 24 cromossomos da espécie. O comprimento total do mapa foi de 1.562,2 cM na fêmea e 1.459,6 cM no macho. Xu *et al.* (2009) construíram um mapa de ligação para o *scallop* japonês (*Patinopecten yessoensis*) com 413 marcadores AFLP e 6 microssatélites, e encontraram 20 grupos de ligação no mapa da fêmea (cobertura do genoma estimada de 2.198.8 cM) e 21 no mapa do macho (cobertura do genoma estimada de 2.137.6 cM). Apesar do número de cromossomos haplóides da espécie ser $n = 19$, os autores argumentam que esse fato indica que alguns grupos de ligação pertencem a um mesmo cromossomo. Porém, para o mapa de ligação da ostra plana européia, 246 marcadores AFLP e 20 microssatélites foram utilizados. Dois mapas parentais foram construídos, sendo que para o primeiro (P1), 104 marcadores foram agrupados em nove grupos de ligação, tendo como cobertura média do genoma 471.2 cM. O segundo mapa parental (P2) constituiu de 117 marcadores agrupados em 10 grupos de ligação (correspondendo aos 10 cromossomos haplóides da espécie), tendo como cobertura média do genoma 450.0 cM. Portanto, a cobertura estimada do genoma foi de 82.4% para o mapa P1 e 84.2% para o P2 (LALLIAS *et al.*, 2007).

Outro fator relevante que vêm sendo descrito com frequência em diversos estudos é a quantidade de marcadores polimórficos que foram empregados para o mapeamento, em relação à quantidade total dos marcadores propostos inicialmente no trabalho. Wang *et al.* (2009) construíram um mapa de ligação para a planta Cornizo (*Cornus Xorida* L.), também utilizando a estratégia *pseudo-testcross*, onde, aproximadamente 800 microssatélites foram analisados, e desses, 271 foram polimórficos. Dos marcadores polimórficos, 255 (31.9% do total inicial) foram empregados no mapa. Onze grupos de ligação foram obtidos, o que corresponderam ao número haplóide dos cromossomos da espécie, com a cobertura estimada do genoma de 1.175 cM. Em carpas, 408 marcadores foram utilizados, porém 271 foram polimórficos. Vinte e sete grupos de ligação foram encontrados, correspondendo ao número de cromossomos haplóides da espécie ($n = 24$) (LIAO *et al.*, 2007).

Diante de todos os estudos citados, fica evidente a importância de se utilizar, para estudos de mapeamento, grandes quantidades de marcadores moleculares, bem como o uso de diferentes tipos de marcadores na construção de mapas genéticos.

Deste modo, os dados do presente trabalho, ainda que preliminares, representam o início de estudos de mapeamento genético em peixes neotropicais e poderão subsidiar futuros estudos de mapeamento genético mais completos. A adição de novos marcadores, tanto AFLP como microssatélites, visando à obtenção de um mapa de ligação de *P. argenteus* mais saturado, possibilitará uma cobertura mais completa do genoma da espécie.

5. CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo nos levaram a concluir que:

- Foi construído um mapa de ligação para a espécie *Prochilodus argenteus* constituído por 3 grupos de ligação. Embora o número de grupos de ligação encontrado tenha sido inferior ao esperado para a espécie, os resultados podem ser considerados como promissores na área de Genética de Peixes do Brasil, já que estudos de mapeamento genético são praticamente inexistentes em peixes neotropicais.
- O número de marcadores microssatélites utilizado no presente trabalho foi considerado insatisfatório para a obtenção de uma cobertura do genoma mais completa. Alguns problemas metodológicos como ausência de amplificação, ausência de polimorfismo e também de distorção de segregação, ocasionaram a redução para 21 dos 30 *loci* inicialmente propostos. Este fato é justificado pela indisponibilidade de outros marcadores microssatélites descritos na literatura que poderiam ser adicionalmente utilizados.
- Do mesmo modo, se levarmos em consideração a alta porcentagem de marcadores não ligados (47.6%) nesse estudo, torna-se ainda mais evidente a necessidade do aumento do nível de saturação do mapa através da inclusão de novos marcadores moleculares.
- Apesar da estratégia *pseudo-testcross* ser considerada rápida e eficaz, a configuração do cruzamento dessa estratégia não é tão clara como a de um cruzamento convencional e no presente estudo mostrou-se devidamente adequada quanto a sua rapidez, porém, esta estratégia necessita do uso de um número maior de marcadores moleculares para gerar mapas de ligações satisfatórios, pois com essa estratégia, alguns

