

RAQUEL VENTURA LIMA

**MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA O PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*,
Steindachner, 1876): UMA ESPÉCIE ENDÊMICA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO NO
RIO SÃO FRANCISCO**

RECIFE,

2016



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA O PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*,
Steindachner, 1876): UMA ESPÉCIE ENDÊMICA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO NO
RIO SÃO FRANCISCO**

Raquel Ventura Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco como exigência para obtenção do título de Mestre.

Prof^a. Dr^a. MARIA RAQUEL MOURA

COIMBRA

Orientador

Recife,

Fevereiro/2016

Ficha Catalográfica

L732m Lima, Raquel Ventura
Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876): uma espécie endêmica ameaçada de extinção / Raquel Ventura Lima. -- Recife, 2016.
55f. : il.

Orientadora : Maria Raquel Moura Coimbra.
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2016.
Referências.

1. *Lophiosilurus alexandri* 2. Diversidade genética
3. Marcadores microssatélites I. Coimbra, Maria Raquel Moura, orientadora II. Título

CDD 639

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**MARCADORES MICROSSATÉLITES PARA O PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri*,
Steindachner, 1876): UMA ESPÉCIE ENDÊMICA AMEAÇADA DE EXTINÇÃO NO
RIO SÃO FRANCISCO**

Raquel Ventura Lima

Dissertação julgada adequada para obtenção do
título de mestre em Recursos Pesqueiros e
Aquicultura. Defendida e aprovada em
26/02/2015 pela seguinte Banca Examinadora.

Prof^a. Dr^a. MARIA RAQUEL MOURA COIMBRA

(Orientadora)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof. Dr. RODRIGO AUGUSTO TORRES

[Departamento de Zoologia]

[Universidade Federal de Pernambuco]

Prof. Dr. EUDES DE SOUZA CORREIA

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha mãe, que mesmo com a distância se fez presente em meus pensamentos e ao meu noivo Leonardo, por todo o carinho, incentivo e compreensão.

Agradecimentos

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura;

A professora Raquel Coimbra por abrir as portas do seu conhecimento e do seu laboratório;

A Rozzanno Figueiredo, por sua atenção e disponibilidade;

A Hozana pela ajuda no início e a Patrícia pela ajuda no término deste trabalho, vocês foram essenciais;

As queridas amigas do Laboratório de Genética Aplicada, Sandra, Larissa Monteiro, Karine, Larissa Malheiros e ao amigo Leo, por toda a ajuda, amizade e pelas risadas (ácidas) que foram fundamentais nesta jornada;

Aos amigos que fiz ao longo desses dois anos, Bárbara, Seu Manoel, Jubileu, Dona Eliane, Zena, Niara, Suzy, Fabi, Aline e tantos outros;

A todos os professores do programa que sempre se mostraram acolhedores para solucionar nossas dúvidas e problemas;

A família e aos amigos, com os quais aprendi que a distância não afasta o carinho que sentimos.

A todos o meu agradecimento sincero.

Resumo

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é uma espécie de bagre endêmico do rio São Francisco pertencente a ordem dos Siluriformes. Trata-se de uma espécie muito apreciada nas regiões do rio São Francisco pela ausência de espinhos intramusculares e qualidade de seu filé, se destacando também pelo grande potencial para a aquicultura. O pacamã figura entre as espécies mais ameaçadas e programas de repovoamento nas diversas regiões desta bacia vêm sendo desenvolvidos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores microsatélites inéditos para o pacamã que possam servir para estudos genéticos sobre essa espécie e suas populações. Amostras de tecido foram coletadas de peixes adultos capturados pela pesca artesanal entre os reservatórios de Sobradinho-BA e Itaparica-PE. Inicialmente, uma biblioteca genômica de DNA foi realizada e um conjunto de microsatélites foi obtido. Após a genotipagem, o número de alelos variou de dois a nove e as heterozigosidades médias foram de 0,659 (H_e) e de 0,603 (H_o), respectivamente. Apenas um marcador apresentou desvio do EHW e presença de alelos nulos. O coeficiente de endocruzamento total (F_{IS}) foi de 0.091, sugerindo a presença de homozigotos, que pode ser em decorrência de características da espécie. O conteúdo de informação polimórfica foi, na maioria dos casos, superior a 0,5, atestando a eficiência desses marcadores para estudos genéticos futuros.

Palavras-chave: *Lophiosilurus alexandri*, diversidade genética, marcadores microsatélites.

