

MIGUEL ARCANJO DOS SANTOS NETO

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DO ESTOQUE FUNDADOR DE SURUBIM,
Pseudoplatystoma corruscans (Spix & Agassiz, 1829), PARA O
REPOVOAMENTO DO SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO.**

**Recife, PE
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA**

MIGUEL ARCANJO DOS SANTOS NETO

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DO ESTOQUE FUNDADOR DE SURUBIM,
Pseudoplatystoma corruscans (Spix & Agassiz, 1829), PARA O
REPOVOAMENTO DO SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO.**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e
Aqüicultura da Universidade Federal Rural
de Pernambuco, para a obtenção do título de
Mestre em Recursos Pesqueiros e
Aqüicultura.**

**MARIA RAQUEL MOURA COIMBRA
Orientadora**

**Recife, PE
Julho, 2008**

Ficha catalográfica
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

S237a Santos Neto, Miguel Arcanjo dos
Avaliação genética do estoque fundador de surubim,
Pseudoplatystoma corruscans (Spix & Agassiz, 1829), para o
repopoamento do submédio Rio São Francisco / Miguel
Arcanjo dos Santos Neto. – 2008.
55 f. : il.

Orientador: Maria Raquel Moura Coimbra.
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e
Aqüicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco.
Departamento de Pesca e Aqüicultura.
Inclui referências e anexo.

CCD 639.3

1. Piscicultura
2. Reprodução artificial
3. Repovoamento
4. Estoque fundador
5. Microssatélites
- I. Coimbra, Maria Raquel Moura
- II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E
AQUICULTURA**

**AVALIAÇÃO GENÉTICA DO ESTOQUE FUNDADOR DE SURUBIM,
Pseudoplatystoma corruscans (Spix & Agassiz, 1829), PARA O
REPOVOAMENTO DO SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO.**

Por: Miguel Arcanjo dos Santos Neto

Esta dissertação foi julgada para a obtenção do título de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura** e aprovada em 29/07/2008 pelo Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura, em sua forma final.

Prof. Dr. Paulo Travassos
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra - Orientadora
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Fábio Mendonça Diniz - Membro externo
Embrapa - PI

Prof^ª. Dra. Silvia Helena Lima Schwamborn - Membro Externo
Universidade Estadual da Bahia

Prof. Dr. William Severi – Membro interno
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Eudes de Souza Correia– Membro interno (Suplente)
Universidade Federal Rural de Pernambuco

DEDICATÓRIA

Ao meu pai, Francisco Miguel de Assis,
por todo esforço para que seus filhos jamais
deixassem de estudar, quando ele próprio não
teve a mesma oportunidade;

À minha mãe, Gizélia dos Santos de Assis,
companheira nesta tão nobre missão,
todo o meu amor e reconhecimento;

À minha esposa, Alba Valéria, pelo constante incentivo;

À minha filha Beatriz e ao meu filho Daniel,
aos quais quero transmitir o exemplo;

Dedico esta conquista.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo;

Aos meus pais: Francisco Miguel e Gizélia, pela oportunidade e exemplo;

A minha família, esposa e filhos, como forma de compensar tantas ausências, este agradecimento deveria ser, na verdade, um pedido de perdão;

A Professora Dra. Maria Raquel Moura Coimbra, por ter acreditado no projeto e aceitado ser orientadora, muito contribuindo na formação acadêmica e profissional;

A Companhia Hidro Elétrica do São Francisco – CHESF, pelo apoio e subsídio na concretização deste trabalho, nas pessoas do Gerente Regional de Paulo Afonso, Eng. Carlos Fernando, o Assessor da Gerência, José Francisco Araújo Filho, o Ex-assessor, Airton Freitas Feitosa;

Aos amigos do DEMG, Luiz Henrique Vilaça, Elvidio Landim, Edneide Santana, Valéria Vanda; aos colegas e amigos da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso: Mosânia Félix, Antônio Carlos, George, Carlos, Girlan, Adorival, Josivan, José Carlos, pela ajuda em tantos momentos e situações. Ao D.Sc. José Patrocínio Lopes um agradecimento especial, ao amigo e colega de trabalho, pelo incentivo a seguir adiante e a certeza do apoio incondicional;

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação da UFRPE, pela dedicação e empenho, o que os tornam Eternos Mestres; às servidoras, Telma, Selma e D. Tânia, sempre atenciosas e solícitas;

Agradeço àqueles que primeiro compartilharam as alegrias, eternizadas, e as tristezas, efêmeras, dos resultados de cada novo teste. Amigos e parceiros neste trabalho: Andréa, Bruna, Douglas, Hozana, Karine, Suzianny, Tiago Barbachan, Tiago Cordeiro e Patrícia, que fazem, e fizeram parte do LAGA;

Aos colegas e amigos de sala, incansáveis batalhadores em busca do mesmo objetivo, lutando e vencendo juntos, até um provável novo re-encontro;

Enfim, a todos, que de alguma forma contribuíram com este trabalho,

Eterna gratidão, obrigado!

RESUMO

Pseudoplatystoma corruscans (surubim) é um peixe encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, sendo considerado o primeiro predador da bacia do Rio São Francisco. Diversos fatores vêm comprometendo seriamente as populações de surubim no São Francisco, especialmente no submédio, despertando a necessidade de se investir em programas de propagação artificial que recuperem este recurso. Uma premissa básica de tais programas é utilizar um grande número de indivíduos selvagens como estoque fundador, quando possível, ou alternativamente, um número menor de indivíduos selvagens, mas com pouca relação genética de parentesco. A estrutura genética do plantel de fundadores constitui, portanto, uma informação essencial para o sucesso de um programa de repovoamento. O presente trabalho objetivou avaliar a estrutura genética do plantel de fundadores do programa de repovoamento do surubim, a ser desenvolvido pela Chesf em Paulo Afonso, através da utilização de marcadores moleculares de microssatélite. DNA de 80 reprodutores foram analisados para 5 diferentes marcadores de microssatélite. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida corados com nitrato de prata. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional GENEPOP, onde parâmetros como número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) foram calculados. O programa GenAEx 6.1 foi utilizado para calcular o número de alelos efetivos e o estimador de relação genética (r_{xy}). Os resultados mostraram que o número de alelos variou de 6 a 18 e o de alelos efetivos (A_e), de 3,28 a 9,25. As heterozigosidades médias observadas e esperadas encontradas foram de 0,63 e 0,84, respectivamente. Todos os loci, a exceção do Pcor5, mostraram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$). O coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) médio calculado para os 5 loci foi de 0,24. As análises de desequilíbrio de ligação, quando corrigidas pelo método de Bonferroni, mostraram-se significativas apenas para os loci Pcor21 e Pcor10 ($P < 0,05$). O valor médio do coeficiente de relação genética (r_{xy}) foi de -0,008 para um total de 2926 combinações de possíveis casais. Uma grande diversidade alélica caracterizou o estoque fundador e, muito embora um déficit de heterozigotos tenha sido registrado, uma baixa relação de parentesco foi encontrada para o plantel em questão. Tal déficit parece refletir a estratégia de composição deste plantel em que indivíduos, oriundos do médio e do baixo São Francisco, separados por duas barragens, foram unidos. É possível concluir que o plantel fundador manteve uma diversidade alélica comparável àquela encontrada em estoques selvagens e poderá ser usado em um programa de repovoamento.

Palavras-chave: repovoamento, estoque fundador, microssatélites, índice de relação

ABSTRACT

The surubim, *Pseudoplatystoma corruscans*, is one of the most important native fish species in South American hydrographic basins, especially in São Francisco River, where it is considered a top chain predator. Different aspects have contributed to the decline of this species populations, especially at the submedium São Francisco, thus raising the necessity of a restocking program to recover the resource. A basic principle in such programs is that a large number of unrelated wild fish should ideally be used as founders, when possible or, alternatively, a small number of unrelated wild fish with few genetic relatedness could be used. Therefore, the genetic structure of the founder stock constitutes an essential information to the success of such programs. This project aimed to evaluate the genetic structure of the founder stock of the restocking program of surubim maintained by Chesf in Paulo Afonso city, through the use of microsatellite molecular markers. DNA of 80 breeders were genotyped for 5 different microsatellite markers. PCR products were separated by polyacrylamide gel electrophoresis stained with silver nitrate. Statistical analysis were carried out using GENEPOP software, in which parameters such as number of alleles (A), observed (H_o) and expected heterozygosities (H_e), Hardy-Weinberg deviation, linkage disequilibrium and inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated. GenAEx 6.1 was used to calculate the number of effective alleles and relatedness coefficient (r_{xy}). Results showed that the number of alleles ranged between from 6 to 18 and the number of effective alleles, from 3.28 to 9.25. Average observed and expected heterozygosities were 0.63 and 0.84, respectively. All loci, except Pcor5, showed deviation from Hardy-Weinberg equilibrium ($P < 0,001$). Average inbreeding coefficient (F_{IS}) for the 5 loci was 0.24. The analysis of linkage disequilibrium, when corrected by Bonferroni, were significant for loci Pcor21 and Pcor10 ($P < 0.05$). The average relatedness coefficient (r_{xy}) was -0.008 for a total number of 2926 possible pairwise combinations. A great genetic diversity, expressed in number of alleles and in a low value of average relatedness, was obtained despite a deficit of heterozygotes was observed in this stock. Such deficit seems to reflect the strategy adopted in the composition of this stock, in which individuals caught at the medium and lower São Francisco River, separated by two dams, were mixed together. It is feasible to conclude that this founder stock retained genetic diversity comparable to those found in the wild stocks and could be used in a restocking program.

