

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARINA BARREIROS VIRMOND

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES CATIVAS DE *RHAMDIA*
QUELEN A PARTIR DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

PONTAL DO PARANÁ

2013



MARINA BARREIROS VIRMOND

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE POPULAÇÕES CATIVAS DE *RHAMDIA*
QUELEN A PARTIR DE MARCADORES MICROSSATÉLITES**

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de bacharel em Oceanografia, do Curso de Oceanografia, Setor de Ciências da Terra da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Rodolfo Luis Petersen

m
2013-19

PONTAL DO PARANÁ

2013

CATALOGAÇÃO NA FONTE:
UFPR / SIBI - Biblioteca do Centro de Estudos do Mar

V819v Virmond, Marina Barreiros
Variabilidade genética de populações cativas de *Rhamdia quelen* a partir de marcadores microssatélites. / Marina Barreiros Virmond. – Pontal do Paraná, 2014. 31 f.; 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo Luis Petersen.

Monografia (graduação) - Curso de Oceanografia, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Jundiá. 2. Piscicultura. 3. Melhoramento genético. 4. Marcador molecular. 5. Estrutura genética. I. Título. II. Petersen, Rodolfo Luis. III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 639.3

TERMO DE APROVAÇÃO

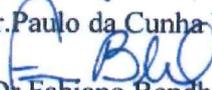
Marina Barreiros Virmond

“Análise da variabilidade genética de população cativas de *Rhamdia quelen* através de marcadores microssatélites”

Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores:



Prof.Dr.Paulo da Cunha-Lana-CEM/UFPR



Prof.Dr.Fabiano Bendhack-CEM/UFPR



Prof.Dr.Rodolfo Luis Petersen-CEM/UFPR
Presidente



Pontal do Paraná, 13 de dezembro de 2013

Dedico, não só este documento, mas o que ele representa para mim, à minha mãe Frínia, à minha irmã de alma Gabriela e ao meu namorado Vitor, que participaram ativamente para que essa conquista fosse alcançada, me trazendo, a cada novo dia, um motivo para seguir.

AGRADECIMENTOS

À Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI, por disponibilizar os tecidos de nadadeiras dos estoques reprodutivos de *Rhamdia quelen*.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo financiamento do projeto e pela bolsa de Iniciação Tecnológica e Industrial ofertada.

Aos Profs. Drs. Fabiano Bendhack e Paulo da Cunha Lana por aceitarem participar da banca avaliadora deste projeto de TCC e pelas sugestões para o aprimoramento do mesmo.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rodolfo Luis Petersen, por todo o apoio, confiança, paciência, ensinamentos e principalmente incentivo, dedicados a mim. Obrigada por acreditar no meu potencial e tornar esse processo mais simples e agradável.

Aos meus companheiros do GECEMar, principalmente à Daniele, por desempenhar muito mais do que o papel de técnica, se envolvendo verdadeiramente em todas as etapas do processo. Obrigada pela paciência, dedicação, boa vontade, eterna disposição em ajudar, pelas horas de trabalho intenso e de conversas atoa, enfim... Obrigada por TUDO!

A toda *Família Corleone* (GRR2009), pelos momentos compartilhados.

Aos meus bons amigos Lucas, Homero, Grão, Vitão, Adrian, Bryan, Phellipe, Tintin, Ícaro, Pepe, e às minhas queridas amigas Nath, Bruna, Cynthia, Dafne, Laíza, Mari Rosa, Marcela, Nina, Fernanda e Noele. Obrigada por fazerem destes 5 anos inesquecíveis, com muito carinho, parceria, conversas, risadas, churrascos, cervejas e histórias.

À Gabriela, minha amiga, irmã, exemplo... Por toda a cumplicidade, lealdade, momentos alegres, e até pelas broncas. Obrigada por me ensinar o verdadeiro significado da amizade!

Ao meu namorado Vitor, por todo o apoio, paciência, carinho, cumplicidade, respeito, amor... Obrigada por me contemplar com sua simplicidade e pureza, enchendo meus dias de alegria e vontade de viver.

A toda a minha família, pelo carinho, respeito, união, confiança, incentivo e muito amor. Em especial à minha tia Quelcy, pelos bons exemplos, afeto, dedicação e por sempre acreditar no meu potencial.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, Maurício, por toda a dedicação, carinho, amor e ensinamentos.

Ao meu irmão Thiago, pela amizade, carinho, respeito, amor e até pelas brigas, TE AMO!

À minha mãe, Frínia, por dedicar sua vida a mim com muito amor e afeto. Obrigada por estar ao meu lado em todos os momentos, por me dar força, me incentivar e me ensinar os verdadeiros valores da vida. TE AMO!

Entre pensamentos soltos e ideias fixas
Entre Holocausto Urbano, Ventura e Dwitza
Entre dedos cruzados, punhos cerrados
E mãos unidas em prece para que nada dê errado
Entre o tempo curto e missões cumpridas
Significado oculto e lições aprendidas
Entre meus lemas e dilemas
Entre meus temas e estratégias
Entre memórias, lembranças,
Histórias de andanças e novas esperanças
Entre ideias e ideais
Entre experiências e decepções
Entre boas ações e reações
Entre os velhos tempos e os novos dias
Entre os novos hábitos e os velhos vícios
Entre finais abruptos e reinícios
Novos indícios de que ainda há para onde ir
Razões que fazem valer a pena ficar aqui
Entre déjà vus e devaneios
Entre bloqueios, sonhos e anseios
Ordem em meio ao caos...

Marcus Vinicius Andrade e Silva (Kamau)

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar a variabilidade e estrutura genética, através do uso de marcadores moleculares microssatélites, de duas populações cativas de *Rhamdia quelen* oriundas de rios da região Sul do Brasil. Ambas as populações pertencem a estoques de reprodutores do Campo Experimental de Piscicultura de Camburiú – CEPC. O DNA dos indivíduos foi obtido a partir de tecidos de nadadeiras com auxílio de um *kit* de extração comercial. Para a amplificação via PCR foram utilizados os seguintes *primers* marcados com fluoróforos: Pcor1 (FAM), Pcor2 (TET), Pc17 (HEX), Pc97 (TET) e Rh1 (FAM). Depois de amplificadas, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese capilar e genotipadas. Os cinco *loci* de microssatélites analisados apresentaram-se altamente polimórficos e informativos, com uma média de 9,8 alelos/*locus*. As populações não se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), apresentando desvios significativos ($p < 0,01$) na maioria dos *locus* analisados. O coeficiente de endogamia (F_{IS}) apresentou valores negativos, evidenciando que não houve cruzamentos consanguíneos. O teste de diferenciação alélica e genotípica entre as duas populações foi estatisticamente significativo, e o valor de divergência genética total (F_{ST}) foi de 0,01939, indicando baixo nível de estruturação genética nas populações. A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a maior variabilidade genética se encontra dentro das populações (98,06%). Os marcadores microssatélites utilizados foram eficientes para a análise da estrutura e variabilidade genética das populações cativas de *Rhamdia quelen*. O manejo reprodutivo adotado nos cultivos do CEPC mostrou-se adequado, uma vez que garantiu a manutenção da variabilidade genética das populações. Isto reforça a possibilidade destas fazerem parte de uma população base de programas de melhoramento.