Abstract

The pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) is a species of endemic catfish São Francisco river belonging to the order Siluriformes. It is a species very appreciated in the regions of the São Francisco River by the absence of intramuscular bones and quality of their steak, also highlighting the great potential for aquaculture. The pacamã among the most endangered species and restocking programs in the various regions of this basin have been developed. The aim of this study was to develop novel microsatellite markers for pacamã that can be used for genetic studies of this species and their populations. Tissue samples were collected from adult fish caught by artisanal fishing between the reservoirs of Sobradinho and Itaparica-BA-PE. First, a genomic DNA library was performed and a set of microsatellite was obtained. After genotyping, the number of alleles ranged from two to nine, and the average heterozygosity were 0.659 (H_e) and 0.603 (H_o), respectively. Only one marker showed deviation from HWE and presence of null alleles. The overall coefficient of inbreeding (F_{IS}) was 0.091, suggesting the presence of homozygous, which may be due to species characteristics. Polymorphic information content is, in most cases, greater than 0.5, confirming the efficiency of these markers for genetic studies

Key words: *Lophiosilurus alexandri*, genetical diversity, microsatellite markers.

Lista de figuras

	Página
Figura 1-Regiões do Rio São Francisco	15
Figura 2- Mapa de localização das Usinas Hidrelétricas do Rio São Francisco	18

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Barragens localizadas no Rio São Francisco.....	19
Tabela 2- Clones de microssatélites de pacamã com respectivos tamanhos e motivos	42
Tabela 3- Marcadores microssatélites para <i>L. alexandri</i>	43
Tabela 4- Diversidade genética de <i>L. alexandri</i> no Rio São Francisco para sete marcadores microssatélites	45
Tabela 5- Tamanho efetivo da população (N_e).....	46

Sumário

Página

Dedicatória

Agradecimento

Resumo

Abstract

Lista de figuras

Lista de tabelas

1- Introdução.....	12
2- Revisão de literatura.....	14
3- Referência bibliográfica	25
4- Artigo científico	38
4.1- Normas da Revista Neotropical Ichthyology	53

1- Introdução

A Bacia do rio São Francisco ocupa aproximadamente 7% do território nacional, sendo considerada a quarta mais importante entre as bacias do país. Abrange as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, cortando os Estados de Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás e o Distrito Federal (PAIVA, 1982).

Suas águas são utilizadas para diversos fins como agricultura, navegação, irrigação, turismo, aquicultura e outros, sendo a geração de energia a principal atividade econômica realizada nessas águas (ANA/GEF/PNUMA/OEA, 2004). Dentre as principais usinas hidrelétricas construídas ao longo desse rio estão: Três Marias, Sobradinho, Itaparica, Moxotó, o complexo de Paulo Afonso e Xingó (GODINHO e GODINHO, 2003).

A interferência antrópica para a construção dessas usinas tem modificado o fluxo natural destes ambientes, afetando a dinâmica natural e interferindo principalmente na reprodução e perpetuação de várias espécies de peixes. Entre essas espécies encontra-se o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), uma espécie endêmica do rio São Francisco pertencente a ordem Siluriforme da qual fazem parte ainda o *Pseudoplatystoma fasciatum* e o *P. corruscans* que também ocorrem nesse rio (BRITSKI, 1986; REIS et al., 2003).

Pertence à família Pseudopimelodidae, uma família de bagres neotropicais de água doce, que ocorre apenas na América do Sul e é pouco estudada (BARROS et al., 2007). O pacamã é carnívoro e bastante apreciado pela população regional em função do sabor da sua carne, estando entre as espécies de mais alto valor comercial (LUZ e SANTOS, 2008).

Essa espécie assim como várias outras necessitam de maior atenção e habilidade no exercício da administração pesqueira do rio São Francisco, demandando estratégias eficientes no estudo da bioecologia (FRID et al., 2000; RAMOS 2001).

Várias ferramentas têm sido utilizadas para avaliar a diversidade genética, como os marcadores de DNA que revelam polimorfismo em indivíduos de uma mesma espécie, apresentando padrões de herança mendeliana. Tais marcadores podem ser empregados em diversos fins, como filogenia molecular, ecologia, genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética (LOPES et al. 2002). A aplicação de métodos genético-moleculares pode determinar espécies-chave para a conservação, identificar espécies crípticas e avaliar o impacto das mudanças ambientais sobre a variabilidade genética das espécies (RYMAN e UTTER, 1987).