Keywords: restocking program, founder stock, microsatellite, relatedness.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	08
LISTA DE FIGURAS.....	09
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 Legislação.....	17
2.2 Repovoamento como ação Mitigatória.....	18
2.3 Marcadores Moleculares – Microsatélite.....	19
2.4 Acasalamento em Programas de Repovoamento.....	21
3 ARTIGO CIENTÍFICO.....	23
“Avaliação Genética do Estoque Fundador de Surubim, <i>Pseudoplatystoma corruscans</i> (Agassiz, 1829), para Repovoamento do Submédio Rio São Francisco”.	
Resumo.....	25
1 Introdução.....	26
2 Material e Métodos.....	29
2.1 Coleta das Amostras.....	29
2.2 Extração do DNA.....	30
2.3 Amplificação dos loci de Microsatélite por PCR.....	30
2.4 Eletroforese em gel de Poliacrilamida.....	31
2.5 Análises Estatísticas.....	31
3 Resultados.....	32
4 Discussão	34
Agradecimentos.....	39
Referências.....	39
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
REFERÊNCIAS.....	44
ANEXO A - Normas para publicação no Fisheries Management and Ecology.....	51

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Variabilidade genética do estoque fundador de *Pseudoplatystoma corruscans* da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso para os cinco loci.....33
- Tabela 2.** Faixa de comprimento dos alelos, em pb, para os loci analisados.....34

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bacia hidrográfica do rio São Francisco.	29
--	----

1 INTRODUÇÃO

O surubim, *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix & Agassiz, 1829), é um peixe encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, sendo considerado o primeiro predador da bacia do São Francisco (MARQUES, 1993), onde é muito apreciado pela qualidade de sua carne e por seu tamanho. Esta espécie efetua uma piracema dividida em duas fases distintas: na primeira, os peixes sobem os rios ao se iniciarem as chuvas de verão e durante esta migração suas gônadas preparam-se para a desova, que se processa durante as grandes enchentes, após o que os peixes retornam aos locais de onde provieram, caracterizando a segunda fase. O período de reprodução dos surubins coincide com a estação chuvosa na região do alto São Francisco (GODINHO et al., 1997), o que ocorre a partir de outubro, sendo os meses de dezembro e janeiro os de maior incidência (AGUIRRE, 1954; MENEZES, 1956).

Em 1986, o monitoramento da pesca na região de Pirapora (MG) registrou que cada pescador conseguia uma média de 12 kg por dia, com 86% de participação do surubim, *P. corruscans*, espécie mais valiosa das 150 que povoam o rio São Francisco. Em 1999, a pesagem foi repetida e o volume médio capturado caiu para 3 kg por dia, sendo inexpressiva a presença do surubim (SUASSUNA, 2001).

Diversos fatores, tais como a sobrepesca, as alterações ambientais oriundas do uso múltiplo dos sistemas fluviais, as enchentes e as sucessivas barragens hidrelétricas, que fragmentam o sistema interrompendo as migrações e delimitando as áreas de reprodução, vêm comprometendo seriamente as populações de peixes, especialmente aquelas de piracema, despertando a necessidade de se investir em

programas de propagação artificial que recuperem estes recursos (GODINHO et al., 1997).

A estocagem de peixes, também conhecida como repovoamento ou peixamento, é uma das ações de manejo mais praticadas no mundo (WELCOMME, 1988). Ela consiste na soltura, periódica ou não, de peixes provenientes de um sistema de cultivo em um corpo d'água visando a manutenção, ou introdução, de uma determinada espécie de interesse econômico e/ou ecológico.

Em geral, as estocagens podem ser classificadas em: (a) introdução, quando se efetua a estocagem com uma espécie de peixe não pertencente àquela bacia receptora; (b) manutenção, quando são efetuadas estocagens regulares com a finalidade de manter uma população de peixes, que não é capaz de se reproduzir naturalmente no ambiente onde foi estocado e (c) suplementação, quando se deseja aumentar a população de determinada espécie de peixe, ou sua variabilidade genética (WHITE et al., 1995; AGOSTINHO et al., 2007).

A modalidade de estocagem a ser praticada depende da finalidade desejada, quer seja com propósitos conservacionistas ou comerciais na exploração pesqueira.

A construção de barragens para a exploração do potencial hidráulico dos rios brasileiros na geração de energia elétrica modificou a dinâmica dos ecossistemas fluviais. Tal fato levou à obrigatoriedade legal das concessionárias hidroelétricas em promover o manejo destes reservatórios, tendo na estocagem a principal forma de ação para a redução dos impactos.

Diversos são os aspectos a serem considerados quando da implantação de um programa de repovoamento, fundamentais para o sucesso desta prática. Objetivos claros, metas realistas e monitoramento constante são alguns dos itens que devem fazer parte de qualquer projeto que proponha manejar o corpo d'água

em questão (AGOSTINHO et al., 2007). Um ponto crítico sobre tais programas é que um grande número de reprodutores provenientes do ambiente natural, sem relação de parentesco, é necessário a fim de maximizar a variabilidade genética, diminuindo os impactos sobre a população natural (FAO, 1993).

A variabilidade genética em condições naturais permite que as espécies adaptem-se às diferentes situações a que venham a ser submetidas (O'CONNEL & WRIGHT, 1997). Uma das teorias que justificam essa adaptabilidade baseia-se na vantagem de uma população rica em diferentes alelos em relação a uma população homogênea, ser capaz de produzir um maior número de produtos bioquímicos e, portanto, lidaria melhor com ambientes bioquimicamente variáveis, tanto em nível intracelular, como extracelular (BEAUMONT & HOARE, 2003).

O cultivo em pequenas populações altera a variabilidade genética por conta do acasalamento entre indivíduos aparentados. Estes cruzamentos consangüíneos aumentam a homozigosidade, expondo à manifestação de alelos deletérios e causando depressão por endogamia. Esta condição produz uma diminuição da sobrevivência geral da população, uma variação substancial no crescimento e no desempenho reprodutivo, além de aumentar a taxa de deformidades (KINCAID, 1983; TAVE, 1993).

A recomendação da utilização de um grande número de indivíduos selvagens nos programas de repovoamento torna-se, contudo, inconveniente devido aos muitos entraves envolvendo mão-de-obra, orçamento e espaço (SEKINO et al., 2004). Uma opção viável é o cruzamento de indivíduos selecionados geneticamente, mais do que por cruzamentos aleatórios, como forma de reter a máxima variabilidade genética (BALLOU & LACY, 1995). Esta alternativa prescinde o conhecimento da estrutura genética do estoque de reprodutores.

A estrutura genética de uma população refere-se à distribuição da variabilidade e resulta de diversos fatores como o sistema de acasalamento, fluxo gênico, níveis de endogamia e deriva gênica. Para que se possa entendê-la são estimados parâmetros, tais como frequências alélicas, heterozigosidades esperada e observada, número de alelos, índices de fixação de Wright (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}), índices de relação, representatividade genética, tamanho efetivo populacional, etc, obtidos com a utilização de marcadores moleculares co-dominantes e dominantes (ZUCCHI, 2002).

Um marcador de DNA é tipicamente uma pequena região do DNA apresentando polimorfismo entre indivíduos (LIU, 1998). O termo “marcador” tem sido utilizado para designar fatores morfológicos, bioquímicos ou genéticos passíveis de serem identificados e que permitem o estudo comparativo de genótipos (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Dentre os diversos tipos de marcadores moleculares, destacam-se os de microssatélite, que são repetições simples de pequenas unidades no genoma, de dois a seis pares de bases, chamados motivos, organizados em série. O número de repetições é altamente polimórfico e apresenta herança mendeliana simples (CURRAN, 1997). A região repetitiva pode ser amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando primers complementares às regiões flangeadoras, altamente conservadas entre indivíduos da mesma espécie, o que requer quantidades mínimas de DNA para as reações. As seqüências de microssatélites apresentam comportamento co-dominante, podendo ser utilizadas em estudos que abordam análises de estrutura genético-populacional (PEREZ-ENRIQUEZ & TANIGUCHI, 1999; PEREZ-ENRIQUEZ et al., 2001; BOUDRY et al., 2002; BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002; COIMBRA et al., 2003).

Um total de 5 marcadores de microssatélite já está disponível na literatura para o surubim *P. corruscans*, fornecendo as ferramentas para a análise dos parâmetros genéticos de populações selvagens e de cativeiro (REVADALVES et al., 2005).

A genotipagem deste plantel fundador permitirá conhecer a diversidade genética desta população e programar as cruzas, com base na seleção de indivíduos geneticamente importantes, de modo a permitir não só o aumento populacional desejado, como também a retenção da máxima variabilidade genética.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A ordem Siluriformes inclui os chamados peixes de couro. Apresentam barbilhões e, freqüentemente, o primeiro raio da nadadeira dorsal e das peitorais se constitui de um acúleo forte e pungente. A subordem Siluroidei compreende treze famílias na região neotropical, sete ocorrem no rio São Francisco, dentre elas a Pimelodidae, que é a mais numerosa da subordem e tem como característica distinta a presença de três pares de barbilhões próximos à boca. É composta por um significativo número de gêneros e espécies dulcícolas de hábitos noturnos e dieta variada (SANTOS, 1981; DIAS, 1987; BRITSKI et al., 1988; TAVARES, 1997).

O gênero *Pseudoplatystoma*, que compreende os maiores peixes da família Pimelodidae, ocorre nas maiores bacias hidrográficas sul americanas, entre elas a do Paraná, Amazonas e do São Francisco. Este gênero é constituído por oito espécies: *P. corruscans* (surubim, pintado), *P. fasciatum* (cachara) e *P. tigrinum* (caparari, pirambucu). Na bacia amazônica, ocorrem as espécies *P. fasciatum* e *P. tigrinum*; na bacia do Paraná, *P. fasciatum* e *P. corruscans* e na bacia do São Francisco apenas *P. corruscans* (WELCOMME, 1985; PETRERE, 1995; TAVARES, 1997). Buitrago-Suárez & Burr (2007) descreveram o reconhecimento de cinco novas espécies: *P. magdaleniatum* (rio Magdalena, Colômbia); *P. metaense* (rio Orinoco, Colômbia e Venezuela); *P. orinocoense* (rio Orinoco, Venezuela); *P. reticulatum* (rio Paraná) e *P. punctifer* (rio Amazonas).

A grande disponibilidade de recursos hídricos levou o Brasil a optar pela construção de barragens para o aproveitamento do potencial hidráulico na geração de energia elétrica, que hoje responde por mais de 80% da eletricidade consumida no país. Inicialmente, a exemplo do que ocorreu no mundo, estes reservatórios tinham como objetivo o abastecimento de água e irrigação. Atualmente, com a

percepção do uso múltiplo a que este recurso natural deve atender, a legislação reconhece a água como um bem público, limitado e dotado de valor econômico (AGOSTINHO et al., 2007).

Com a construção e formação do lago, ocorre a alteração da hidrodinâmica do trecho do rio abrangido pelo barramento: o que outrora era lótico passa a ser lântico, causando um efeito sobre a fauna aquática, alterando sua composição e seu equilíbrio ecológico (AGOSTINHO et al., 2007).

Segundo Agostinho et al. (2007), os impactos dos represamentos sobre os ecossistemas podem ser categorizados em (i) impactos de primeira ordem: que englobam as alterações químicas, físicas e geomorfológicas decorrentes da alteração da velocidade do fluxo do rio, e de alterações na distribuição espaço-temporal na vazão; (ii) impactos de segunda ordem: envolvem mudança na produtividade primária e na estrutura do canal, compreendendo o trecho represado e, principalmente, o segmento a jusante da barragem; (iii) impactos de terceira ordem: incluem alterações nas comunidades de invertebrados e peixes decorrentes dos impactos de primeira ordem, como por exemplo, o impedimento da migração reprodutiva, e de segunda ordem, como mudança na biomassa planctônica.