loci são perdidos devido ao tipo de cruzamento. Desta forma, sugere-se que os parentais sejam avaliados de modo a serem heterozigotos para todos os *loci* analisados.

- Por fim, os microssatélites podem ser considerados adequados para a construção de mapas genéticos de ligação, embora um grande número de marcadores seja necessário para gerar mapas mais densos, o que dificulta bastante os estudos em peixes neotropicais. Uma alternativa viável seria utilizar simultaneamente diferentes tipos de marcadores, o que será futuramente realizado, onde os dados aqui relatados serão compilados com o estudo de AFLP realizado por Rojas (2008), visando desta forma, a obtenção de um mapa mais saturado e uma melhor representação do genoma de *P. argenteus*.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRESTI, J.J.; SEKI S.; CNAANI, A. Poompuang S., Hallerman E.M., Umiel N., Hulata G., Gall G.A.E. & May B. Breeding new strains of tilapia: development of an artificial center of origin and linkage map based on AFLP and microsatellite loci. *Aquaculture*, 185: 43–56 (2000).
- ALMEIDA, A.B.; CHAVES, M.S.; BRAMMER, S.P. & BAGGIO, M.I. Identificação de fontes de resistência à ferrugem da folha do trigo em acessos de *Aegilops tauschii*. *Fitopatologia Brasileira*, 32: 349-352 (2007).
- ANA, Agência Nacional de Águas: <<http://www.ana.gov.br>>. Acessado em: 14 de julho de 2009.
- ANDRADE, R. “Águas para a vida!” Assim gritam as vozes que vivem na bacia do velho Chico. Fórum permanente de defesa do São Francisco / International Rivers Network / Coalizão rios vivos. 44p. (2002).
- BARANSKI, M.; LOUGHNAN, S.; AUSTIN, C.M.; ROBINSON, N. A microsatellite linkage map of the blacklip abalone, *Haliotis rubra*. *Animal Genetics*, 37: 563–570 (2006).
- BARBOSA, A.C.D.R.; CORRÊA, T.C; GALZERANI, F.; GALETTI JR, P.M.; HATANAKA, T. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes*, 6: 936–938 (2006).
- BARBOSA, A.C.D.R.; CORRÊA, T.C.; GALZERANI, F.; GALETTI JR, P.M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 31(1): 357-360 (2008).

- BAZZOLI, N. *Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora*, p. 291-306. In: H.P. Godinho & A.L. Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. (2003).
- BORTOLOTO, T.M. *Construção de mapa molecular de uma população de Eucalyptus grandis segregante para o caráter florescimento precoce utilizando marcadores RAPD*. Dissertação apresentada na Área de Concentração em Genética, Instituto de Biociências da UNESP, Botucatu, SP, 98p. (2006).
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*, 3^{ed}. Brasília: Câmara dos Deputados-CODEVASF, 115p. (1988).
- BROOKS, S.; VIEIRA, L.A.; JOHNSTON, I.A.; MACHERU, P. Muscle development in larvae of a fast growing tropical freshwater fish, the curimatã-pacú (*Prochilodus marginatus*). *Journal of Fish Biology*, 47: 1026–1037 (1995).
- CASTRO, R.M.C.; Vari, R.P. *Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study*. Smithsonian contributions to Zoology, n.622. Washington, D.C.: Smithsonian books. 189 p. (2004).
- CHISTIAKOV, D.A.; HELLEMANS, B.; HALEY, C.S.; LAW, A.S.; TSIGENOPOULOS, C.S.; KOTOULAS, G.; BERTOTTO, D.; LIBERTINI, A.; VOLCKAERT, F.A.M. A microsatellite linkage map of the european sea bass *Dicentrarchus labrax* L. *Genetics*, 170: 1821–1826 (2005).
- COIMBRA, M.R.M.; KOBAYASHI, K.; KORETSUGU, S.; HASEGAWA, O.; OHARA, E.; OZAKI, A.; SAKAMOTO, T.; NARUSE, K.; OKAMOTO, N. A genetic linkage map of the japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 220: 203-218 (2003).
- CRISTESCU, M.E.A.; COLBOURNE, J.K.; RADIVOJAC, J.; LYNCH, M. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the