Os marcadores do tipo microssatélites têm sido os mais utilizados para estudos de genética populacional, por possuírem muitas vantagens como a codominância, alto polimorfismo, distribuição aleatória no genoma e fácil identificação (POWELL et al., 1996, COLLEVATTI et al., 1999). Para o uso desse tipo de marcador molecular, faz-se necessário o desenvolvimento de *primers* específicos, que são sequências únicas de DNA que cercam os microssatélites no genoma das espécies. (OLIVEIRA, 2012).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar marcadores microssatélites para *Lophiosilurus alexandri* em uma população do Submédio São Francisco, compreendida entre os reservatórios de Sobradinho (BA) e Itaparica (PE), já que até o presente momento não há registro de marcadores microssatélites específicos para essa espécie.

2- Revisão de literatura

A Bacia do São Francisco

A bacia do rio São Francisco é considerada a terceira maior bacia hidrográfica do Brasil e a única inserida totalmente em território nacional (KOHLENER, 2003; GABRIEL NETO et al., 2007). Ela drena uma área de 640.000 km² e ocupa 8% do território nacional (ANDRADE 2002; GODIM FILHO et al., 2004). Na classificação mundial, o rio São Francisco é considerado o 34º rio de maior vazão e o 31º em extensão (GODINHO e GODINHO, 2003). O rio nasce no Parque Nacional da Serra da Canastra, no sudoeste do Estado de Minas Gerais, drenando áreas dos Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e o Distrito Federal, além de cortar três biomas: Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica (KOHLENER, 2003).

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

Situa-se entre as latitudes 21º e 7º Sul e longitudes 48º e 36º Oeste, sendo dividida em quatro regiões geográficas: Alto, Médio, Submédio e Baixo (Figura 1) (ANA, 2010). No Alto, o trajeto do rio é caracterizado por águas rápidas, frias e oxigenadas; no Médio por ser rio de planalto, apresenta menor velocidade e está sujeito a grandes cheias, já o Submédio está praticamente barrado e o Baixo, por ser trecho de planície, é mais lento e sofre influência marinha (SATO e GODINHO, 1999).

O São Francisco apresenta o padrão de rios tropicais, com pulsos de inundação (GOULDING, 1980), sendo perene, apesar de seus afluentes, localizado na região da caatinga, serem intermitentes (ROSA et al., 2003).

Em razão de sua grande extensão, a Bacia apresenta características geográficas e climáticas bastante variáveis, com média de precipitação variando de 350 a 1.500 mm anuais (MEDEIROS, 2015). Seus usos atuais envolvem: geração de energia elétrica, irrigação, abastecimentos urbano e industrial, navegação, pescas profissional e esportiva, esgoto industrial e urbano e extração de pedras preciosas e de areia. A descarga média anual é de $100 \times 10^9 \text{ m}^3$, o que dá a vazão média de $3.150 \text{ m}^3/\text{s}$. Os principais afluentes estão no estado de Minas Gerais e fornecem cerca de 70% da água do rio (SATO e GODINHO, 1999).