Os peixes migradores situados à jusante das barragens, que desenvolveram suas estratégias reprodutivas ao longo de sua história evolutiva, passam a sofrer restrição à migração, levando a diminuição destas populações, ou mesmo a sua extinção. No trecho a montante, a situação é diferente, embora também possua armadilhas à viabilidade do recrutamento. Os ovos e alevinos ao atingirem o corpo do reservatório estarão mais vulneráveis à predação, visto que a maior transparência da água neste trecho facilita a ação dos predadores e a diminuição da velocidade do

fluxo pode carrear os ovos para as camadas mais profundas do lago, onde o teor de oxigênio pode ser inadequado (AGOSTINHO et al., 2007).

2.1 Legislação

A Lei 2250 de 28 de dezembro de 1927, regulamentada pelo Decreto 4390 de 14 de março de 1928, em seu texto diz: “Todos quantos, para qualquer fim, represarem as águas de rios, ribeirões e córregos são obrigados a construir escadas que permitam a livre subida dos peixes”. Neste sentido, a lei estabelecia a construção das escadas de peixes, não deixando nenhuma possibilidade de outras ações que visassem à preservação da ictiofauna.

O Decreto Lei 794 de 19 de outubro de 1938, flexibilizou este imperativo legal, quando em seu texto declara: “As represas dos rios, ribeirões e córregos devem ter como complemento obrigatório, obras que permitam a conservação da fauna fluvial, seja facilitando a passagem de peixes, seja instalando estações de piscicultura”. Deste modo, cabia ao empreendedor escolher que tipo de obra realizar: ora construindo escadas de peixes, ou estações de piscicultura.

Em 1967, através do Decreto-Lei 221, de 28 de fevereiro de 1967, é delegada à extinta Superintendência para o Desenvolvimento da Pesca (SUDEPE) a tarefa de determinar o melhor mecanismo para a proteção da fauna aquática. A Portaria 46/SUDEPE – 27.01.1971, através do Artigo 36 determina que: “O proprietário ou concessionário de represa em cursos de água, além de outras disposições legais, é obrigado a tomar medidas de proteção à fauna”.

A Lei 6.938, de 31 de agosto de 1981, dispõe sobre a Política Nacional de Meio ambiente. Os Decretos-Lei 88351/1983 e 99274/1990 regulamentaram esta lei. Por estes instrumentos legais, tornou-se obrigatório o Estudo do Impacto Ambiental-

EIA e seu respectivo Relatório de Impacto Ambiental-RIMA, que antecedem a operação do empreendimento. As licenças necessárias são: Licença Prévia – LP; Licença de Instalação - LI e a Licença de Operação – LO. Estes estudos apontarão que medidas deverão ser tomadas para mitigar os impactos oriundos da construção do reservatório em questão, chamados condicionantes. Estas são renovadas periodicamente, ocasião na qual são cobrados os atendimentos às condicionantes fixadas.

2.2 O Repovoamento como ação mitigatória.

O repovoamento, como prática de manejo visando à manutenção de determinada espécie em seu ambiente natural, deve ser precedido de estudos que definam as espécies a serem trabalhadas, local e período de soltura, tamanho dos indivíduos, capacidade de suporte do reservatório, origem dos exemplares no tocante a qualidade genética e mecanismos de controle e monitoramento desta ação, como forma de permitir ajustes, quando necessário (COWX, 1994; AGOSTINHO et al., 2007).

Para Cowx (1994), a primeira recomendação seria verificar a real necessidade da ação de repovoamento do corpo de água em questão, planejá-la e só então executar. Para isto é imprescindível o conhecimento prévio da dinâmica destes recursos naturais, as interações entre suas populações e os mecanismos de exploração a que estão submetidos.

Em geral, as estocagens podem ser classificadas em (a) introdução, quando se efetua a estocagem com uma espécie de peixe não pertencente àquela bacia receptora; (b) manutenção, quando são efetuadas estocagens regulares com a finalidade de manter uma população de peixes, que não é capaz de se reproduzir

naturalmente no ambiente onde foi estocado; (c) suplementação, quando se deseja aumentar a população de determinada espécie de peixe, ou sua variabilidade genética (WHITE et al., 1995; AGOSTINHO et al., 2007).

2.3 Marcadores Moleculares – Microssatélite

Um grande avanço nas pesquisas genéticas voltadas à aqüicultura foi dado com o emprego da tecnologia dos marcadores de DNA. A profusão de marcadores moleculares, incluindo aloenzimas, Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLPs), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPDs), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLPs), microssatélites, Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) e Expressed Sequence Tags (ESTs), proporcionou a sua utilização em larga escala nos desafios enfrentados na aqüicultura. As aplicações são várias, como a avaliação da variabilidade genética em cruzamentos endogâmicos, transmissão parental, caracterização de espécies e linhagens, hibridização, construção de mapas de ligação para a identificação de loci de herança quantitativa (Quantitative Trait Loci - QTL) (LIU & CORDES, 2004; ROMANA-EGUIA et al., 2005).

Estes marcadores são classificados em duas categorias: o tipo I são aqueles associados a genes ou locus de funções conhecidas, como é o caso das aloenzimas, das ESTs e RFLP. Os marcadores moleculares do tipo II estão associados a segmentos do genoma desconhecido ou que não codificam aminoácido. Neste grupo estão os marcadores de RAPD, AFLP, microssatélites, entre os mais utilizados (LIU & CORDES, 2004).

Microssatélites são pequenas seqüências do genoma (Simple Sequence Repeats - SSRs), de 2 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em blocos, ou *tandem*. Abundantes nos eucariontes, as microssatélites têm sido estimadas em

freqüência de uma a cada 10 kb nos peixes (WRIGHT, 1993), tendendo a estar uniformemente distribuídas em todos os cromossomos e em todas as regiões do cromossomo. Elas são encontradas dentro das regiões codificantes, introns, e nas seqüências não gênicas. De forma geral, as microssatélites que possuem um grande número de repetições são mais polimórficas. O polimorfismo de microssatélites é baseado na diferença de tamanho de cada bloco de repetição em série de um locus específico. A taxa de mutação de microssatélites tem sido reportada acima de 10^{-2} por geração (WEBER & WONG, 1993; CRAWFORD & CUTHBERTSON, 1996), acredita-se que esta mutação é provocada pelo deslizamento da polimerase durante a replicação do DNA, causando a diferença no número de unidades de repetições (LEVINSON & GUTMAN, 1987; TAUTZ, 1989).

Estudos em famílias humanas têm demonstrado que novas mutações de microssatélites usualmente diferem dos alelos parentais de uma a duas repetições (WEBER & WONG, 1993), favorecendo um modelo progressivo de mutação (stepwise mutation model) (ESTOUP & CORNUET, 1999). Entretanto, em poucas espécies de peixes, foram observados alelos com uma grande variação do número de repetições, prognosticando um modelo de alelos infinitos (Infinite allele model) (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002). O número de repetições é altamente polimórfico e apresenta herança mendeliana simples (CURRAN et al., 1997; LIU & CORDES, 2004).

Além de sua abundância, distribuição genômica aleatória e alto polimorfismo, os marcadores de microssatélites são transmitidos de maneira mendeliana, apresentado co-dominância (LIU & CORDES, 2004).

O grande número de alelos por locus resulta no mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) entre os marcadores de DNA, difundido nas mais

variadas pesquisas de investigações genéticas (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998; LIU & CORDES, 2004). Marcadores de microssatélite têm sido utilizados extensamente na pesquisa com peixes, incluindo a construção de mapas de ligação de peixes (KOCHER et al, 1998; COIMBRA et al., 2003), estudo de paternidade do bacalhau e de ciclídeos (WESMAJERVI et al., 2006; DIERKES et al., 2008) e estrutura genética de estoque (WAS & WENNE, 2002; ALARCÓN et al., 2004; BARROSO et al., 2005).

2.4 Acasalamentos em Programas de Repovoamento

Em programas de repovoamento, para fins de conservação ou produção, a avaliação da estrutura genética do plantel de fundadores é imprescindível para evitar consanguinidade e manter a variabilidade genética. A variabilidade genética pode ser medida através de vários parâmetros, como número de alelos, número de alelos efetivos, heterozigosidade observada e esperada, distância genética e coeficientes de consaguinidade. Este último, F_{IS} , mede a redução de heterozigotos em um grupo de indivíduos devido à reprodução não aleatória dentro de uma subpopulação (HARTL & CLARCK, 1997).

A máxima retenção da variabilidade genética de uma população em cativeiro para os seus descendentes em programas de repovoamento pode ser obtida através de uma seleção, e acasalamento, dos indivíduos geneticamente importantes, diferentemente do que ocorre quando se efetua acasalamento ao acaso (BALLOU & LACY, 1995; SEKINO et al., 2004).

A identificação destes indivíduos geneticamente importantes passa a ser o desafio dos programas de manejo, conduzindo ao desenvolvimento de estratégias. Segundo Ballou & Lacy (1995), diversos coeficientes podem ser utilizados: i)

Founder Importance Coefficient (*fic*); ii) Genome Uniqueness (*gu*) e o iii) Mean Kinship (*mk*). Os indicadores *fic*, *gu* e *mk* atribuem um valor a cada indivíduo, que o habilitará, ou não, a ser usado como reprodutor no momento das cruzas.

Já na identificação de pares, ou casais, que reúnam condições de manter a estrutura genética da população, objeto do programa de repovoamento, há pelo menos três estimadores baseados em marcadores co-dominantes: Ritland (1996), Lynch & Ritland (1999) e Queller & Goodnight (1989).

Um estudo recente identificou o coeficiente de Ritland (1996) como o estimador mais adequado à seleção de casais (SRIPHAIROJ et al. 2007) em programas de manejo.

3. ARTIGO CIENTÍFICO

Os resultados obtidos com o trabalho experimental desta dissertação são apresentados no artigo científico cujo título é: **“AVALIAÇÃO GENÉTICA DO ESTOQUE FUNDADOR DE SURUBIM, *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829), PARA O REPOVOAMENTO DO SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO”**, que será submetido à revista Fisheries Management and Ecology.

ARTIGO CIENTÍFICO**AVALIAÇÃO GENÉTICA DO ESTOQUE FUNDADOR DE SURUBIM,
Pseudoplatystoma corruscans (Agassiz, 1829), PARA O REPOVOAMENTO DO
SUBMÉDIO RIO SÃO FRANCISCO**

Artigo a ser submetido para o Fisheries Management and Ecology.