Palavras-chave: Jundiá, piscicultura, melhoramento genético, marcador molecular, estrutura genética.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the genetic variability and structure, of two farmed populations of *Rhamdia quelen* originating from rivers in southern Brazil through the use of microsatellite markers. Both populations belong to the breeding stocks of the experimental fish farming station of Camburiú – CEPC. The DNA of individuals was obtained from fin tissue using a commercial extraction kit. For PCR amplification the following primers labeled with fluorophores were used: Pcor1 (FAM), Pcor2 (TET), PC17 (HEX), PC97 (TET) and Rh1 (FAM). After amplification, DNA samples were subjected to capillary electrophoresis and genotyped. The five microsatellite loci analyzed were highly polymorphic and informative, with an average of 9,8 alleles/locus. The two populations are not in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE), showing significant deviations ($p < 0.01$) in most loci analyzed. The inbreeding coefficient (FIS) was negative, indicating that there was no inbreeding. The test of allelic and genotypic differentiation between the two populations was statistically significant, and the value of the total genetic divergence (FST) was 0.01939, indicating a low level of genetic structure in populations. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that most genetic variation was found within populations (98.06%). Microsatellite markers used were efficient for analysis of the structure and genetic variability of farmed populations of *Rhamdia quelen*. The reproductive management adopted in the farming system of CEPC was adequate, since it ensured the maintenance of genetic variability. This reinforces the possibility of these populations being part of a population-based breeding programs.

Key-words: Silver catfish, pisciculture, breeding, molecular marker, genetic structure.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 MATERIAIS E MÉTODOS	16
2.1. COLETA DAS AMOSTRAS	16
2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	16
2.2.1 Extração e amplificação do DNA	16
2.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS	17
3 RESULTADOS	19
3.1 ANÁLISE INTRAPOPULACIONAL	19
3.2 ANÁLISE INTERPOPULACIONAL	23
4 DISCUSSÃO	24
5 CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

A piscicultura brasileira, desde seu início, teve como foco a produção de espécies exóticas como a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e a carpa comum (*Cyprinus carpio*) (ANDRADE & YASUI, 2003; OSTRENSKY *et al.*, 2007). Isto se deve ao amplo conhecimento acerca da biologia e manejo produtivo destas espécies, bem como à introdução de linhagens melhoradas geneticamente. Recentemente, nota-se o interesse em introduzir espécies nativas neste sistema de produção, pois estas são adaptadas ao clima e tendem a ser bem aceitas no mercado consumidor, apresentando elevado potencial para cultivo. Pacotes tecnológicos têm sido desenvolvidos para estas espécies, mas o manejo de suas populações reprodutivas ainda é feito de forma precária (GODINHO, 2007), devido principalmente à falta de controle dos cruzamentos nos centros de alevinagem, à ausência de programas de seleção genética e à carência de informações sobre a diversidade genética das populações.

A identificação e a caracterização genética de uma espécie são fundamentais para a efetivação de programas de melhoramento de indivíduos em cativeiro (HILSDORF & KRIEGER, 1998). Estes programas são baseados no conhecimento da variabilidade genética dos organismos, a qual propicia a escolha de reprodutores com maiores taxas de crescimento (RESENDE *et al.*, 2008) e características fisiológicas desejáveis. Os exemplares selecionados são submetidos a sucessivos cruzamentos e seleção artificial a fim de obter melhora no desempenho das novas gerações e conseqüentemente do cultivo. Assim, identificar a distribuição da variação genética entre e dentro de populações de uma espécie, candidatas a programas de melhoramento, é de suma importância para delimitar as estratégias ideais para sua conservação e manejo.

Manejos reprodutivos com planejamento zootécnico precário, como cruzamentos aleatórios sem controle de *pedigree*, podem resultar em alterações na diversidade genética (KOCHER *et al.*, 1998). Deste modo, o cruzamento entre indivíduos estritamente aparentados (endogamia), a seleção de pequeno número efetivo de reprodutores e sua diminuição ao longo das gerações, a proporção desigual de machos e fêmeas durante a reprodução e a aplicação intensa de

seleção individual constituem os principais redutores da variabilidade genética dos exemplares cultivados (FALCONER, 1996; SEKINO *et al.*, 2004).

O estudo da variabilidade genética de populações se tornou possível através do desenvolvimento de diversos marcadores moleculares, principalmente daqueles baseados no polimorfismo de DNA, que permitem o acesso à variabilidade de qualquer organismo (BENITES, 2008). Segundo Ferreira e Grattapaglia (1998), um marcador molecular é qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso (isoenzimas, proteínas, RNAm) ou de um segmento específico de DNA (regiões expressas ou não do genoma). São características polimórficas herdáveis que refletem diferenças na sequência de DNA, tanto diretamente, em nível de nucleotídeos, quanto indiretamente, em nível de expressão gênica.

Com os avanços tecnológicos observados nas últimas décadas, os marcadores moleculares têm se transformado em ferramentas importantes no estudo da genética de populações de peixes selvagens ou de cativeiro. São utilizados com o intuito de identificar espécies e híbridos, estabelecer a filogenia da espécie e da população, determinar a estrutura populacional de uma espécie, identificar linhagens, estimar a variação genética em populações selvagens e cultivadas, inferir o impacto genético da introdução de peixes cultivados em populações naturais, determinar estratégias de cruzamento para fins de criação e repovoamento, entre outros. (HILSDORF & KRIEGER, 1998).

Dentre os marcadores moleculares conhecidos, os microsatélites têm sido considerados adequados para estudos de variabilidade genética aplicados à pesca e à piscicultura (BENITES, 2008). Os marcadores microsatélites ou SSR (Simple Sequence Repeat) são sequências de 1 a 6 pares de bases (pb) de comprimento repetidas em *tandem*, encontradas nos genomas dos eucariotos (LITT & LUTY, 1989; WEBER & MAY, 1989). Os microsatélites apresentam diversas vantagens em relação aos demais marcadores moleculares, como: abundância e grande dispersão no genoma da maioria das espécies; alto grau de polimorfismo; co-dominância de alelos, o que permite a discriminação entre homocigotos e heterocigotos; fragmentos curtos; poder de transferibilidade (amplificação cruzada), uma vez que os *loci* tendem a ser conservados em espécies evolutivamente semelhantes; análise via PCR (Polimerase Chain Reaction), a qual necessita de pequenas quantidades de DNA; entre outras. Essas características, em conjunto com o multialelismo dos

microssatélites, fazem destes os marcadores moleculares com maior conteúdo de informação de polimorfismo (O'REILLY & WRIGHT, 1995; FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Em uma abordagem voltada à piscicultura, os microssatélites possibilitam a avaliação de estoques cultivados, direcionando medidas de manejo apropriadas para a manutenção da variação genética e dos níveis de heterozigosidade (FERGUSON *et al.*, 1995), e auxiliando na seleção de reprodutores em criações comerciais (O'REILLY & WRIGHT, 1995; DE LEON *et al.*, 1998).

O jundiá (*Rhamdia quelen*) é um bagre de água doce pertencente à família Pimelodidae. Sua distribuição é neotropical, com ocorrência desde a região Central da Argentina até o Sul do México (SILFVERGRIP, 1996). A espécie habita locais calmos e profundos dos rios, apresenta hábitos noturnos, alimentação omnívora e pode atingir 50 cm de comprimento e 3 kg de peso (GOMES *et al.*, 2000). Nativo da região Sul do Brasil, possui resistência a temperaturas mais baixas, e em conjunto com seu rápido crescimento, boa aceitação a rações comerciais, fácil indução a reprodução, alto rendimento de carcaça e carne saborosa e com poucos espinhos (CARNEIRO *et al.*, 2002; BALDISSEROTTO & NETO, 2004) vem se mostrando uma das espécies mais promissoras para a piscicultura.