- prospect of crustacean genomics. *Genomics*, 88: 415– 430 (2006).
- CRUZ, C.D. *Software* GQMOL – disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/gbol/gbol.htm>>
Acessado em: 28 de Junho de 2009.
- DAVIS, G.P.; DENISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim Sci.*, 76: 2331-2339 (1998).
- ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Genetics*, 5:435-445 (2004).
- DIAS-SALMAN, A.K.; GIACHETTO, F.; MALAGO JR, W. Marcadores moleculares en la producción de ganado de corte. *Revista electrónica de Veterinaria*, 10: 1695-7504 (2009).
- FARIA, L.M. *Mapeamento genético e detecção de QTLs em um cruzamento de limão 'cravo' e citrumelo 'swingle'*. Dissertação apresentada na Área de Concentração em Melhoramento Genético Vegetal, Instituto Agrônomo (IAC), Campinas, SP. 105p. (2007).
- FERREIRA, A. *Mapeamento genético utilizando marcadores moleculares com distorção de segregação gamética e genotípica*. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, MG. 146p. (2006).
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 220p. (1998).
- FRANCH, R.; LOURO, B.; TSALAVOUTA, M.; CHATZIPLIS, D.; TSIGENOPOULOS, C.S.; SARROPOULOU, E.; ANTONELLO, J.; MAGOULAS, A.; MYLONAS, C.C.; BABBUCCI, M.; PATARNELLO, T.; POWER, D.M.; KOTOULAS, G.; BARGELLONI, L. A genetic linkage map of the hermaphrodite teleost fish *Sparus aurata* L. *Genetics*, 174: 851–861 (2006).
- FREITAS, P.D. *Manual Prático: Estudos de diversidade genética em camarões utilizando*

- marcadores moleculares*, vol.II: marcadores microsatélites. 27p. (2005).
- GABRIEL NETO, F.A.; STEGMANN, L.F.; SILVA, K.M.S.; FRANÇA, E.J.; EL-DEIR, A.C.A.; SEVERI, W. (2007). *Composição da ictiofauna do Rio São Francisco no trecho médio e submédio*. Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007, Caxambu – MG.
- GISLER, C.V.T.; VASCONCELOS, R.Q. *Projeto de gerenciamento integrado das atividades desenvolvidas em terra na bacia do São Francisco-Desenvolvimento da pesca e aquíicultura*. Subprojeto 4.5C– Plano Decenal de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco-PBHSF (2004-2013) 15p. (2004).
- GONDIM FILHO, J.G.C.; FORMIGA, K.T.M.; DUARTE, R.X.M.; SUGAI, M.R.V.B. *Análise da cheia de 2004 na bacia do rio São Francisco*. In: Simpósio brasileiro de desastres naturais, 1., Florianópolis, SC. Anais-Florianópolis: GEDN/UFSC, p.524-538. (2004).
- GODINHO A.L. & GODINHO H.P. *Breve visão do São Francisco*, p. 15-24. In: H. P. Godinho & A. L. Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. (2003).
- GODINHO, A.L. Migration and spawning of radio-tagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed brazilian river. *Transactions of the American Fisheries Society* 135: 811–824 (2006).
- GRATTAPAGLIA, D.; SEDEROFF, R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers. *Genetics*, Bethesda, 137(4): 1121-1137 (1994).
- GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER S.R.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M.; SUZUKI, D.T. *Introdução à Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. (2006).
- GUYOMARD, R.; MAUGER, S.; TABEL-CANALE, K.; MARTINEAU, S.; GENET, C.; KRIEG, F.; QUILLET, E. A type I and type II microsatellite linkage map of rainbow