**SANTOS NETO, M. A. dos ¹; DANTAS, H. L.¹ ; OLIVEIRA, K.K.C¹.; COIMBRA, M.
R. M.^{1*}**

¹ Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil; Laboratório de Genética Aplicada – LAGA, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

*Autor para correspondência:

Maria Raquel Moura Coimbra, Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos Recife-PE, Brasil, 52171-900, Tel: 81-33206522, Fax: 81-33206515 email:

raquel@depaq.ufrpe.br.

RESUMO

Pseudoplatystoma corruscans (surubim) é um peixe encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, sendo considerado o primeiro predador da bacia do Rio São Francisco. Diversos fatores vêm comprometendo seriamente as populações de surubim no São Francisco, especialmente no submédio, despertando a necessidade de se investir em programas de propagação artificial que recuperem este recurso. Uma premissa básica de tais programas é utilizar um grande número de indivíduos selvagens como estoque fundador, quando possível, ou alternativamente, um número menor de indivíduos selvagens, mas com pouca relação genética de parentesco. A estrutura genética do estoque de fundadores constitui, portanto, uma informação essencial para o sucesso do programa de repovoamento. O presente trabalho objetivou avaliar a estrutura genética do estoque de fundadores do programa de repovoamento do surubim, a ser desenvolvido pela Chesf em Paulo Afonso, através da utilização de marcadores moleculares de microssatélite. DNA de 80 reprodutores foram analisados para 5 diferentes marcadores de microssatélite. Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida corados com nitrato de prata. As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa computacional GENEPOP, onde parâmetros como número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, desequilíbrio de ligação e coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) foram calculados. O programa GenAEx 6.1 foi utilizado para calcular o número de alelos efetivos e o estimador de relação genética (r_{xy}). Os resultados mostraram que o número de alelos variou de 6 a 18 e o de alelos efetivos (A_e), de 3,28 a 9,25. As heterozigosidades médias observadas e esperadas encontradas foram de 0,63 e 0,84, respectivamente. Todos os loci, a exceção do Pcor5, mostraram desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$). O coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) médio calculado para os 5 loci foi de 0,24. As análises de desequilíbrio de ligação, quando corrigidas pelo método de Bonferroni, mostraram-se significativas apenas para os loci Pcor21 e Pcor10 ($P < 0,05$). O valor médio do coeficiente de relação genética (r_{xy}) foi de -0,008 para um total de 2926 combinações de possíveis casais. Uma grande diversidade alélica caracterizou o estoque fundador e, muito embora um déficit de heterozigotos tenha sido registrado, uma baixa relação de parentesco foi encontrada para o estoque em questão. Tal déficit parece refletir a estratégia de construção deste estoque em que indivíduos, oriundos do médio, submédio e do baixo São Francisco, separados por barragens, foram unidos. É possível concluir que o estoque fundador manteve uma diversidade alélica comparável àquela encontrada em estoques selvagens e poderá ser usado em um programa de repovoamento.

Palavras-chave: Repovoamento, estoque fundador, microssatélites, índice de relação

1.Introdução

O surubim, *Pseudoplatystoma corruscans*, é um peixe encontrado nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, sendo considerado o primeiro predador da bacia do São Francisco, onde é muito apreciado pela qualidade de sua carne e por seu tamanho (Marques, 1993). Esta espécie efetua piracema e o período de reprodução coincide com a estação chuvosa na região do alto São Francisco, o que ocorre a partir de outubro, sendo os meses de dezembro e janeiro os de maior incidência (Aguirre, 1954; Menezes, 1956; Godinho et al., 1997).

Em um intervalo de menos de 15 anos a captura do surubim foi reduzida a praticamente zero. Em 1986, a participação do surubim no pescado desembarcado em Pirapora (MG) representava 86%. Treze anos depois, a sua participação era inexpressiva (Suassuna, 2001).

Diversos fatores, tais como a sobrepesca, as alterações ambientais oriundas do uso múltiplo dos sistemas fluviais, as enchentes e as sucessivas barragens hidrelétricas, que fragmentam o sistema interrompendo as migrações e delimitando as áreas de reprodução, vêm comprometendo seriamente as populações de peixes, especialmente aquelas de piracema, despertando a necessidade de se investir em programas de propagação artificial que recuperem estes recursos (Godinho et al., 1997). O trecho mais crítico situa-se entre Petrolina (PE) e Paulo Afonso (BA), o chamado submédio São Francisco.

A barragem de Sobradinho-BA encontra-se à montante deste trecho do rio e o complexo de Paulo Afonso-BA, no trecho inferior, existindo uma terceira barragem entre as duas (Itaparica-BA/PE), que delimita os dois reservatórios: o Moxotó e o de Itaparica. A existência destas barragens constitui um obstáculo à migração dos peixes em ambas as direções, seja de natureza trófica ou reprodutiva. Além disto, há

um esforço de pesca elevado sobre estes estoques, em função desta área ser bastante povoada (1,9 milhão de habitantes, segundo o MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2008). Todos estes fatores contribuem para a diminuição, ou mesmo extinção, desta espécie neste trecho do rio.

A Companhia Hidro Elétrica do São Francisco (CHESF) participa do programa de Revitalização da Bacia do São Francisco do Governo Federal desde 2005 para a recuperação da ictiofauna do rio São Francisco. O surubim, *P. corruscans*, foi selecionado como o primeiro recurso a ter um programa de repovoamento devido a aspectos econômicos, sociais e ambientais.

A preservação de espécies de peixes de água doce tem sido tradicionalmente conduzida através de programas de repovoamento em que a conservação da variação genética é um componente essencial (Awise, 1994).

Um ponto crítico em tais programas é que um grande número de reprodutores do ambiente natural, sem relação de parentesco, é necessário a fim de maximizar a variabilidade genética, diminuindo os impactos sobre a população natural (FAO, 1993). A recomendação da utilização de um grande número de indivíduos nestes programas torna-se inconveniente devido aos muitos entraves envolvendo mão-de-obra, orçamento e espaço (Sekino et al., 2004). Desta forma, a opção viável é a utilização de poucos indivíduos selvagens como estoque fundador.

A retenção máxima da variação genética em programas de repovoamento é obtida através do cruzamento de indivíduos geneticamente importantes (Ballou & Lacy, 1995), selecionados a partir da análise da estrutura genética dos reprodutores.

A manutenção da variabilidade genética é necessária para manter tanto a viabilidade quanto a adaptabilidade das populações (Hallerman, 2003). É a variação genética que permite às espécies adaptarem-se às mudanças ambientais (O'Connell

& Wright, 1997). Cada variante alélica em cada locus codificante em uma população pode ser tomada como parte de um recurso genético da população. Um alelo sozinho, ou em combinação com outros alelos ou loci, pode ser responsável por conferir a seu portador uma característica valiosa, como um aumento de resistência a uma doença, uma melhor tolerância ao frio ou um melhor crescimento (Beaumont & Hoare, 2003). Assim, se a persistência em longo prazo das espécies é o objetivo que a biologia da conservação pretende atingir, a variabilidade genética deve ser priorizada.

Além disso, cruzamentos feitos entre peixes oriundos de múltiplas populações resultam na perda da distinção genética de cada população individual, ou seja, da identidade populacional, reduzindo a adaptabilidade pela ruptura de adaptações locais ou co-adaptabilidade de complexos gênicos (Miller & Kapuscinski, 2003).

Uma abordagem que tem sido usada com sucesso na obtenção de parâmetros genéticos é a utilização de marcadores de microsatélite, que apresentam comportamento co-dominante, podendo ser utilizadas em estudos que abordam análises de estrutura genético-populacional (Perez-Enriquez & Taniguchi, 1999; Perez-Enriquez et al., 2001; Boudry et al., 2002; Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Os marcadores são ainda utilizados na identificação de pares, ou casais, que reúnam condições de manter a estrutura genética da população, objeto do programa de repovoamento (Sekino et al, 2004).

A genotipagem do plantel de fundadores da Chesf permitiu conhecer a sua diversidade genética e programar as cruzas, com base na seleção de indivíduos geneticamente importantes de modo a garantir a máxima variabilidade genética no repovoamento.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta das amostras

O plantel de fundadores da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso – EPPA, localizada no Estado da Bahia, Brasil, conta com 99 exemplares, oriundos de 4 localidades distintas, incluindo o médio, submédio e baixo São Francisco (Figura 1).

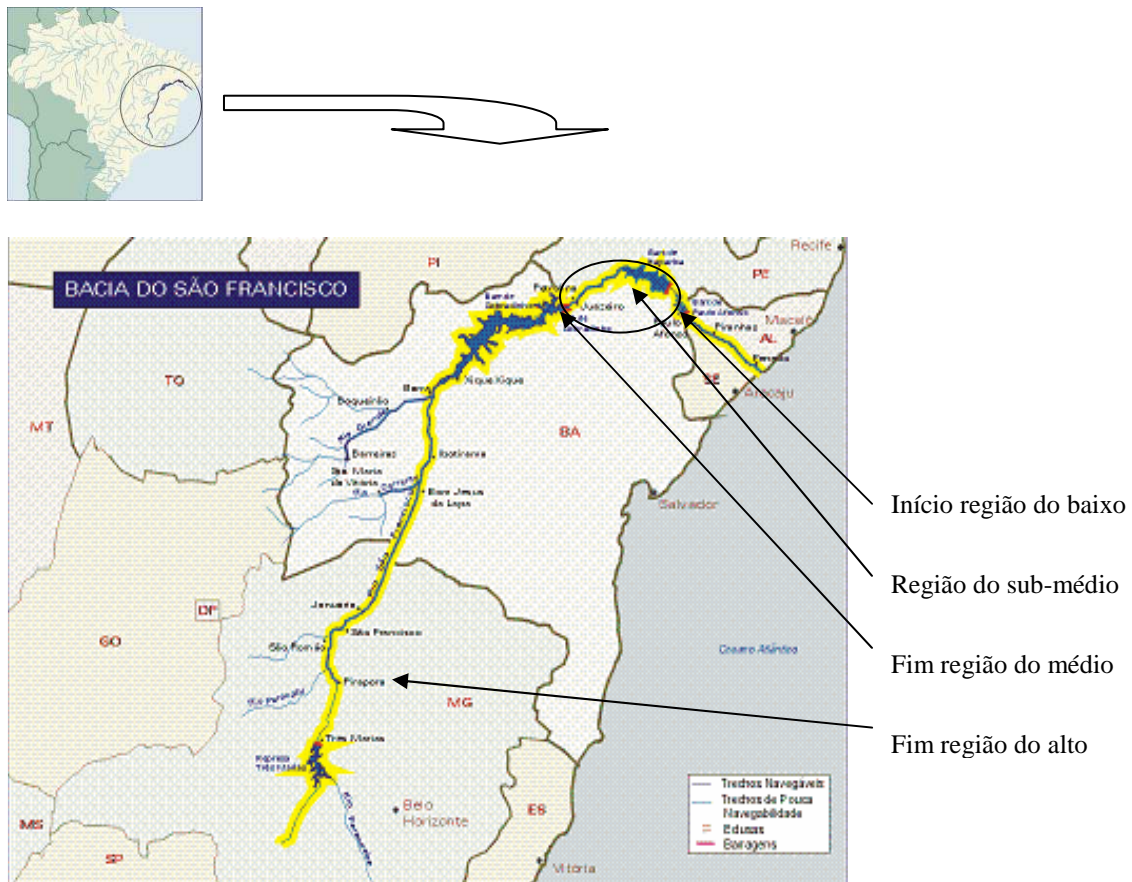


Figura 1: Bacia hidrográfica do rio São Francisco. Fonte: DHI/STA/MT. www.transportes.gov.br/bit/hidro/griosaof.htm, Atualizado em 21/06/2002, acesso 07/08/2008.