O melhoramento genético pode ser uma ferramenta muito importante para acelerar a taxa de crescimento e tornar o cultivo do *R. quelen* mais atrativo comercialmente. Deste modo, conhecer a diversidade genética das populações de Jundiá que poderão ser utilizadas em programas de melhoramento é essencial para dimensionar a variabilidade genética inicial, e então estabelecer os futuros cruzamentos, o que permite aumentar a eficácia da seleção e os ganhos ao longo das gerações. A fim de auxiliar em um melhoramento genético voltado para o desenvolvimento eficaz do cultivo do jundiá na região Sul do Brasil, o objetivo do trabalho é avaliar a variabilidade genética de populações cativas de *Rhamdia quelen*, através do uso de marcadores microssatélites. Tendo em vista a eficácia dos microssatélites em análises de genética populacional direcionadas para a piscicultura, o presente estudo baseia-se na hipótese de que se a variabilidade genética das populações cativas de *R. quelen* for alta, então estas populações serão uma boa base para programas de melhoramento genético espera-se encontrar

indivíduos com base genética suficientemente diversa para fazer parte das populações base em programas de melhoramento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 COLETA DAS AMOSTRAS

Foram analisadas duas populações cativas (GASPAR e CAÇADOR) da região Sul do Brasil, pertencentes ao Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú – CEPC. Os trabalhos de reprodução e disseminação de alevinos de ambas as populações foram iniciados no ano 2006, transcorrendo aproximadamente seis gerações em condições de cativeiro até o momento do trabalho. As reproduções foram feitas ao acaso, dependendo do estágio de maturação das gônadas das fêmeas. Os indivíduos que deram origem às gerações subsequentes não foram selecionados para obter característica zootécnica definida.

De cada população foram retiradas aleatoriamente, dos estoques reprodutivos, amostras de tecidos de nadadeira. Os tecidos foram armazenados em microtubos estéreis, fixados em etanol, levados até o Laboratório de Genética do Centro de Estudos do Mar (GECEMar), da Universidade Federal do Paraná – UFPR, e armazenados em freezer a -20°C .

As amostras das populações foram fornecidas pela Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina – EPAGRI.

2.2 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

2.2.1 Extração e amplificação do DNA

O DNA foi extraído das amostras de tecidos de nadadeiras conforme protocolo fornecido pelo kit de extração de DNA genômico NORGEN (Biotek Corp.). A integridade do DNA extraído foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (1%) corado em Brometo de Etídio e, em seguida, a sua concentração foi

determinada no espectrofotômetro Biophotometer plus (Eppendorf), com base na razão 260/280nm.

Para as reações de PCR foram utilizados cinco *primers* de microssatélites: Pcor1, Pcor2 (REVALDAVES *et al.*, 2005), PC17, PC97 (MOESER & BERMINGHAM, 2005), e RH1 (F: 5'-TTACTCGGGATACGATGC-3' e R: 5'-TTGTCAGAGTCCAAAGG-3'), marcados com os fluoróforos FAM, TET, HEX, TET e FAM, respectivamente, e amplificados no termociclador ESCO modelo Swift Max Pro. Com exceção do RH1, único *locus* de microssatélite desenvolvido e testado para a espécie *Rhamdia quelen* até o momento do presente trabalho, os demais *locus* de microssatélites foram prospectados para a espécie *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado), deste modo realizou-se amplificação cruzada. O programa de amplificação padronizado consistiu nas seguintes etapas: um ciclo de desnaturação a 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto à temperatura de anelamento específica para cada *primer* de microssatélite, 1 minuto a 72°C e um último ciclo de extensão a 72°C por 7 minutos. Cada reação continha 1,25U de Taq polimerase, 0,1mM de dNTPs, 1X tampão de PCR, 0,6µM de cada *primer* (Forward e Reverse), 1,5mM de MgCl, 1µL de DNA e água Milli-Q autoclavada, para um volume total de 10µL.

Com o intuito de conferir se as amostras para cada *locus* foram amplificadas realizou-se eletroforese em gel de agarose (1%) corado em Brometo de Etídio, e com auxílio de um transiluminador MacroVue UV 20[®] (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., San Francisco), os géis foram fotodocumentados e analisados para presença ou ausência de bandas. O material amplificado foi submetido à eletroforese capilar em um laboratório terceirizado (DNA Consult – São Carlos, São Paulo) para a realização das genotipagens.

2.3 PROCESSAMENTO DOS DADOS

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

As análises intrapopulacionais, como número de alelos observados (N_A), as frequências alélicas, a heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_E), o coeficiente de endogamia da população (F_{IS}), foram calculados com o auxílio do programa Genepop web v. 3.1 (RAYMOND & ROUSSET, 1995), bem como o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. As variações genéticas entre e dentro das populações (análise interpopulacional) e as distâncias genéticas (F_{ST}) foram identificadas através de uma análise de variância molecular (AMOVA) com o software Alerquin v. 3.1. (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

O número efetivo de alelos por *locus* foi estimado a partir da expressão: $A_e = 1/(1-H_E)$, sendo H_E o valor da heterozigosidade esperada para o *locus* analisado. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado de acordo com Botstein *et al* (1980).

Tabela 1. Repetição motivo, sequências dos primers, temperatura de anelamento e número de acesso no GenBank, dos cinco *loci* de microssatélites utilizados.

<i>Locus</i>	Repetição	Sequência dos Primers (5'-3')	Ta (°C)	Nº de acesso (GenBank)
Pcor1	(TC) ₉ GC(TC) ₉	F: AAACCCGAGGATAACCGATC R: AGCGTGCTACTAACACAAAC	55,5	AY737063
Pcor2	(AG) ₁₉	F: GATATGCAAATAAGAAGGTC R: TCTTCTGGCTTTTCCTCCTCT	55	AY737064
PC17	(CA) ₂₁	F: ACGACGTTGTAAAACGACGC CTGCCAGGTAATCTGAA R:AGGTATGCGGAACACTGACC	59	AY833371
PC97	(CA) ₁₄	F: CACGACGTTGTAAAACGACG TTGGTTTGAGGTCGGTTTG R: GAACAGTGAGAGCGGAGAC	58	AY833377
RH1	-	F: TTA [~] CTCGGGATACGATGC R: TTGTCAGAGTGCCAAAGG	56	*

*Microssatélite não publicado no GenBank.

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISE INTRAPOPULACIONAL

Os cinco *loci* de microssatélites analisados apresentaram elevado grau de polimorfismo. Foi obtido um total de 98 alelos, sendo 18 alelos no *locus* Pcor1, 25 no Pcor2, 12 no PC17, 25 no PC97 e 18 no RH1. Considerando as duas populações analisadas (GASPAR e CAÇADOR), o número médio de alelos por *locus* foi de 9,8 e a média de alelos efetivos foi $5,31 \pm 0,9$ (Tabela 2). Dentre o total de alelos genotipados, foram encontrados 12 alelos exclusivos para a população GASPAR e 7 para a CAÇADOR (Tabela 3). O tamanho dos alelos e suas distribuições de frequência, para os cinco *loci* em ambas as populações, estão representados nas Figuras 1, 2, 3, 4, 5.