- trout (*Oncorhynchus mykiss*) with presumptive coverage of all chromosome arms. *BMC Genomics*, 7: 302 (2006).
- HALDANE, J.B.S. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics*, 8: 299-309 (1919).
- HAPONSKI, A.E.; MARTH, T.A.; STEPIEN, C.A. Genetic divergence across a low-head dam: A preliminary analysis using logperch and greenside darters. *J. Great Lakes Res.*, 33 (Special Issue 2): 117–126 (2007).
- HATANAKA, T.; GALETTI JR, P.M. RAPD marks indicate the occurrence of structured populations of a migratory freshwater fish species. *Genet. Mol. Biol.* 26: 19-25 (2003).
- HATANAKA, T. ; GALETTI JR, Pedro Manoel . Mapping of the 18S and 5S ribosomal RNA genes in the fish *Prochilodus argenteus* Agassiz, 1829 (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetica* (The Hague), Holanda, 122: 239-244 (2004).
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126 (1-2): 153-159 (2006).
- IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (2003). *Estatística da pesca, 2001 – Brasil – Grandes regiões e Unidades da Federação*. Brasília, DF. 97p. Disponível em: <http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesi/boletim_2004.pdf>. Acessado em: 03 de junho de 2009.
- IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (2004). *Estatística da pesca, 2005 – Brasil – Grande regiões e Unidades da Federação*. Brasília, DF. 136p. Disponível em: <http://200.198.202.145/seap/pdf/cogesi/boletim_2004.pdf>. Acessado em: 03 de junho de 2009.
- IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (2005). *Estatística da pesca, 2007 – Brasil – Grande regiões e Unidades da Federação*. Brasília, DF. 147p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/wp-content/files/estati2005.pdf>>.

Acessado em: 03 de junho de 2009.

IBAMA, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (2006). *Estatística da pesca, 2008 – Brasil – Grande regiões e Unidades da Federação*. Brasília, DF. 181p. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/recursos-pesqueiros/documentos/estatistica-pesqueira/>>.

Acessado em: 03 de junho de 2009.

JIMÉNEZ-SEGURA, L.F.; GODINHO, A.L.; PETRERE JR, M. *As desovas de peixes no alto-médio São Francisco*, p. 373-387. In: H. P. Godinho & A. L. Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. (2003).

KANG, J.; KIM, W.J.; WOO-JAI LEE, W.J. Genetic Linkage Map of Olive Flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Int. J. Biol. Sci.*, 4(3): 143-149 (2008).

KOCHER, T.D.; LEE, W.J; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; MCANDREW, B. A Genetic Linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis nicoticus*). *Genetics*, 148: 1225-1232 (1998).

KOHLER, H.C. *Aspectos geoecológicos da bacia hidrográfica do São Francisco (primeira aproximação na escala 1:1 000 000)*, p. 25-35. In: H. P. Godinho & A. L. Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. (2003).

KOSAMBI, D.D. The estimation of map distances from recombination values. *Ann. Eugen.*, 12: 172-175 (1944).

LALLIAS, D.; BEAUMONT, A.R.; HALEY, C.S.; BOUDRY, P.; HEURTEBISE, S.; LAPÈGUE, S. A first-generation genetic linkage map of the european flat oyster *Ostrea edulis* (L.) based on AFLP and microsatellite markers. *Animal Genetics*, 38: 560–568 (2007).

LEDO, E. O Rio São Francisco: 500 anos de desprezo nacional. *Bahia Agrícola*. Salvador: *Seagri*, 7(2): 11-13 (2006).