Quarenta e oito animais (48,4%) foram capturados no lago de Sobradinho, região do médio São Francisco, entre os anos de 2003 e 2004; 16 exemplares (16,1%), no lago de Moxotó situado no submédio São Francisco, por ocasião do fechamento das comportas após a construção de uma nova usina, no ano de 1989; 3 outros (3,2%) foram capturados no baixo São Francisco durante as operações de

resgate da ictiofauna após o vertimento, entre os anos de 2004 e 2006; e 32 indivíduos (32,3%), foram adquiridos da estação de piscicultura pertencente à estatal Bahia Pesca S.A., de um plantel originado do próprio rio São Francisco, no início do ano de 2003.

Amostras de tecido da nadadeira caudal de 80 indivíduos do plantel de fundadores foram coletadas e armazenadas em etanol a 95%. Todos os animais foram marcados com plaquetas metálicas presas ao primeiro raio da nadadeira dorsal por um arame de aço inoxidável no momento da coleta para identificação.

2.2. Extração do DNA

O DNA foi extraído seguindo o protocolo padrão de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (FCI), com algumas modificações (Sambrook et al., 1989). Para cada amostra foram usados 700µL de tampão de extração (Tris-HCl 100mM pH 7.5, 1% SDS) e 30µL de proteinase K (10ng/mL). A mistura foi incubada a 50°C por 2 horas e depois a 37°C por 12 horas. Em seguida, o DNA foi purificado sucessivamente com FCI (25:24:1), clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugado a cada etapa a 10.000 g por 15 minutos. O DNA total foi precipitado com etanol absoluto gelado, seguido de centrifugação a 10.000 g por 15 minutos. Para a remoção final do excesso de sal e etanol, o precipitado foi lavado com etanol a 70% e brevemente centrifugado (10.000 g por 5 min). O DNA foi ressuspendido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8.0) e armazenado em freezer a -20°C.

2.3. Amplificação dos loci de microsatélite por PCR

Foram usados os únicos cinco pares de primers disponíveis na literatura para esta espécie (Revaldaves et al., 2005). As reações de PCR foram conduzidas

utilizando-se as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 min; 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 56°C (primers Pcor1, Pcor5 e Pcor21) e 58°C (primers Pcor2 e Pcor10) por 30s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Cada reação continha 1U de *Taq* polimerase (Invitrogen platinum), 200µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCL (pH 8.3), 50 mM de KCl, 1,5mM de MgCl₂, 1µM de cada primer e 20ng de DNA para um volume final de 10 µL.

2.4. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida vertical a 6%. A eletroforese durou em média 2 horas a 1500 V, 60mA e 55W. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 10pb (Invitrogen) para estimar o tamanho dos alelos. Ao término da corrida, o gel de poliacrilamida foi fixado com ácido acético a 10%, seguido de coloração com nitrato de prata a 0,01% e revelado com carbonato de sódio a 3%. O registro da imagem foi feito em um scanner. As imagens foram processadas usando o Molecular Imaging Software Version 4.0 (©1994-2005 EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, New York, USA) para avaliação do tamanho aproximado dos alelos.

2.5. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa computacional GENEPOP 1.2 (Raymond & Rousset, 1995), onde parâmetros tais como número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), desequilíbrio de ligação e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foram calculados. O método da cadeia de Markov foi empregado para estimar a probabilidade de desvios significantes de HWE com os

seguintes parâmetros: “dememorization” = 1000, “batches” = 100, e “iterations” = 1000. Os níveis críticos de significância encontrados para o teste foram corrigidos pelo método de Bonferroni, ao nível de significância $\alpha = 0,05$, para $P_1 \leq \alpha/k$, onde k é o número de combinações entre os marcadores (Rice, 1989).

Cada par de locus foi testado para o desequilíbrio de ligação sob a hipótese de nulidade de ausência de associação entre eles. O programa cria uma tabela de contingência para todos os pares de locus e depois aplica um teste de probabilidade (teste de Fisher) para cada tabela usando a cadeia de Markov, com os mesmos parâmetros descritos acima. O F_{IS} de Wright, que mede a redução na proporção média de genótipos heterozigotos, foi estimado pelo seu análogo θ (Weir & Cockerham, 1984).

O número de alelos efetivos (A_e), ou seja, aqueles que efetivamente passarão à geração seguinte, foi obtido pelo programa GenAlEx 6.1 (Peakall & Smouse, 2006). Este mesmo programa permite calcular a relação genética entre pares de indivíduos, através do estimador de relação genética (r_{xy}) de Ritland (1996), que mede a proporção de alelos idênticos por descendência entre dois indivíduos. O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado de acordo com Botstein et al. (1980).

3. Resultados

A variabilidade genética do plantel de surubins para os cinco loci de microssatélites está descrita na Tabela 1. O número de alelos combinados variou de 6 a 18 e o número de alelos efetivos (A_e), de 3,28 a 9,25. O locus que apresentou o maior número de alelos foi o Pcor2, com 18 alelos e o menor número de alelos foi

encontrado no locus Pcor1. O tamanho dos alelos, em pares de base, para os 5 microssatélites estão representados na Tabela 2.

A heterozigosidade observada variou de 0,55 a 0,71 com média de $0,63 \pm 0,06$, enquanto que a heterozigosidade esperada variou de 0,69 a 0,89, com média de $0,84 \pm 0,08$ (Tabela 1).

À exceção do primer Pcor5, os demais apresentaram diferença significativa no teste de Qui-quadrado, para $P < 0,001$, para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 2). Os valores encontrados para o F_{IS} variaram de 0,186 a 0,383 (Tabela 1), com um valor médio de $0,244 \pm 0,077$. O conteúdo de informação polimórfica (PIC), variou de 0,643 a 0,882 (Tabela 2).

As probabilidades encontradas nas análises do desequilíbrio de ligação, quando corrigidas pelo método de Bonferroni, mostraram-se significativas apenas para os loci Pcor21 e Pcor10 ($P < 0,05$).

Um total de 2926 combinações de pares foi gerado a partir do estoque fundador, segundo o estimador de relação genética (r_{xy}) de Ritland (1996). O valor médio do coeficiente r_{xy} foi de -0,008.

Tabela 1. Variabilidade genética do estoque fundador de *Pseudoplatystoma corruscans* da Estação de Piscicultura de Paulo Afonso para os loci analisados.

	Locus				
	Pcor1	Pcor2	Pcor5	Pcor10	Pcor21
Nº de amostras	76	74	77	75	77
A	6	18	16	16	9
A_e	3,277	9,014	7,822	9,252	5,249
H_o^*	0,566	0,5541	0,7143	0,6533	0,6623
H_e^*	0,695	0,8951	0,8779	0,8979	0,8148
F_{IS}^*	+0,186	+0,3826	+0,1873	+0,2737	+0,1881
PIC**	0,6432	0,833	0,861	0,882	0,784
HWE	***	***	NS	***	***

A= número de alelos; A_e = número de alelos efetivos; H_o = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada; PIC= conteúdo de informação polimórfica. Fontes: GenAlEx 6.1; *Genepop; ** Calculado de acordo com Botstein et al. (1980). HWE= Equilíbrio de Hardy-Weinberg, ns= não significante; *** $P < 0,001$.

Tabela 2. Faixa de comprimento dos alelos para os loci analisados.

Lócus	Comprimento (pb)	
	Menor	Maior
Pcor1	105	114
Pcor2	192	250
Pcor5	142	165
Pcor10	156	224
Pcor21	120	150

4 Discussão

No presente trabalho, o número médio de alelos encontrados para os cinco loci de microssatélite em 80 indivíduos foi de $13 \pm 4,65$. Revaldaves et al. (2005) avaliaram 43 indivíduos de *P. corruscans* capturados na bacia do Rio Paraná e obtiveram uma média de $11,8 \pm 5,85$ para o mesmo conjunto de marcadores. Porta et al. (2006) encontraram uma média de 15,13 para o número de alelos de um plantel da solha, *Solea senegalensis*, também capturados em ambiente selvagem, utilizando oito marcadores de microssatélite. Barroso et al. (2005) analisando sete populações naturais e uma de cativeiro de *Brycon opalinus*, encontrou uma variação de 8,28 a 15,14 na média de alelos, para os cinco loci. Estas médias são elevadas quando comparadas com os resultados obtidos por Ohashi et al. (2006), para o plantel fundador do bagre de água doce, *Pangasianodon gigas*, cuja média dos alelos foi de 2,8, para sete marcadores de microssatélite.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC), que indica o potencial informativo do marcador, apresentou valores altos, variando de 0,643 a 0,882, média de $0,801 \pm 0,085$. Segundo a classificação de Botstein et al. (1980), marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, valores entre 0,25 e 0,50 mediamente informativos e valores inferiores a 0,25, pouco informativos.

As heterozigosidades médias observada e esperada descrita por Revaldaves et al. (2005) foram de $0,563 \pm 0,0518$ e $0,8138 \pm 0,0799$, respectivamente, valores próximos aos aqui relatados. Nos dois estudos, todas as heterozigosidades observadas, por locus, foram menores que as esperadas. Esta deficiência de heterozigotos se refletiu em um afastamento das proporções de equilíbrio de Hardy-Weinberg. O teste de Qui-Quadrado para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg revelou que apenas o locus Pcor5 não apresentou diferença significativa ($P > 0,001$).