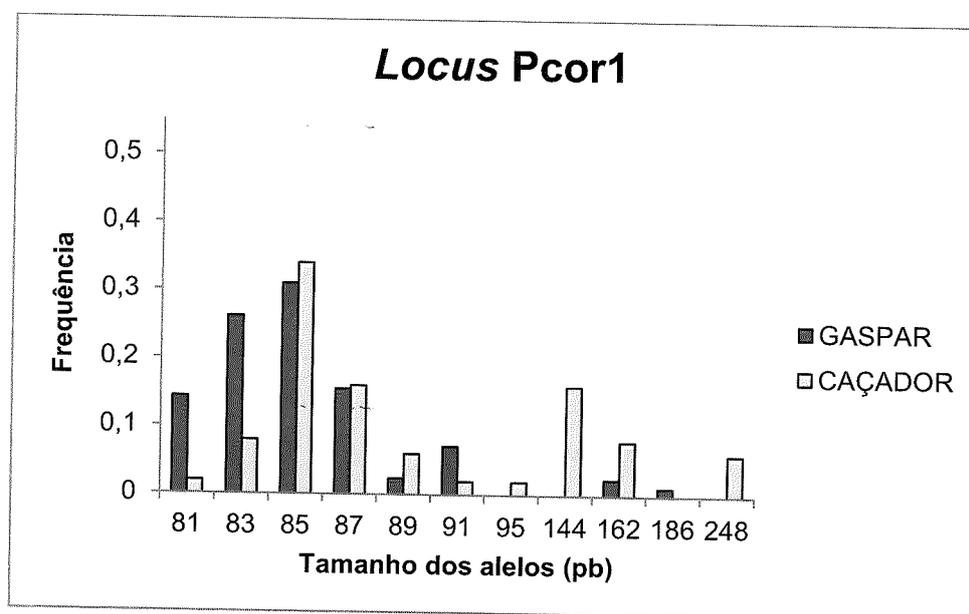


Figura 1. Histograma das frequências dos alelos e seus respectivos tamanhos (pb), para o *locus* Pcor1 nas populações de *Rhamdia quelen*, GASPAR E CAÇADOR.

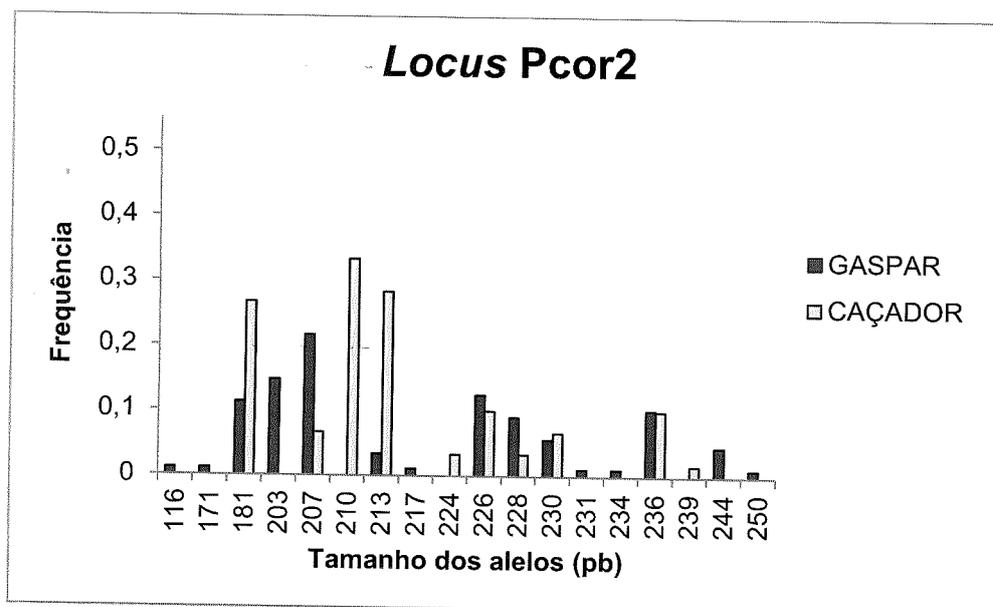


Figura 2. Histograma das frequências dos alelos e seus respectivos tamanhos (pb), para o locus Pcor2 nas populações de *Rhamdia quelen*, GASPAR E CAÇADOR.

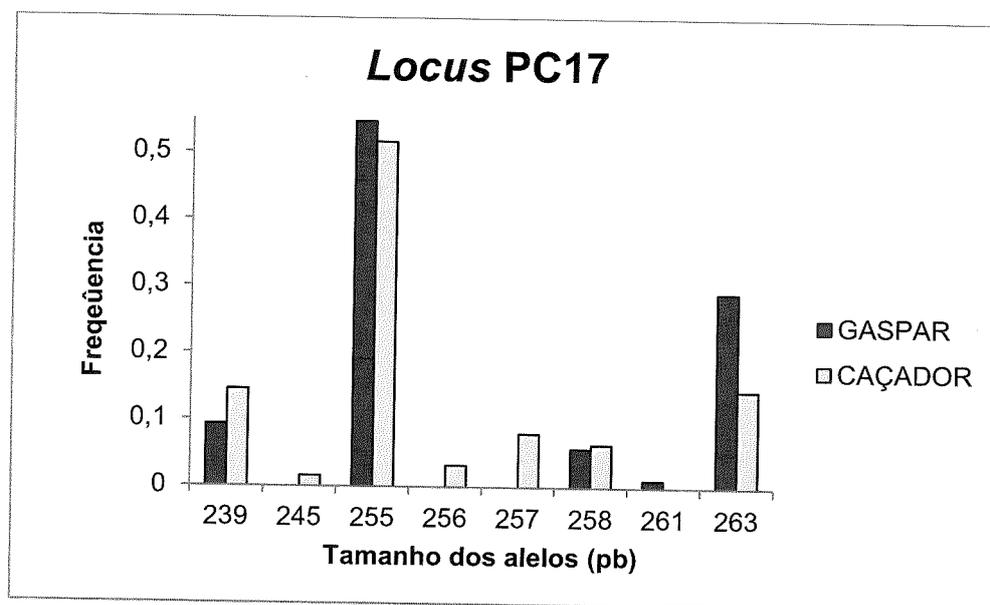


Figura 3. Histograma das frequências dos alelos e seus respectivos tamanhos (pb), para o locus PC17 nas populações de *Rhamdia quelen*, GASPAR E CAÇADOR.