- LEE, B.Y.; LEE, W.J.; STREELMAN, J.T.; CARLETON, K.L.; HOWE, A.E.; HULATA, G.; SLETTN, A.; STERN, J.E.; TERAII, Y.; KOCHER, T.D. A second-generation genetic linkage map of tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Genetics*, 170: 237-244 (2005).
- LIAO, M.; ZHANG, L.; YANG, G.; ZHU, M.; WANG, D.; WEI, Q.; ZOU G. & CHEN D. Development of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*) genetic maps using microsatellite and AFLP markers and a pseudo-testcross strategy. *Animal Genetics*, 38 (4): 364-370 (2007).
- LIU, B.H. Statistical genomics. New York: CRC. 610 p. (1998).
- LIU, Z.; LI, P.; ARGUE, B.J.; DUNHAM, R.A. Random amplified polymorphic DNA markers: usefulness for gene mapping and analysis of genetic variation of catfish. *Aquaculture*, 174: 59-68 (1999).
- LIU, Z.; KARSI, A.; LI, P.; CAO, D.; DUNHAM, R. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. *Genetics*, 165: 687–694 (2003).
- LOPES, R.E.; NAKAMURA, F.F.; MARTINEZ, C.B. *Efeito de campos elétricos sobre peixes – um estudo sobre o comportamento de espécies neotropicais*. VI Simpósio brasileiro sobre pequenas e médias centrais hidrelétricas, Belo Horizonte – MG. 10p. (2008).
- LUNDIN, M.; MIKKELSEN, B.; MORAN, P.; MARTINEZ, J.L.; SYED, M. Cosmid clones from Atlantic salmon: physical genome mapping. *Aquaculture*, 173: 59-64 (1999).
- MANIATIS, T.; SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edition Cold Spring Harbor Laboratories, Cold Spring Harbor, New

York.(1982).

MCCLELLAND, E. K.; NAISH, K.A. A genetic linkage map for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Animal Genetics*, 39: 169–179. (2008).

CRISTESCU, M.E.A.; COLBOURNE, J.K. ; RADIVOJAC, J.; LYNCH, M. A microsatellite-based genetic linkage map of the waterflea, *Daphnia pulex*: On the prospect of crustacean genomics. *Genomics*, 88: 415– 430 (2006).

MOEN, T.; HOYHEIM, B.; MUNCK, H.; GÓMEZ-RAYA, L. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals na uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. *Animal Genetics*, 35: 81-92 (2004).

MORAES, M.C. *Mapas de ligação e mapeamento de QTL (“Quantitative Trait Loci”) em maracujá-amarelo (Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Deg.)*. Tese apresentada na Área de Concentração: Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade de São Paulo - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP. 142p. (2005).

NARUSE, K.; FUKAMACHI, S.; MITANI, H.; KONDO, M.; MATSUOKA, T. *et al.* A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics*, 154: 1773–1184 (2000).

NAVIDI, W.; ARNHEIM, N. Analysis of genetic data from the polymerase chain reaction, *Statistical Science*, 9 (3): 320-333 (1994).

OHARA, E.; NISHIMURA, T.; NAGAKURA, Y.; SAKAMOTO, T.; MUSHIAKE, K.; OKAMOTO, N. Genetic linkage maps of two yellowtails (*Seriola quinqueradiata* and *Seriola lalandi*). *Aquaculture*, 244: 41-48 (2005).

PAIXÃO, D.M.; GUIMARÃES, S.E.F.; SILVA FILHO, M.I.; LOPES, P.S.; PEREIRA, M.S.; SOLERO, B.P. Detection of QTL for production traits on swine chromosomes 16, 17 and 18. *R. Bras. Zootec.*, 37(10): 1781-1787 (2008).