Revaldaves et al. (2005) quando isolaram e caracterizaram estes marcadores, obtiveram estes mesmos resultados para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg, atribuindo o desvio à presença de alelos nulos, amostragens não-aleatórias e endogamia. Por outro lado, a incapacidade de separar alelos com tamanho muito próximo, dificultada pela ocorrência de bandas duplicadas (stutter bands) na eletroforese de microsatélites dinucleotídicas, também costumam contribuir para a redução dos valores da heterozogidade segundo Hassanien & Gilbey, (2005).

Os valores encontrados para o F_{IS} variaram de 0,186 a 0,383 com média de $0,244 \pm 0,077$, refletindo o déficit de heterozigotos, confirmando o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Uma das prováveis causas deste déficit de heterozigotos seria o Efeito de Wahlund, que sempre ocorre quando duas, ou mais populações, são reunidas (Hartl & Clark, 1997; Hallerman, 2003). Segundo esta ótica, gametas de surubim contendo alelos da população do Médio São Francisco não teriam a chance de encontrar gametas da população do Baixo São Francisco e vice-versa, impedindo a formação de indivíduos portadores de ambos os alelos e, portanto, gerando valores de H_o significativamente inferiores a H_e .

As probabilidades encontradas nas análises do desequilíbrio de ligação, quando corrigidas pelo método de Bonferroni mostraram-se significativas para os loci

Pcor21 e Pcor10 ($P < 0,05$), indicando que estes marcadores se encontram em um mesmo grupo de ligação. Este resultado contradiz Revaldaves et. al. (2005), que afirma não ter encontrado diferenças para o mesmo nível de significância ($\alpha = 0,05$) em uma população de 43 indivíduos na bacia do Rio Paraná.

Nos laboratórios de propagação recomenda-se que exemplares selvagens sejam sempre usados como reprodutores, o que nem sempre é possível devido a aspectos econômicos e pela dificuldade de encontrar exemplares adultos. Por esta razão, parte da produção é usada para repor o plantel, com a vantagem destes peixes já se mostrarem domesticados (Porta et al., 2006). Entretanto, esta prática pode acarretar na perda da variabilidade genética do plantel, comprometendo o programa de recomposição da população. Nestes casos, a retenção máxima da variabilidade genética de populações cativas pode ser atingida monitorando a estrutura genética dos descendentes e seu grau de parentesco (Norris et al., 2000; Porta et al., 2006).

Há pelo menos três estimadores para grau de parentesco baseados em marcadores co-dominantes (SRIPHAIROJ et al., 2007): Ritland (1996), Lynch & Ritland (1999) e Queller & Goodnight (1989).

Sripairoj et al. (2007), buscando identificar o estimador que melhor se adequasse à seleção de casais de reprodutores, para um programa de manejo do bagre, *Pangasianodon gigas*, na Tailândia, utilizou os três estimadores anteriormente citados em cinco famílias de irmãos completos, meio-irmão e não relacionados. O teste-t foi então aplicado aos resultados e apenas o estimador de Ritland (1996) não apresentou diferença significativa ($P > 0,01$). Devido a esta pesquisa, este foi o estimador escolhido para este trabalho.

Nesta pesquisa, Sripairoj et al. (2007) também executou seis esquemas de acasalamento de seus reprodutores, envolvendo a utilização de diferentes coeficientes de parentesco (r_{xy} e mk) e proporções macho/fêmea (de 1:1 e 1:2). Eles concluíram que o melhor cenário é aquele baseado apenas nos menores valores de r_{xy} para seleção e acasalamento dos futuros reprodutores, com cada reprodutor participando uma única vez. Eles estimaram que o valor máximo do r_{xy} adotado para exemplares não relacionados deve ser de 0,07, baseado em testes conduzidos com populações de irmãos completos, meio-irmãos e indivíduos não relacionados.

No presente trabalho, a matriz gerada para os coeficientes de relação (r_{xy}) dos reprodutores da EPPA indica que a maior parte das combinações potenciais de pares de fundadores (64,63%) não apresentou relação de parentesco com coeficientes $r_{xy} \leq 0$. Utilizando-se o critério de Sripairoj et al. (2007) de 0,07, como limite para haver algum parentesco, a porcentagem de combinações sem parentesco sobe para 87,76%, restando 11,42% de pares com $0,07 < r_{xy} \leq 0,25$, caracterizados como meio-irmãos e apenas 0,82% de pares com $r_{xy} \geq 0,25$, classificados como irmãos-completos.

Do total de combinações geradas pelo programa GenAlEx 6.1 para o coeficientes de relação (r_{xy}), 1.865 pares (63,74%) apresentaram valores negativos. Quando tais valores são considerados, o coeficiente r_{xy} médio é negativo (-0,008). Transformando-se estes números em zero, como recomendado por Sebbenn & Seoane (2005), o r_{xy} médio aumenta para 0,024. Ainda assim, a estimativa média de parentesco continua inferior ao valor de 0,07, adotado como limite para definir o parentesco.

De modo geral, a relação de parentesco abrange a identidade por descendência de alelos homólogos entre dois indivíduos ou intimamente ao

indivíduo (Ritland, 1996), ou seja, o parentesco entre o indivíduo 'x' e 'y' é a proporção de alelos em 'y' que são idênticos por descendência aos alelos presentes em 'x' (Sebbenn & Seoane, 2005). Já o coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) é a probabilidade de dois alelos em um indivíduo serem idênticos por descendência (Lynch & Walsh, 1998). Este último também reflete o aumento (ou fixação) da homoziguidade, que é resultante da consangüinidade.

O valor médio da relação de parentesco encontrado contrastou com o coeficiente de consangüinidade, contudo enquanto o primeiro prioriza a diversidade alélica, o segundo enfoca a redução de heterozigotos. Como mencionado anteriormente, esta redução possivelmente resulta da estratégia usada na composição do estoque fundador, quando indivíduos de diferentes procedências foram misturados. A heteroziguidade é uma medida de variabilidade menos sensível do que o número e a distribuição de alelos e deve ser usada com cautela. Beardmore et al. (1997), exemplificam que é possível obter altos valores de heteroziguidade com apenas dois alelos.

A utilização deste plantel como estoque fundador para a recuperação da ictiofauna do sub-médio São Francisco, apresenta um caráter de estocagem, já que a população não é capaz de se reproduzir naturalmente neste ambiente (White et al., 1995; Agostinho et al., 2007). A dificuldade de obter exemplares neste trecho do rio justifica a formação de um plantel de fundadores de um programa de repovoamento com peixes de outros trechos, especialmente do médio São Francisco.

O presente trabalho mostrou que o plantel de fundadores apresentou um número médio de alelos elevado, comparável ao de outra população selvagem de surubim na Bacia do Rio Paraná. Da mesma forma, a relação de parentesco

calculada mostrou um valor médio muito baixo, de onde se conclui que este plantel poderá ser usado no programa de repovoamento do submédio São Francisco.

Agradecimentos

Agradecemos a Companhia Hidro Elétrica do São Francisco – CHESF, pelo incentivo ao projeto, expressa pelo apoio financeiro, humano e material.

Referências

- Agostinho A. A.; Gomes L. C. & Pelicice F. M. (2007) Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá: *EDUEM*, Cap. 6, pp. 227-381.
- Aguirre A. (1954) A pesca e a caça no alto São Francisco. Rio de Janeiro: *Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca*, pp 28.
- Avise J.C. (1994) Molecular Markers, Natural History and Evolution. *Chapman & Hall*, New York., pp. 551.
- Ballou J. & Lacy R. C. (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in captive populations. In: Ballou J. D., Gilpin M., Foote T. (ed.) *Populations Management for Survival and Recovery*. New York: NY: Columbia Univ. Press, pp 76-111.
- Balloux F. & Lugon-Moulin N. (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*. v 11, pp. 155-165.
- Barroso R. M., Hilsdorf A. W. S., Moreira H. L. M., Cabello P. H. & Traub-Cseko Y. M. (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture* 247, p. 51–65.
- Beardmore J. A., Mair G. C. & Lewis R. I. (1997) Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. *Aquaculture Research* 28, pp.829-839.
- Beaumont A. R. & Hoare K. (2003) Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. ed. *Blackwell Science*. 158p.
- Boudry B. C., Cornette F., Hervouet V. & Bonhomme F. (2002) High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. *Aquaculture* v 204, pp. 283–296.

- Botstein D., White R. P., Skolnick M. & Davis R. W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Anim Genet* 32, pp. 314–331.
- FAO. (1993) Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. **FAO Fish**. Rep, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. vol. 491.
- Godinho H. P., Miranda M.T., Godinho A.L. & Santos J.E. (1997) Pesca e biologia do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* no rio São Francisco. In: Miranda M. O. T. de (Org.). *Surubim. Série Estudos Pesca* 19. Belo Horizonte: IBAMA, pp. 27-42.
- Hallerman E. M., (ed.). (2003) Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. *American Fisheries Society*, Bethesda, Maryland.
- Hartl D. L. & Clark A. G. (1997) Principles of population genetics. *Sinauer Associates. Massachusetts*. 3rd. ed.
- Hassanien H. A. & Gilbey J. (2005) Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. *Aquaculture Research* 36. pp.1450-1457.
- Lynch M. & Ritland K. (1999) Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics* 152. pp. 1753-1766.
- Lynch M. & Walsh B. (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. *Sinauer Associates. Sunderland*. 1rd. ed.
- Marques E. E. (1993) Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto Rio Paraná. Curitiba: *Universidade Federal do Paraná. Dissertação* (Mestrado em Ciências Biológicas), pp.104.
- Menezes R. S. (1956) Pesca e piscicultura no vale do São Francisco. *Bol. Secret. Agri. Ind. Com. Estado de Pernambuco*, v. 23, n. 3/4, pp. 43-105.
- Miller L. M. & Kapuscinski A. R. (2003) Genetic guidelines for hatchery supplementation programs. In: E. M. Hallerman (ed.) Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries and Scientists. *American Fisheries Society*, Maryland.
- MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2008. BRASIL. <http://www.integracao.gov.br/saofrancisco/rio/numeros.asp>, acesso em 22/09/2008, às 21:00.
- Norris A. T., Bradley D. G. & Cunnigham E. P. (2000) Parentage and relatedness determination in farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. *Aquaculture* 182, pp. 73-83.