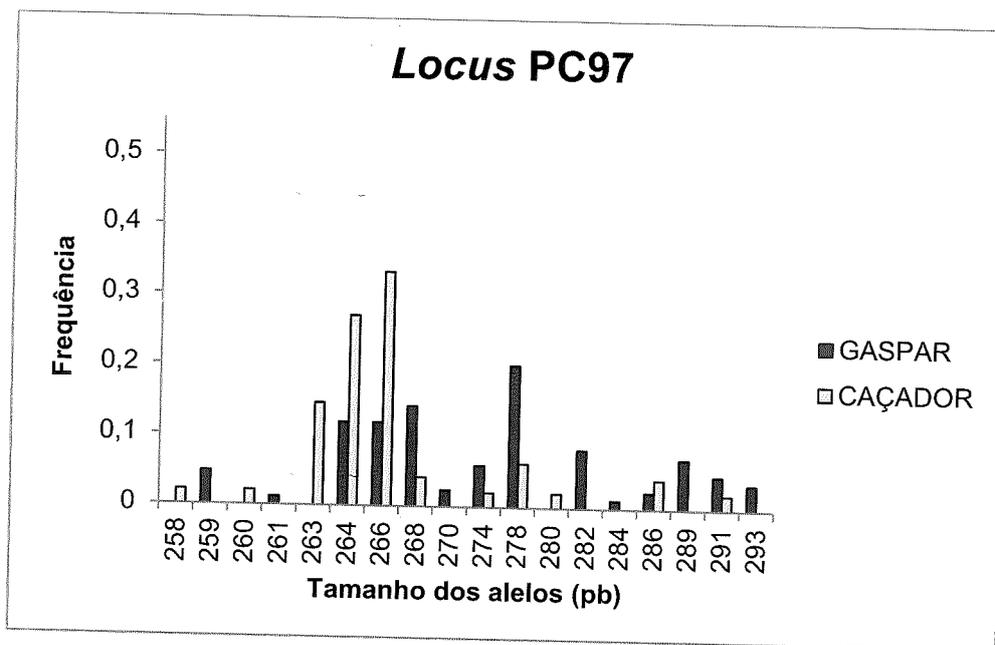


Figura 4. Histograma das frequências dos alelos e seus respectivos tamanhos (pb), para o *locus* PC97 nas populações de *Rhamdia quelen*, GASPAR E CAÇADOR.

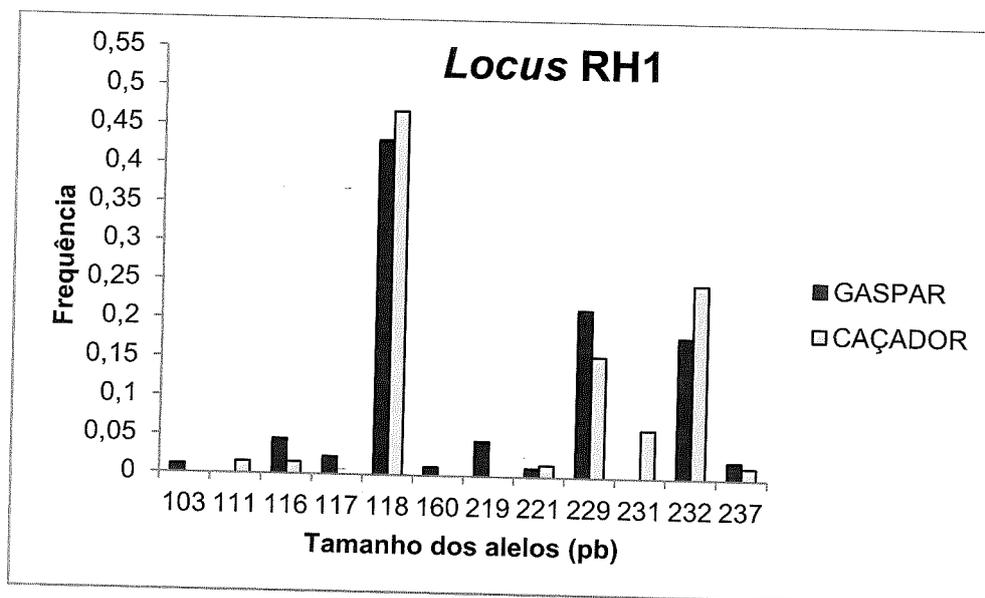


Figura 5. Histograma das frequências dos alelos e seus respectivos tamanhos (pb), para o *locus* RH1 nas populações de *Rhamdia quelen*, GASPAR E CAÇADOR.

A heterozigidade esperada (H_E) variou de 0,612 (*locus* PC17) a 0,898 (PC97) na população GASPAR e de 0,690 (PC17) a 0,830 (Pcor2) na população CAÇADOR. Os valores de heterozigidade observada (H_O) variaram de 0,625 (PC97 – população CAÇADOR) a 0,977 (RH1 – GASPAR). As populações não se

encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), apresentando desvios significativos ($p < 0,01$) na maioria dos *loci* analisados. Os valores do coeficiente de endogamia (F_{IS}) foram estatisticamente significativos para cada população considerando todos os *loci* e para todos os *loci* e todas as populações ($p < 0,01$) (Tabela 2).

Os valores médios do conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram 0,776 para a população GASPARGAR e 0,734 para a CAÇADOR, demonstrando elevado poder informativo dos cinco *loci* de microssatélites analisados (Tabela 2).

Tabela 2. Número de indivíduos genotipados (N), número de alelos totais e efetivos por *locus* por população (A e A_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_E), probabilidade da população se encontrar em equilíbrio de Hardy-Weinberg (P), conteúdo de informação polimórfica (PIC) e coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada população.

População	Pcor1	Pcor2	PC17	PC97	RH1	Média	
	N	42	44	43	42	44	43
	A	8	15	5	14	10	10,4
	A_e	4,860	8,850	2,570	9,813	3,790	5,977
GASPARGAR	H_o	0,952	0,841	0,860	0,786	0,977	0,8832
	H_E	0,794	0,887	0,612	0,898	0,736	0,7854
	P	0,0037	0,0036	0,0016	0,0000	0,0000	0,00178
	PIC	0,7848	0,8770	0,6046	0,8874	0,7283	0,77642
	F_{IS}^*	-0,2010	0,0520	-0,1710	0,1260	-0,3317	-0,10514
	N	26	30	31	24	32	28,6
	A	10	10	7	11	8	9,2
	A_e	5,820	5,870	3,220	5,030	3,320	4,652
CAÇADOR	H_o	0,960	0,667	0,806	0,625	0,750	0,7616
	H_E	0,824	0,829	0,690	0,801	0,699	0,7686
	P	0,1661	0,000	0,7542	0,0000	0,1071	0,20550
	PIC	0,8120	0,7061	0,6795	0,7847	0,6884	0,73414
	F_{IS}^*	-0,1625	-0,1994	-0,171	0,223	-0,073	0,00318

*Valores negativos de F_{IS} expressam excesso de heterozigosidade.

Tabela 3. Frequência alélica dos alelos mais frequentes e alelos exclusivos para cada população.

Locus	População	Alelos frequentes	Frequência Alélica	Alelos Exclusivos
PC17	GASPAR	239 / 255 / 263	0,09 / 0,54 / 0,29	-
	CAÇADOR	239 / 255 / 263	0,14 / 0,51 / 0,14	257 / 256
PC97	GASPAR	264 / 266 / 268 / 278	0,11 / 0,11 / 0,14 / 0,20	289 / 282 / 259 / 270
	CAÇADOR	263 / 264 / 266 /	0,14 / 0,27 / 0,33	280
Pcor1	GASPAR	81 / 83 / 85 / 87 / 91	0,14 / 0,26 / 0,30 / 0,15 / 0,07	186
	CAÇADOR	85 / 87 / 144	0,34 / 0,16 / 0,16	248 / 144
Pcor2	GASPAR	181 / 203 / 207 / 226 / 236	0,11 / 0,14 / 0,21 / 0,12 / 0,10	244 / 217 / 171
	CAÇADOR	181 / 213 / 226 / 236	0,26 / 0,28 / 0,10 / 0,10	95 / 224
RH1	GASPAR	118 / 229 / 232	0,43 / 0,21 / 0,18	219 / 103 / 160 / 117
	CAÇADOR	118 / 229 / 232	0,46 / 0,15 / 0,25	-

3.2 ANÁLISE INTERPOPULACIONAL

A diferenciação alélica e genotípica entre as duas populações foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$), considerando os quatro *loci* juntos e cada *locus* individualmente, com exceção do RH1.