- PALTI, Y.; PARSONS, J.E.; THORGAARD, G.H. Identification of candidate DNA markers associated with IHN vírus resistance in backcrosses of rainbow (*Oncorhynchus mykiss*) and cutthroat trout (*O. clarki*). *Aquaculture*, 173: 81-94 (1999).
- PLANVASF, Plano Diretor para o Desenvolvimento do Vale do São Francisco. *Programa para o desenvolvimento da pesca e da aquicultura*. Brasília: Planvasf. 192p. (1989).
- PINTO-COELHO, R.M. *A ictiofauna do reservatório de Três Marias, rio São Francisco*. Relatório de ictiologia (Tres Marias), MG. Convênio 8713 FUNDEP-UFMG. Parques Aquícolas. SECTES-MG nº 025/2005 processo: 00350.000278/2005-20. (2006).
- POSTLETHWAIT, J.H.; JOHNSON, S.L.; MIDSON, C.N.; TALBOT, W.S.; GATES, M.; BALLINGER, E.W.; AFRICA, D.; ANDREWS, R.; CARL, T.; EISEN, J.S.; HORNE, S.; KIMMEL, C.B.; HUTCHINSON, M.; JOHNSON, M.; RODRIGUEZ, A. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science*, 264: 699-703 (1994).
- REID, D.P.; SMITH, C.; ROMMENS, M.; BLANCHARD, B.; MARTIN-ROBICHAUD, D.; REITH, M. A Genetic Linkage Map of Atlantic Halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Genetics*, 177: 1193–1205 (2007).
- RIZZO, R.; GODINHO, H.P.; SATO, Y. Short-term storage of oocytes from the neotropical teleost fish *Prochilodus marggravii*. *Theriogenology*, 60: 1059–1070 (2003).
- ROJAS, T.C.G. *Utilização de AFLP para estudos genéticos em Prochilodus argenteus* (Pisces, Prochilodontidae). Dissertação apresentada no Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, SP. 69p. (2008).
- SALVADOR, V. *Caracterização morfométrica da margem direita do rio São Francisco em processo de erosivo utilizado modelagem numérica do terreno e seus efeitos nos agroecossistemas*. Anais – III Simpósio Regional de Geo-processamento e Sensoriamento Remoto. Aracaju, SE. (2006).

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSCH, E.F. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2^{ed}. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. (1989).

SAMPAIO, E.V.; LÓPEZ, C. M. *Limnologias física, química e biológica da represa de Três Marias e do São Francisco*, p. 71-92. In: H. P. Godinho & A. L. Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. (2003).

SAMPAIO, K.H. *Superfície ovocitária e desenvolvimento inicial de quatro espécies de peixes de interesse comercial da bacia do rio São Francisco*. Dissertação apresentada no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 53 p. (2006).

SANETRA, M.; MEYER, A. A microsatellite-based genetic linkage map of the cichlid fish, *Astatotilapia burtoni* (Teleostei): a comparison of genetic architectures among rapidly speciating cichlids. *Genetics: Published Articles Ahead of Print*, published on March 11, 2009 as 10.1534/genetics.108.089367. (2008).

SANTOS, H.B.; SATO, Y.; MORO, L.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E. Relationship among follicular apoptosis, integrin β_1 and collagen type IV during early ovarian regression in the teleost *Prochilodus argenteus* after induced spawning. *J. Cell and Tissue Research*, 332: 159-170 (2008).

SANTOS, J.C.E. *Indução à ovulação de curimatã-pacu Prochilodus argenteus Agassiz (1829): Comparação entre duas técnicas de Hipofisação*. Dissertação apresentada no Departamento de Pesca, Universidade Federal Rural De Pernambuco, Recife. 64p. (2004).

SATO, Y.; CARDOSO, E.L.; GODINHO, A.L.; GODINHO, H.P. Hypophysation parameters of the fish *Prochilodus marggravii* obtained in routine hatchery station

conditions. *Revista Brasileira de Biologia*, 56: 59-64 (1996).

SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M.B.; MIRANDA, M.O.T., *Impacto a jusante do reservatório de Três Marias sobre a reprodução do peixe reofílico curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*)*, p. 327-345. In: HP Godinho & AL Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco de Minas Gerais*. Belo Horizonte, PUC Minas, 468p. (2003).

SATO, Y.; BAZZOLI, N.; RIZZO, E.; BOSCHI, M.B.; MIRANDA, M.O.T. 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 Research and Applications*, 21: 930-950 (2005).