- O'Connell M. & Wright J. M. (1997) Microsatellites DNA in fish. *Rev. Fish Biol.*, v. 7, p.331-363.
- Ohashi Y., Nakajima M., Sukumasavin N., Na-Nakorn U. & Taniguchi N. (2006) Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in endangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas*. *Fisheries Science* 72, pp. 1066-1071.
- Peakall R. & Smouse P. E. (2006) GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel Population genetics software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, pp. 288-295.
- Perez-Enriquez R. & Taniguchi N. (1999) Use of microsatellites DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream, *Fish. Sci.* v 65, pp. 374–379.
- Perez-Enriquez R., Takemura M., Tabata K. & Taniguchi N. (2001) Genetic diversity of red sea bream *Pagrus major* in Western Japan in relation to stock enhancement, *Fish. Sci.*, v . 67, pp. 374–379.
- Porta J., Porta J. M., Martinez-Rodriguez G. & Alvarez M. C. (2006) Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251, pp. 46-55.
- Queller D. C. & Goodnight K. F. (1989) Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, pp. 258–275.
- Raymond M. & Rousset F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, 86, V. 3, pp. 248-249.
- Revaldaves E., Pereira L.H.G., Foresti F. & Oliveira C. (2005) Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Notes*.
- Rice W. R. (1989) Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43: pp. 223-225.
- Ritland K. (1996) Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet. Res.* 67, pp. 175-185.
- Sambrook J., Fritsch E. F. E. & Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York.
- Sebbenn A. M. & Seoane C. E. S. (2005) Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. *Revista Árvore*, jan/fev, v.29. n. 001. pp.1-7.
- Sekino M.; Sugaya T.; Hara M. & Taniguchi N. (2004) Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*. v. 233, pp.163-172.

Sripairoj K., Kamonrat W. & Na-Nakorn U. (2007) Genetic aspect in broodstock management of the critically endanger Mekong giant catfish, *Panagasianodon gigas* in Thailand. *Aquaculture* 264. pp.36-46.

Suassuna J. (2001) Recalque e Transposição de Águas: equívocos nos conceitos. FUNDAÇÃO JOAQUIM NABUCO. Recife, Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/docs/tropico/desat/recalque.html>, acesso em 07 jul.2008.

Weir B. S. & Cockerham C. C. (1984) Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution*, v. 38. n.6. pp.1358-1370.

White R. J., Karr J. R. & Nehlsen W. (1995) Better roles for fish stocking and aquatic resource management. In: SCHRAMM, Jr., H. L.; PIPER, R. G. (Ed.). Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems. American Fisheries Society Symposium, 15. Bethesda, Maryland. *American Fisheries Society*. pp. 527-547.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os cinco marcadores de microssatélite usados mostraram uma ampla diversidade de alelos no plantel de fundadores da EPPA.

Os valores de F_{IS} foram altos para este estoque fundador, capturados em ambiente selvagem, onde supostamente os acasalamentos são aleatórios. Tal fato sugere que a mistura de indivíduos, oriundos do médio e baixo São Francisco, esteja sob influência do efeito de Wahlund.

Os valores de r_{xy} mostraram que a diversidade alélica encontrada no estoque fundador garante uma alta probabilidade de seleção ao acaso de dois indivíduos sem grau de parentesco. É possível concluir que o estoque fundador manteve uma diversidade alélica comparável àquela encontrada em estoques selvagens e poderá ser usado em um programa de repovoamento.

O programa de manejo de espécies sobre ameaça de extinção torna-se mais eficiente quando balizadas pela genética molecular, desde a fase de formação do estoque reprodutor, até o registro da eficácia do programa, ou seja, sobrevivência dos alevinos liberados. O uso de marcadores moleculares (microssatélite) na recuperação de estoques representa uma ruptura do modelo tradicional, que priorizava a quantidade produzida, negligenciando as características genéticas da espécie.

REFERÊNCIAS

AGUIRRE, A. A pesca e a caça no alto São Francisco. **Ministério da Agricultura, Divisão de Caça e Pesca**, Rio de Janeiro. p. 28. 1954.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. **Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: EDUEM, Cap. 6, p. 227-381. 2007

AVISE J.C. Molecular Markers, Natural History and Evolution. **Chapman & Hall**, New York., p. 551. 1994.

ALARCÓN, J. A.; MAGOULAS, T.; GEORGAKOPOULOS, T.; ZOUROS, Z.; ALVAREZ, M. C. Genetic comparison of wild and cultivated European populations of th gilthead sea bream (*Sparus aurata*). **Aquaculture** 230, p 65-80. 2004.

BALLOU, J.; LACY, R. C. Identifying genetically important individuals for management of genetic diversity in captive populations.. In.: **Populations Management for Survival and Recovery**. Ballou, J. D., M. Gilpin, T. Foose eds. New York, NY: Columbia Univ. Press. p.76-111. 1995.

BALLOUX, F., LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**. v 11, p. 155-165. 2002.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiaae) using microsatellites. **Aquaculture** 247, p. 51–65. 2005.

BEARDMORE, J. A., MAIR, G. C., LEWIS, R. I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. **Aquaculture Research** 28. p.829-839. 1997.

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

BOUDRY, B. COLLET, F. CORNETTE, V. HERVOUET AND F. BONHOMME. High variance in reproductive success of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*, Thunberg) revealed by microsatellite-based parentage analysis of multifactorial crosses. **Aquaculture**. v 204, p.283–296. 2002.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. P., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **Am J Anim Genet** 32. p.314–331, 1980.

BRITSKI, H. A., SATO, Y., ROSA, A. B. S. Manual de Identificação de Peixes da Região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3. ed. **Brasília**: CODEVASF, 115p. il. 1988.

BUITRAGO-SUÁREZ, U. A., BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**. 1512: p.1-38. 2007.

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**. v.220 p.203–218. 2003.

CRAWFORD, A. M.; CUTHBERTSON, R. P. Mutation in sheep microsatellites. **Genome Res**. 6, p. 876-879. 1996.

COWX, I. G. stocking strategies. *Fisheries Management and Ecology*. **Oxford**, v. 1, no 1, p.15-20, Apr. 1994.

CURRAN, J.L. Human Linkage Mapping. In: *Genome Mapping: a Practical Approach*. 1st IRL Press, **Oxford**, p. 371. 1997.

DIAS, A. L., Análises Citogenéticas de Peixes da Família Pimelodidae (Pisces, Pimelodidae). 1987. 106f Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais)- Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, São Carlos.

DIERKES P; TABORSKY, M.; ACHMANN, R. Multiple paternity in the cooperatively breeding fish *Neolamprologus pulcher*. **Behav Ecol Sociobiol**. DOI 10.1007/s00265-008-0587-3, 2008

ESTOUP, A.; CORNUET, J. Microsatellite evolution: inferences from population data. In: Goldstein, D. B.; Schlotterer, C. (Ed.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford Univ. Press, New York, p. 49-65. 1999.

FAO. Report of the expert consultation on utilization and conservation of aquatic genetic resources. **FAO Fish**. Rep, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome. vol. 491. 1993.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. **EMBRAPA-CENARGEN - Documento 20**. 3ª ed. Brasília. p. 220. 1998.

GODINHO, H. P., MIRANDA, M.T., GODINHO, A.L., SANTOS, J.E. Pesca e biologia do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* no rio São Francisco. In: Miranda, M. O. T. de (Org.). **Surubim. Série Estudos Pesca 19**. IBAMA. Belo Horizonte, p.27-42. 1997.

HALLERMAN, E. M., editor. Population genetics: principles and applications for fisheries scientists. **American Fisheries Society**, Bethesda, Maryland. 2003.

HARTL, D. L., CLARK, A., G. Principles of population genetics. **Sinauer Associates**. Massachusetts. 3rd. ed. 1997.

HASSANIEN, H. A., GILBEY, J. Genetic diversity and differentiation of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) revealed by DNA microsatellites. **Aquaculture Research 36**. p.1450-1457. 2005.

KINCAID, H. L. Inbreeding in fish populations used for aquaculture. **Aquaculture**. v. 33, p.215-227. 1983.

KOCHER, T. D.; LEE, W.; 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.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G. A. High frequency of short frameshifts in poly-CA/GT tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. **Nucleic Acids Res.** 15, p 5323-5338. 1987.

LIU, B. H. Statistical genomics linkage, mapping and QTL analysis. **Boca Raton CRC Press**. Boca Raton. p. 156. 1998.

LIU, Z. J., CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture** 238. p. 1-37. 2004.

LYNCH, M., RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics** 152. p. 1753-1766. 1999.

LYNCH, M., WALSH, B. Genetics and analysis of quantitative traits. **Sinauer Associates**. Sunderland. 1rd. ed. 1998.

MARQUES, E. E. **Biologia reprodutiva, alimentação natural e dinâmica da nutrição do pintado *Pseudoplatystoma coruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) no alto Rio Paraná.** 1993. 104f Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

MENEZES, R. S. Pesca e piscicultura no vale do São Francisco. **Bol. Secret. Agri. Ind. Com. Estado de Pernambuco**, v. 23, n. 3/4, p.43-105. 1956.

MILLER, L.M., KAPUSCINSKI, A.R. Genetic guidelines for hatchery supplementation programs in E.M. Hallerman editor. Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries and Scientists. **American Fisheries Society**, Maryland. 2003.

MINISTÉRIO DA INTEGRAÇÃO NACIONAL, 2008. BRASIL. <http://www.integracao.gov.br/saofrancisco/rio/numeros.asp>, acesso em 22/09/2008, às 21:00.

NORRIS, A. T., BRADLEY, D. G., CUNNINGHAM, E. P. Parentage and relatedness determination in farmed and wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers. **Aquaculture** 182, 73-83. 2000.

OHASHI, Y., NAKAJIMA, M., SUKUMASAVIN, N., NA-NAKORN, U., TANIGUCHI, N. Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in endangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas*. **Fisheries Science** 72, pp. 1066-1071. 2006.

PEAKALL, R., SMOUSE, P. E. GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel Population genetics software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes** 6, pp. 288-295. 2006.

O'CONNEL, M., WRIGHT, J. M. Microsatellites DNA in fish. Rev. **Fish Biol.** Fish., v. 7, p.331-363. 1997.

PEREZ-ENRIQUEZ, R., TANIGUCHI, N. Use of microsatellites DNA as genetic tags for the assessment of a stock enhancement program of red sea bream, *Fish. Sci.* v 65, p.374–379. 1999.

PEREZ-ENRIQUEZ, R., TAKEMURA, M., TABATA, K., TANIGUCHI, N. Genetic diversity of red sea bream *Pagrus major* in Western Japan in relation to stock enhancement, *Fish. Sci.*, v. 67 p. 374–379. 2001.

PETREIRE Jr., M. A pesca de água doce no Brasil. *Ciência Hoje*, v. 19, n. 110, p.28-33, 1995.

PORTA, J., PORTA, J. M., MARTINEZ-RODRIGUEZ, G., ALVAREZ, M. C. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture* 251. p. 46-55. 2006.