O valor de divergência genética total (F_{ST}) foi de 0,01939, indicando baixo nível de estruturação genética nas populações. A análise de variância molecular (AMOVA) demonstrou que a maior variabilidade genética se encontra dentro das populações (98,6%), sendo muito pequena (1,94%) entre as populações (Tabela 4).

Tabela 4. Análise de variância molecular (AMOVA) para as populações GASPAR e CAÇADOR.

Fonte de Variação	Soma dos Quadrados	Varição (%)
Entre as populações	2,676	1,94%
Dentro das populações	162,857	98,06%

Índice de Fixação (F_{ST}) = 0,01939

4 DISCUSSÃO

Os resultados intrapopulacionais obtidos demonstraram que a variabilidade genética das populações cativas, GASPAR e CAÇADOR, é alta, com baixos níveis de diferenciação genética. Os marcadores microssatélites utilizados neste estudo se mostraram ferramentas eficientes para a análise da variabilidade genética das populações de *Rhamdia quelen*. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) é um indicador da qualidade do marcador molecular em estudos genéticos, e de acordo com a classificação de Botstein *et al.* (1980), valores superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,5 são mediamente informativos, e valores inferiores a 0,25 são pouco informativos. A média de PIC observada para os cinco marcadores microssatélites utilizados foi 0,755, indicando que estes possuem elevado poder informativo, confirmando assim a eficácia na utilização destes marcadores para *R. quelen*. Este valor é consistente com os publicados por Ribolli e Zaniboni-Filho (2009), em estudo com *R. quelen* (0,706), e por Neto (2008) e Dantas *et al.* (2009), em estudos com *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) (0,80 e 0,699, respectivamente).

O número médio de alelos por *locus* foi inferior aos encontrados para populações naturais de peixes da família Pimelodidae, como o *P. corruscans*, analisado por Benites (2008) e Pereira *et al.* (2008). Os autores estimaram médias de 17 e 15,2 alelos/*locus* respectivamente. Ribolli *et al.* (2012) estudando o bagre *Pimelodus maculatus* (mandi) observou uma média de 15,8 alelos/*locus*. Em experimento realizado com exemplares de *R. quelen* produzidos em cativeiro, com os mesmos *loci* utilizados no presente trabalho, Ribolli e Zaniboni-Filho (2009), encontraram uma média de 6,6 alelos por *locus*, inferior a aqui relatada. O número de alelos/*locus* observados nas populações GASPAR e CAÇADOR foi menor em relação aos obtidos para populações naturais de outras espécies da mesma família. Estes resultados sugerem que em condições de cativeiro as populações analisadas tem perdido um significativo número de alelos.

Em ambas as populações, o número de alelos/*locus* foi superior ao número de alelos efetivos, assinalando a distribuição desigual de frequências alélicas, com alto número de alelos de baixa frequência, o que, segundo Raposo *et al.* (2007), é normal em análises com microssatélites. Este valor se aproxima dos relatados por

Dantas (2010) (média de 4,66) e Neto (2008) (média de 6,92), em estudos com *P. corruscans*, e excede àqueles obtidos por Souza (2012) (média de 3,91) em *Phractocephalus hemioliopterus* (pirarara) e por Lamkon (2008), nos catfishes *Ictalurus furcatus* (bagre azul) e *Ictalurus punctatus* (bagre do canal) (média de 3,15). O número de alelos efetivos, os quais serão passados para a próxima geração, foi de 5,32, indicando que muitos alelos são raros ou se apresentaram em baixa frequência. A presença de poucos alelos com elevada frequência pode sugerir que as populações estão adaptadas às condições de cativeiro, uma vez que estes alelos são selecionados naturalmente pelo ambiente de cultivo.

A heterozigosidade média observada e esperada para as populações analisadas foi de 0,822 e 0,777, respectivamente. Os valores superiores de heterozigosidade observada em relação à esperada indicam que não houve aumento do número de homozigotos, e conseqüentemente, que a variabilidade genética das populações é alta. Ribolli e Zaniboni-Filho (2009), analisando estoque de reprodutores de *R. quelen* registraram médias de H_E (0,72) menores do que as de H_O (0,76), como no presente estudo, uma vez que utilizaram os mesmo marcadores moleculares. Melo *et al.* (2006) (*Oreochromis sp.* – tilápia) e Lopera-Barreto *et al.* (2010) (*Piaractus mesopotamicus* – pacu), utilizando marcadores microssatélites em populações cultivadas, também encontraram valores de heterozigosidade observada relativamente maiores do que os de esperada, caracterizando grande diversidade genética. Além destes, estudos realizados com marcadores moleculares RAPD, demonstraram alta variabilidade genética em populações cativas de *Brycon orbignyanus* (piracanjuba) (Lopera-Barreto, 2008), *Leporinus elongatus* (piapara) (Gomes *et al.*, 2008) e *P. mesopotamicus* (Povh, 2009). Diferente do presente trabalho, estudos acerca de populações cultivadas mostram valores de heterozigosidade observada inferiores aos esperados, representando perda de variabilidade genética, como em um estudo com *P. corruscans*, desenvolvido por Neto (2008), onde o valor obtido de H_E foi 0,83 e de H_O foi 0,62. A redução da diversidade genética nos cultivos se deve, geralmente, a manejos reprodutivos mal planejados (com pouco ou nenhum controle de endogamia, pequeno número efetivo de reprodutores, intensa seleção individual, etc.), os quais são responsáveis pelo aumento do número de homozigotos. Elevados valores de H_O indicam que as populações possuem base genética ampla o bastante

para formarem novos estoques e populações base para programas de melhoramento genético.

De acordo com Romana-Éguia *et al.* (2004), as diferenças entre a H_E e a H_O são sempre esperadas nas populações cultivadas, uma vez que os desvios na frequência gênica, provocados eventualmente pela deriva genética, tendem a aumentar ao longo das gerações. A maioria dos *locus* apresentou desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). Estes desvios não podem ser atribuídos à endogamia, uma vez que o baixo valor médio de F_{IS} (-0,05098) ressalta que este desequilíbrio não representa um déficit significativo de heterozigosidade, descartando assim a possibilidade de cruzamentos consanguíneos. Lopera-Barreto *et al.* (2010), em análise com populações cativas de *P. mesopotamicus*, encontraram F_{IS} médio de -0,358, e Dantas (2009 e 2010), estudando *P. corruscans*, achou valores médios de 0,045 e 0,034, respectivamente, evidenciando também que não houve endogamia. No entanto, o aumento da endogamia é comum e geralmente esperado dentro dos cultivos, principalmente daqueles com manejo reprodutivo precário e com pouco controle. Diversos trabalhos mostram desvios significativos do HWE causados pelo excesso do número de homozigotos, proveniente de cruzamentos consanguíneos, como o de Pereira *et al.*, com *P. corruscans* ($F_{IS}=0,176$) e de Souza (2007), com *Oreochromis niloticus* (tilápia do Nilo), que registrou o máximo valor possível de endogamia ($F_{IS}=1$). Deste modo, os índices de endogamia estão diretamente relacionados com o manejo adotado em cada cultivo, bem como seu frequente monitoramento.