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco River. In: J Carolsfelds, B Harvey, C Ross, A Baer (ed.). *Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. IDRC and World Bank, Victoria, 195-232 (2003).

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nat. Rev. Genetics*, 5: 63-69 (2004).

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234 (2000).

SHIMODA, N.; KNAPIK, E.W.; ZINITI, J.; SIM, C.; YAMADA, E.; KAPLAN, S.; JACKSON, D.; SAUVAGE, F.; JACOB, H.; FISHMAN, M. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics*, 58: 219-232 (1999).

SILVA, M.F. *Desenvolvimento de um mapa genético de ligação, de macieira, saturado para a região com resistência à mancha foliar de glomerella (*Colletotrichu gloeosporioides*)*. Tese apresentada no Centro de Ciências Agrárias da Universidade

Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 106p. (2007).

SILVA, F.C.P.; BRITO, M.F.G.; FARIAS, L.M.; NICOLI, J.R. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. *Journal of Fish Biology*, 67: 1686–1698 (2005).

STURTEVANT, A.H. The linear arrangement of six sex-linked factors in drosophila, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology*, 14(1): 43-59 (1913).

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl. Ac. Res.*, 17: 6463-6471 (1989).

TEIXEIRA, F.F. *Mapeamento de QTLs para caracteres do feijoeiro por meio de microssatélites*. Tese apresentada na Área de Concentração em Genética e Melhoramento de Plantas, Universidade Federal de Lavras, MG. 189 p. (2004).

VALENCIO, N.F.L.S.; LEME, A.A.; MARTINS, R.C.; MENDONÇA, S.A.T.; GONÇALVES, J.C; MANCUSO, M.I.R.; MENDONÇA, I.; FELIX, S.A. A precarização do trabalho no território das águas: limitações atuais ao exercício da pesca profissional no alto-médio São Francisco, p. 423-446. In: H. P. Godinho & A. L. Godinho (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. (2003).

WANG, X.; WADL, P.A.; RINEHART, T.A.; SCHEZER, B.E.; WINDHAM, M.T.; SPIERS, J.M.; JOHNSON, D.H.; TRIGIANO, R.N. A linkage map for xowering dogwood (*Cornus Xorida* L.) based on microsatellite markers. *Euphytica*, 165: 165–175. (2009).

WANG, C.M.; ZHU, Z.Y.; LO, L.C.; FENG, F.; LIN, G.; YANG, W.T.; LI, J.; YUE, G.H. A microsatellite linkage map of barramundi, *Lates calcarifer*. *Genetics*, 175: 907–915 (2007).

- WEIR, B.S. *Genetic data analysis - Methods for discrete population genetic data*, Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland. (1990).
- WORAM, R.A.; MCGOWAN, C.; STOUT, J.A.; GHARBI, K.; FERGUSON, M.M.; HOYHEIM, B.; DAVIDSON, E.A.; DAVIDSON, W.S.; REXROAD, C.; DANZMANN, R.G. A genetic linkage map for Arctic char (*Salvelinus alpinus*): evidence for higher recombination rates and segregation distortion in hybrid versus pure strain mapping parents. *Genome*, 47:304-315 (2004).
- WRIGHT, J.M.; BENTZEN, P. Microsatellites: genetic markers for the future. [*Reviews in Fish Biology and Fisheries*](#). 4(3): 384-388 (2004).
- XU, K.; LI, Q.; KONG, L.; YU, R. A first-generation genetic map of the Japanese scallop *Patinopecten yessoensis*-based AFLP and microsatellite markers *Aquaculture*, 40: 35-43 (2009).
- YOUNG, W.P.; WHEELER, P.A.; CORYELL, V.H.; KEIM, P.; THORGAARD, G.H. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics*, 148: 839-850 (1998).
- YU, Z.; GUO, X. Genetic Linkage Map of the Eastern Oyster *Crassostrea virginica*. *GmelinBiol. Bull.*, 204: 327-338. (2003).
- ZANE, L.; BARGELLONIT, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16 (2002).