QUELLER, D.C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, 43, p. 258–275. 1989.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity* 86, V. 3, p. 248-249, 1995.

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* 5, p.463-465. 2005.

RICE, W. R. Analyzing Tabbles of Statistical Tests. *Evolution* 43. p.223-225, 1989.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet. Res.* 67, p.175-185. 1996.

ROMANA-EGUIA, M. R. R.; IKEDA, M.; BASIAO, Z. U.; TANIGUCHI, N. Genetic changes during mass selection for growth in Nile tiapia, *Oreochromis niloticus* (L.) assessed by microsatellites. *Aquaculture Research* 36, p.69-78. 2005.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. E., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. **Cold Spring Harbor Lab. Press**, New York, 1989.

SANTOS, E., Peixes da Água Doce (Vida e costumes dos peixes do Brasil). **Coleção Zoologia Brasileira**, Belo Horizonte: Ed. Itatiaia, v. 2. p. 267. il. 1981.

SEBBENN, A. M., SEOANE, C. E. S. Estimativa de tamanho efetivo de endogamia por marcadores genéticos. **Revista Árvore**, jan/fev, v. 29. n. 001. p.1-7. 2005.

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**. v. 233, p.163-172. 2004.

SRIPHAIROJ, K., KAMONRAT, W., NA-NAKORN, U. Genetic aspect in broodstock management of the critically endanger Mekong giant catfish, *Panagasianodon gigas* in Thailand. **Aquaculture** 264. p.36-46. 2007.

SUASSUNA, J. **Recalque e Transposição de Águas: equívocos nos conceitos**. FUNDAÇÃO JOAQUIM NABUCO. Recife, 2001. Disponível em: <http://www.fundaj.gov.br/docs/tropico/desat/recalque.html>, acesso em 07 jul.2008.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Res.** 17, p. 6463-6471. 1989.

TAVARES, M. P., O Surubim. In: MIRANDA, M. O. T. (Org.) Surubim. Belo Horizonte: **IBAMA**, (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca,19). p.9-25. 1997.

TAVE, D. Genetics for fish hatchery managers. 2nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 415. 1993.

WAS, A.; WENNE, R. Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic at microsatellite loci. **Aquaculture** 204. p 493-506. 2002.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Hum. Mol. Genet.** 2. p 1123-1128. 1993.

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. **Evolution**, v. 38. n.6. p.1358-1370. 1984.

WELCOMME, R. L. River Fisheries. **FAO Fisheries Technical Paper**, 262. FAO, Roma,. p. 330. 1985.

WELCOMME, R. L. International introductions of inland aquatic species. **FAO Fisheries Technical Paper**, 294. FAO, Rome, no., 318 p. 1988.

WESMAJERVI, M. S., WESTGAARD, J. I., DELGHANDI, M. Evaluation of a novel pentaplex microsatellite marker system for paternity studies in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture Research* 37. p.1195-1201. 2006.

WHITE, R. J.; KARR, J. R.; NEHLSSEN, W. Better roles for fish stocking and aquatic resource management. In: SCHRAMM, Jr., H. L.; PIPER, R. G. (Ed.). *Uses and effects of cultured fishes in aquatic ecosystems*. American Fisheries Society Symposium, 15. Bethesda, Maryland. **American Fisheries Society**. p.527-547. 1995.

WRIGHT, J. M. DNA fingerprints in fishes. In: Hochachka, P. W., Mommsen, T. (Eds.), **Biochemistry and Molecular Biology of fishes**. Elsevier, Amsterdam. p.58-91. 1993.

ZUCCHI, M.I. **Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR**. 2002. Tese de Doutorado, ESALQ/USP, Piracicaba/SP, Brasil.

ANEXO A - Normas para publicação no Fisheries Management and Ecology.

TopAuthor Guidelines

Three copies of each manuscript (in English) should be submitted to:

For all areas except USA:

Prof. I.G. Cowx

University of Hull International Fisheries Institute

Hull, HU6 7RX

UK

Fax: +44 (0) 1482 470129

e-mail: I.G.Cowx@hull.ac.uk

Papers from USA:

Prof. H.L. Schramm

U.S. Geological Survey

Mississippi Cooperative Fish and Wildlife Research Unit

Mail Stop 9691

Mississippi State, MS 39762

USA

e-mail: hschramm@cfr.msstate.edu

Papers are accepted on the understanding that they have not been and will not be published elsewhere. On the decision of the editors, papers will be refereed blind by authorities in the relevant field. The Editors have the final decision on publication.

It is a condition of publication that authors grant Blackwell Publishing the exclusive licence to publish all articles including abstracts. Papers will not be passed to the publisher for production unless the exclusive licence to publish has been granted. To assist authors an exclusive licence form is available from the editorial office or by [clicking here](#). Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

To assist publication authors will be requested to submit a copy of their final manuscript on disk.

Preparation of Typescripts

Manuscripts should be typed (with a wide margin), double spaced, on one side of A4 (30 × 21 cm) paper and usually should not exceed 15 pages in length.

The title page should contain:

- the full title of the paper;
- the full names of all the authors;
- the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present address(es) of the author(s) if different from above, should appear as a footnote);
- the name, address, e-mail address and tel./fax numbers of the author to whom all correspondence and proofs should be sent;
- a suggested running title of not more than 50 characters, including spaces;
- six key words to aid indexing.

The first page of text must provide the title of the paper and a short abstract not exceeding 150 words but must not carry the author's name or affiliation. The text should contain an Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion. Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals, but tables, figure legends (including magnifications) and acknowledgements should be submitted on separate sheets. Tables and figures should be referred to consecutively in the text. Authors should retain one copy of text, tables and illustrations as the Editors cannot accept responsibility for damage to or loss of manuscripts.

Latin Names

The full Latin specific name, including the authority, with correct taxonomic disposition, should appear at least once for each species when first mentioned in the text or elsewhere thus: Atlantic salmon, *Salmo salar* L., or roach, *Rutilus rutilus* (L.), i.e. authorities in parentheses, depending on first description. For further information see American Fisheries Society Special Publication No. 20, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada*. For fishes occurring in British waters, give precedence to: Wheeler A. (1992) A list of the common and scientific names of fishes of the British Isles. *Journal of Fish Biology* **41**, Supplement A, 36 pp.

References

The reference list should be in alphabetical order and include the full title thus:

- Chapman D.W. (1971) Production. In: W.E. Richer (ed.) *Methods for the Assessment of Fish Production in Freshwater*. Oxford: Blackwell Scientific Publications, pp. 99-124.
- Wickens J.F. (1972) The food value of brine shrimp *Artemia salina* L., to larvae of the prawn *Palaemon serratus* Pennant. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **10**, 151-170.
- Jones J., Adams D.J. & Smith F.D. (1989) Effect of turbidity on fish populations. *Atlantis Technical Report on Aquatic Pollution* No. 76. 23 pp.

References in the text should use the Harvard System and be in full on first mention, e.g. (Brown, Smith & Williams 1975), subsequently abbreviated to (Brown *et al.* 1975) and should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited but referred to as unpublished in the text. Personal communications should be cited as such in the text, e.g. (P. Black, pers. comm.).

Units and Spelling

Spelling should conform to *The Concise Oxford Dictionary*. Units of measurement, symbols and abbreviations must be given in metric units. Where any doubt arises as to the correct abbreviations, reference should be made to *Quantities, Units and Symbols*, 2nd edn, 1975, published by the Royal Society, London (ISBN: 0 85403 0719).

Illustrations

Illustrations should be labelled with the figure number and author's name in soft pencil on the back and the top edge identified. Photographs should be glossy bromide prints of good contrast and well matched, mounted on card and with a transparent overlay for protection and labelling. Scales may be indicated on the overlay or magnifications included in the figure legends. Photographs should not exceed 200 × 124 mm. Line diagrams can be computer generated but must be produced by laser printer. Alternatively they should be drawn with black ink on tracing paper or white card or supplied as glossy prints. Figures should not contain detail that may be lost when reduced in size for printing.

Colour illustrations

It is the policy of *Fisheries Management and Ecology* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork.

Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a PDF* from the internet. The web address for the form is:

http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_F_CoW.pdf

In the event of that an author is not able to cover the costs of reproducing colour figures in colour in the printed version of the journal, *Fisheries Management and Ecology* offers authors the opportunity to reproduced colour figures in colour for free in the online version of the article (but they will still appear in black and white in the print version). If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher.

If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor at the address below and they will be able to email or FAX a form to you.

Once completed, please return the form to the Production Editor at the address below.

Production Editor
Fisheries Management and Ecology
Journal Content Management
Wiley-Blackwell
Wiley Services Singapore Pte Ltd
600 North Bridge Road
#05-01 Parkview Square
Singapore 188778
email: fme@oxon.blackwellpublishing.com

Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.

*To read PDF files, you must have Acrobat Reader installed on your computer. If you do not have this program, this is available as a free download from the following web address:

<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>

Electronic Artwork

We would like to receive your artwork in electronic form. Please save vector graphics (e.g. line artwork) in Encapsulated Post-script Format (EPS), and bitmap files (e.g. half-tones) in Tagged Image File Format (TIFF). Ideally, vector graphics that have been saved in metafile (.WMF) or pict (.PCT) format should be embedded within the body of the text file. Detailed information is available on the Blackwell Publishing Homepage at: www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp

In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Proofs and Offprints

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file and should be returned to the publishers within 3 days of receipt. Alterations to the text, other than printer's corrections may be charged to the author.

Offprints: Authors will be provided with electronic offprints of their paper. Paper offprints may be ordered at prices quoted on the order form, which accompanies proofs, provided that the form is returned with the proofs. The cost is more if the order form arrives too late for the main print run. Offprints are normally dispatched within 3 weeks of publication of the issue in which the paper appears. Please contact the publishers if offprints do not arrive: however, please note that offprints are sent by surface mail, so overseas orders may take up to 6 weeks to arrive. Electronic offprints are sent to the first author at his or her first email address on the title page of the paper, unless advised otherwise; therefore please ensure that the name, address and email of the receiving author are clearly indicated on the manuscript title page if he or she is not the first author of the paper.

Management and Ecological Notes

These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report on new or modified techniques or methodology, significant new data arising from problems with narrow, well-defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should not be longer than 1500 words, including one table or figure, nor be divided up into conventional sections. When submitting Management and Ecological Notes, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

Author Material Archive Policy

Please note that unless specifically requested, Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material 2 months after publication. If the return of any submitted material is required, the Editorial Office or Production Editor must be informed as soon as possible.

NEW: Online production tracking is now available for your article through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit www.blackwellpublishing.com/bauthor for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.