Uma hipótese consistente para explicar esse desvio do HWE e para a elevada diversidade genética observada seria a generalização e subestimação da espécie *Rhamdia quelen* durante a revisão sistemática de Silfvergrip (1996), que afirmou que mesmo possuindo características diferentes devido à variação geográfica, as populações pertencem à mesma espécie. Em revisão do gênero, Anza (2006), descreveu e diagnosticou cinco espécies distintas de *Rhamdia* em drenagens costeiras do sudeste e sul do Brasil, região de origem das populações GASPAR e CAÇADOR, analisadas no presente estudo. Segundo Anza (2006) existem grandes evidências de que populações tratadas como *Rhamdia quelen*, na revisão de Silfvergrip (1996), pertençam de fato a mais de uma espécie. A confusão na descrição e a generalização do gênero deixa dúvidas no que diz respeito à

classificação correta das populações de *R. quelen*. Isto pode ter contribuído para um incremento do *pool* genético da população inicial, a qual deu origem as linhagens GASPAR e CAÇADOR, devido à captura de indivíduos de espécies distintas de *R. quelen* e posterior hibridação dos reprodutores em condições de cativeiro. De acordo com Arnold e Hodges (1995), esse processo de hibridação natural possibilita o surgimento de genótipos que podem estabelecer novas linhagens evolutivas. O sucesso da hibridação interespecífica em peixes da classe siluriformes, como *P. corruscans* com *P. fasciatum*, *P. corruscans* com *Hemiosorubim platyrhynchos*, *P. corruscans* com *Phractocephalus hemioliopus*, *P. fasciatum* com *P. hemioliopus*, *P. corruscans* com *Leiarius marmoratus*, entre outros, é descrito em diversos trabalhos, como o de Godinho (2007) e o de Porto-Foresti *et al.* (2008).

Somado a isto, esse desvio do HWE pode ter sido causado, ou até acrescido, por uma provável mistura de populações de origens distintas de *R. quelen* dentro de um mesmo lote no cultivo. Essa introdução acidental de indivíduos de outras populações da espécie, no transcorrer do histórico em cativeiro, ocasionou fluxo gênico, ou seja, migração de genes entre populações, e quanto mais intenso foi esse fluxo, menor a probabilidade de estruturação interpopulacional. O fluxo gênico unidirecional de uma população para outra aumenta a probabilidade de incorporação de novos alelos assim como a diminuição do coeficiente de endogamia da população. A presença de um número significativo de alelos exclusivos em cada população reforça esta hipótese.

De acordo com Wright (1978), valores de F_{ST} (índice de fixação) de 0 a 0,05 indicam pouca diferenciação genética entre populações, 0,05 a 0,15 moderada diferenciação, 0,15 a 0,25 alta diferenciação e acima de 0,25 diferenciação muito elevada. O valor de F_{ST} obtido neste estudo foi 0,01939, evidenciando que há pouca diferenciação genética entre as populações GASPAR e CAÇADOR, e ambas possuem baixa estruturação genética. Resultado semelhante foi encontrado por Dantas (2010) ($F_{ST} = 0,0220$), que concluiu que não existe diferenciação genética significativa entre as populações de *P. corruscans* analisadas. A análise de variância molecular (AMOVA) evidenciou que a maior variação genética se encontra dentro das populações, 98,6%, enquanto entre estas a variação é de apenas 1,94%. Valores similares foram registrados por Benites (2008), que encontrou variação de 10,76% entre populações de *P. corruscans* e 89,24% dentro delas; por Ribolli *et al.*

(2012) (variação de 1,49% entre e 97,07% dentro de populações de *P. maculatus*); e por Souza (2012) (variação de 8% entre e 92% dentro de populações de *P. hemioliopterus*). Os baixos valores de diferenciação genética (F_{ST}) entre GASPARGASPAR e CAÇADOR podem indicar que estas fazem parte de uma única população, fato reforçado pela presença dos mesmos alelos, com elevadas frequência, em ambas as populações. As populações GASPARGASPAR e CAÇADOR estão sendo cultivadas na mesma fazenda experimental e assim, sendo submetidas às mesmas forçantes ambientais. Essa tendência ao aumento da frequência dos mesmos alelos estaria indicando pressões de seleção semelhantes para ambas as populações, levando as mesmas a uma maior homogeneidade genética através do tempo.

5 CONCLUSÃO

Os marcadores microssatélites utilizados neste estudo se mostraram ferramentas eficientes para a análise da estrutura e variabilidade genética das populações cativas de *Rhamdia quelen*, GASPAR e CAÇADOR. Os resultados obtidos demonstram que a variabilidade genética das populações é alta, e estas se encontram pouco estruturadas, mas com frequências gênicas e genotípicas significativamente distintas.

Com base na elevada variabilidade genética estimada, as linhagens GASPAR e CAÇADOR podem ser consideradas adequadas para compor uma população base de programas de melhoramento, mas devido às similaridades observadas entre elas, as mesmas devem ser tratadas como uma única população.

O manejo reprodutivo adotado nos cultivos do Campo Experimental de Piscicultura de Camboriú – CEPC mostrou-se adequado, garantindo a manutenção da variabilidade genética das populações cultivadas ao longo das gerações. No entanto se faz necessário o monitoramento contínuo da variabilidade genética e dos níveis de endogamia dos lotes cultivados para que a piscicultura do *Rhamdia quelen* na região Sul do Brasil se torne cada vez mais eficiente e rentável.

Apesar do grande poder de transferibilidade dos quatro *loci* de microssatélites de *Pseudoplatystoma corruscans* em *Rhamdia quelen*, ainda se faz necessário o desenvolvimento de mais *locus* específicos para a espécie, pois isto ampliaria a gama de *locus* disponíveis, aumentando a precisão dos diagnósticos, e possibilitaria a realização de análises de paternidade, procedimento muito comum e efetivo a partir de marcadores microssatélites.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. R.; YASUI, G. S. O manejo da reprodução natural e artificial e sua importância na produção de peixes no Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.2, p.166-172, 2003.
- ANZA, J. A. **Revisão das espécies do gênero *Rhamdia* (Siluriformes: Heptapteridae) de drenagens costeiras do sul e sudeste do Brasil, um exemplo de diversidade subestimada do gênero**. 148p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) – Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- ARNOLD, M. L.; HODGES, S. A. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? **Tree**, v.10, n.2, p. 67-71, 1995.
- BALDISSEROTTO, B.; NETO, J. R. **Criação de jundiá**. Santa Maria: UFSM, 2004.
- BENITES, C. **Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae), da Bacia Paraná – Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microssatélite**. 74 p. Tese (Doutorado em Aquicultura) - Centro de Aquicultura, UNESP, Jaboticabal, São Paulo, 2008.
- BOTSTEIN, D.; WHITE, R. P.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American Journals of Human Genetics**, v.32, p. 314–331, 1980.
- CARNEIRO, P. C. F.; BENDHACK, F.; MIKOS, J. D.; SCHORER, M.; OLIVEIRA FILHO, P. R. C. Jundiá: um grande peixe para a Região Sul. **Panorama da Aquicultura**, v.12, p. 41-46, 2002.
- DANTAS, H. L.; OLIVEIRA, K. K. C.; SILVA, S. M. C.; PINHEIRO, A. C. A. S.; COIMBRA, M. R. M. **Estrutura genética de duas populações selvagens do surubim, *Pseudoplatystoma corruscans*, localizadas no rio São Francisco**. Trabalho apresentado na 9. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2009.
- DANTAS, H. L. **Avaliação da estrutura genética do surubim, *Pseudoplatystoma Corruscans* (Actinopterygii: Siluriformes) como subsídio para o repovoamento do submédio São Francisco**. 48p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2010.
- DE LEON, F. J. G.; CANONNE, M.; QUILLET, E.; BONHOMME, F.; CHATAIN, B. The application of microsatellite markers to breeding programmes in the sea bass, *Dicentrarchus labrax*. **Aquaculture**. v. 159, p. 303-316, 1998.

- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin v. 3.1.1: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evol. Bioinform.** v.1, p. 47-50, 2005.
- FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4.ed. Edinburgh: Longman Group Limited, 1996.
- FERGUNSON, A.; TAGGART, J. B.; PRODÖHL, P. A.; McMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; McGINNITY, P.; HYNES, R. A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to Salmo. **Journal of Fish Biology**. v. 47, p. 103-126, 1995.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, 1998.
- PORTO-FORESTI, F.; HASHIMOTO, D. T.; ALVES, A. L.; ALMEIDA, R. B. C.; SENHORINI, J. A.; BORTOLOZZI, J.; FORESTI, F. Cytogenetic markers as diagnoses in the identification of the hybrid between Piauçu (*Leporinus macrocephalus*) and Piapara (*Leporinus elongatus*). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 195-202, 2008.
- GODINHO, H. P. Estratégias reprodutivas de peixes aplicadas à aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. **Revista Brasileira de Reprodução animal**, v.31, n.3, p. 351-360, 2007.
- GOMES, L. C.; GOLOMBIESKI, J. I.; GOMES, A. R. C.; BALDISSEROTTO, B. Biologia do jundiá *Rhamdia quelen* (teleostei, pimelodidae). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 30, n. 1, p. 179-185, 2000.
- GOMES, P. C.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M., POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N. Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. **Acta Sci. Anim. Sci.**, v.30, p. 241-247, 2008.
- HILSDORF, A; KRIEGER, J. E. Biologia molecular na conservação de peixes: ferramentas moleculares e conservação genética. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**. v.1, p. 10-12, 1998.
- KOCHER, T. D.; LEE, W. J.; SOBOLEWSKA, H.; PENMAN, D.; McANDREW, B. A genetic linkage map of a cichlid fish, the tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Genetics**, v.148, p.1225-1232, 1998.
- LAMKON, T.; KUCUKTAS, H.; LIU, Z.; LI, P.; NA-NAKORN, U.; KLINBUNGA, S.; HUTSON, A.; CHAIMONGKOL, A.; BALLENGER, J.; UMALI, G.; DUNHAM, R. A. Microsatellite variation among domesticated populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and blue catfish (*I. furcatus*). **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin**, v.32, p.1-11, 2008.
- LITT, M.; LUTY, J. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal Human Genetic**, v.44, p. 398-401, 1989.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SIROL, R. N.; GOMES, P. C.; VARGAS, L.; MANGOLIN, C. A.; Variabilidad genética de lotes de *Brycon orbignyanus* utilizados en programas de repoblamiento: manejo y conservación. **Acta biol. Colomb.**, v.13, p. 107-118, 2008.

LOPERA-BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; POVH, J. A.; SIROL, R. N.; MANGOLIN, C. A. Avaliação genética de populações naturais e de estoques de um programa de repovoamento de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) utilizando marcadores microssatélite. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, p. 954-963, 2010.

MELO, D. C.; OLIVEIRA, D. A. A.; RIBEIRO, L. P.; TEIXEIRA, C. S.; SOUSA, A. B.; COELHO, E. G. A.; CREPALDI, D. V.; TEIXEIRA, E. A. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microssatélites. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, p. 87-93, 2006.

MOESER, A. A.; BERMINGHAM, E. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). **Molecular Ecology Notes**, v.5, p. 363-365, 2005.

NETO, M. A. **Avaliação genética do estoque fundador de surubim, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), para o repovoamento do submédio rio São Francisco.** 55p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) - Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2008.

NORRIS, A. T.; BRADLEY, D. G.; CUNNINGHAM, E. P. Microsatellite genetic variation between and within farmed and wild Atlantic salmon *Salmo salar* populations. **Aquaculture**, v.180, p. 247-264, 1999.

O'REILLY, P.; WRIGHT, J. M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology**. v.47, p. 29-55, 1995.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, J. R.; SOTO, D. Estudo setorial para consolidação de uma aquicultura sustentável no Brasil. **Grupo Integrado de Aquicultura e Estudos Ambientais**. Curitiba, 2007.

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecology of Freshwater Fish**. v.18, p. 215-225, 2008.

POVH, J. A.; RIBEIRO, R. P.; LOPERA-BARRERO, N. M.; GOMES, P. C.; BLANCK, D. V.; VARGAS, L.; JACOMETO, C. B.; LOPES, T. S. Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, p. 1191-1195, 2009.

- RAPOSO, A.; MARTINS, K.; CIAMPI, A. Y.; WADT, L. H. O.; VEASEY, E. A. Diversidade genética de populações de andiroba no Baixo Acre. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.42, p. 1291-1298, 2007.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p. 248-249, 1995.
- RESENDE, E. K.; RIBEIRO, R. P.; LEGAT, A. P.; BENITES, C. Melhoria genética em peixes – uma revolução na aquicultura do Brasil. 2008. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/ADM130.pdf>>. Acesso em 05/07/2012.
- REVALDAVES, E.; PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v.5, p. 463-465, 2005.
- RIBOLLI, J.; ZANIBONI-FILHO, E. Individual contributions to pooled-milt fertilizations of silver catfish *Rhamdia quelen*. **Neotropical Ichthyology**, v.7, p. 629-634, 2009.
- RIBOLLI, J.; MELO, M. R.; ZANIBONI-FILHO, E. Genetic characterization of the Neotropical catfish (Pimelodidae, Siluriformes) in the Upper Uruguay River. **Genetics and Molecular Biology**, v.35, p. 761-769, 2012.
- ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDAB, M.; BASIAOA, Z. U.; TANIGUCHI, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stocks evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA. **Aquaculture**, v.236, p. 131-150, 2004.
- SEKINO, M.; SUGAYA, T.; HARA, M.; TANIGUCHI, N. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, Amsterdam, v.233, p. 163-172, 2004.
- SILFVERGRIP, A. M. C. **A sistemática revisão do neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. 156 p. Tese (Doutorado em Zoologia) – Department of Zoology, Stockholm University and Department of Vertebrate Zoology, Swedish Museum of Natural History, Stockholm, Sweden, 1996.
- SOUZA, C. A. **Desenvolvimento e identificação de microssatélites para pirarara – *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes, Pimelodidae) – para análise de variabilidade genética**. 70p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, 2012.
- SOUZA, M. E. **Caracterização genética de reprodutores de tilápia: estratégias para a manutenção da variabilidade**. 77p. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2007.

WEBER, Z.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **Am. J. Human Genet.** v.44, p. 388-396, 1989.

WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations.** 511p. Chicago: University of Chicago, 1978.