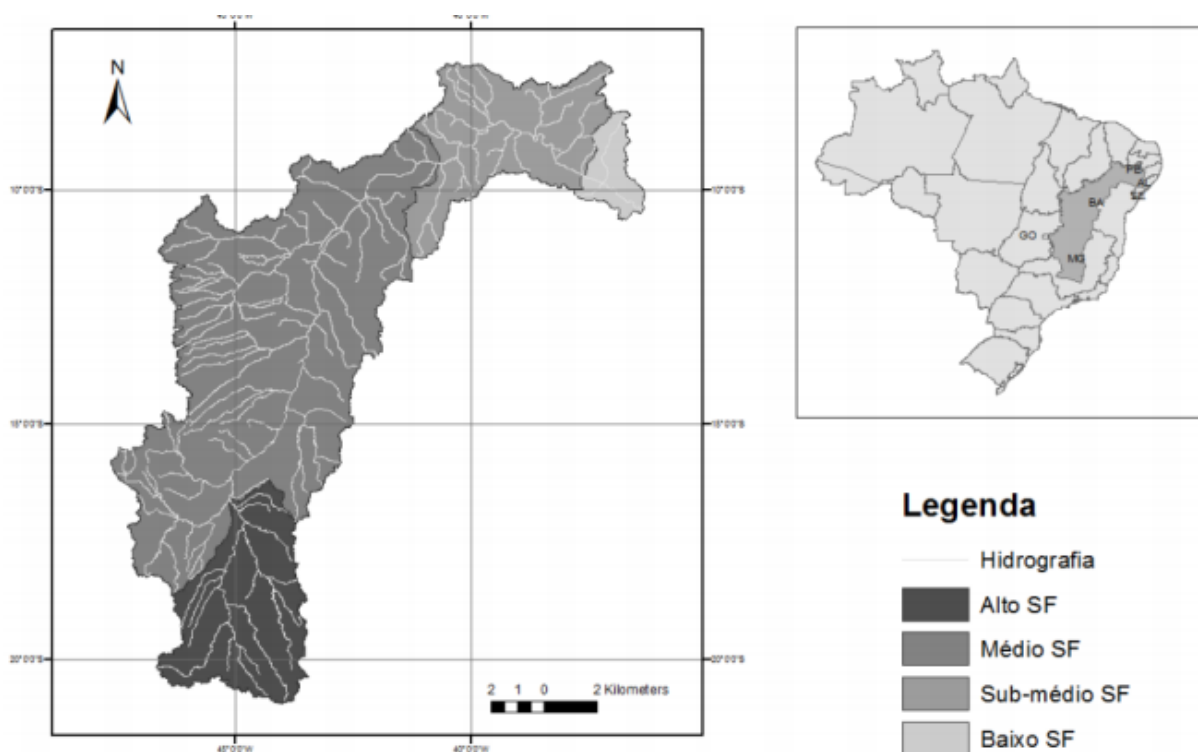


Figura 1: Regiões do Rio São Francisco. Elaborado por Torres et al. (2015).

A ictiofauna presente é composta por aproximadamente 150 espécies de peixes (TRAVASSOS 1960; BRITSKI et al., 1984; MENEZES, 1996; SATO e GODINHO, 1999) e acordo com Bazzoli (2003), o rio São Francisco tem sido um dos maiores responsáveis por fornecer pescado no Brasil, principalmente para as comunidades ribeirinhas.

Os represamentos

Dentre os principais impactos que alteram o ambiente aquático estão os barramentos dos rios para a construção de usinas hidrelétricas. A participação de grandes agências federais e estaduais nessas atividades deu início ao desenvolvimento da rede elétrica do país (ROSA, 2007).

Murta (2009) relata que “à medida que o Brasil foi se desenvolvendo, houve uma necessidade de investimento em geração de energia elétrica para suportar a demanda que as empresas necessitavam. Devido a características geográficas específicas do país, como um grande número de rios, foi priorizada a construção de usinas hidrelétricas.”

Cunha (2012) relata que apesar das vantagens como o aumento da oferta de alimento advindo da irrigação, controle de enchentes, desenvolvimento socioeconômico; os impactos negativos dos empreendimentos hidroelétricos serão sempre sentidos pelas comunidades localizadas nas proximidades de onde são construídas essas barragens

As reais vantagens serão usufruídas nas cidades e regiões desenvolvidas, ficando para o ribeirinho apenas os impactos negativos. Ambientalistas citam ainda como consequências dessas construções a dizimação de espécies, a inundação de pântanos, florestas e terras agrícolas, além de mudanças físicas no ambiente e também o deslocamento compulsório de pessoas.

Segundo Godinho e Godinho (1994), essas construções são as principais causas do declínio da pesca em rios de muitos países no mundo. Além de modificação do ambiente, essas construções, para a geração de energia ou para o armazenamento de água, alteram a hidrobiologia da bacia (Bugenyi, 1991; Diegues, 1994; Agostinho e Zalewski, 1995; Araújo, 1998) e interferem no comportamento das espécies de peixes presentes naquele ambiente, alterando a interferindo na perpetuação e manutenção de espécie.

A construção de um reservatório provoca desequilíbrios na estrutura das comunidades, acarretando o desaparecimento ou proliferação de espécies, com alterações na abundância e composição da ictiofauna daquele local (Welcomme e Halls, 2004).

Fontes e Holanda (2002) relatam também algumas alterações causadas à pesca, ao pescado e aos pescadores, como mudanças no calendário da pesca, na quantidade de pescado, nas técnicas de pesca, na qualidade do pescado, já que os grandes predadores desaparecem e sobram apenas os forrageiros.

Dos quase 3.000.000 ha de reservatórios instalados em território nacional, aproximadamente 23% estão localizados no rio São Francisco e as seis maiores usinas hidrelétricas da bacia também estão presentes nele, sendo elas: Três Marias, Sobradinho, Itaparica, Moxotó, Complexo Paulo Afonso e Xingó (MARTELETO, 2011) (Figura 2).

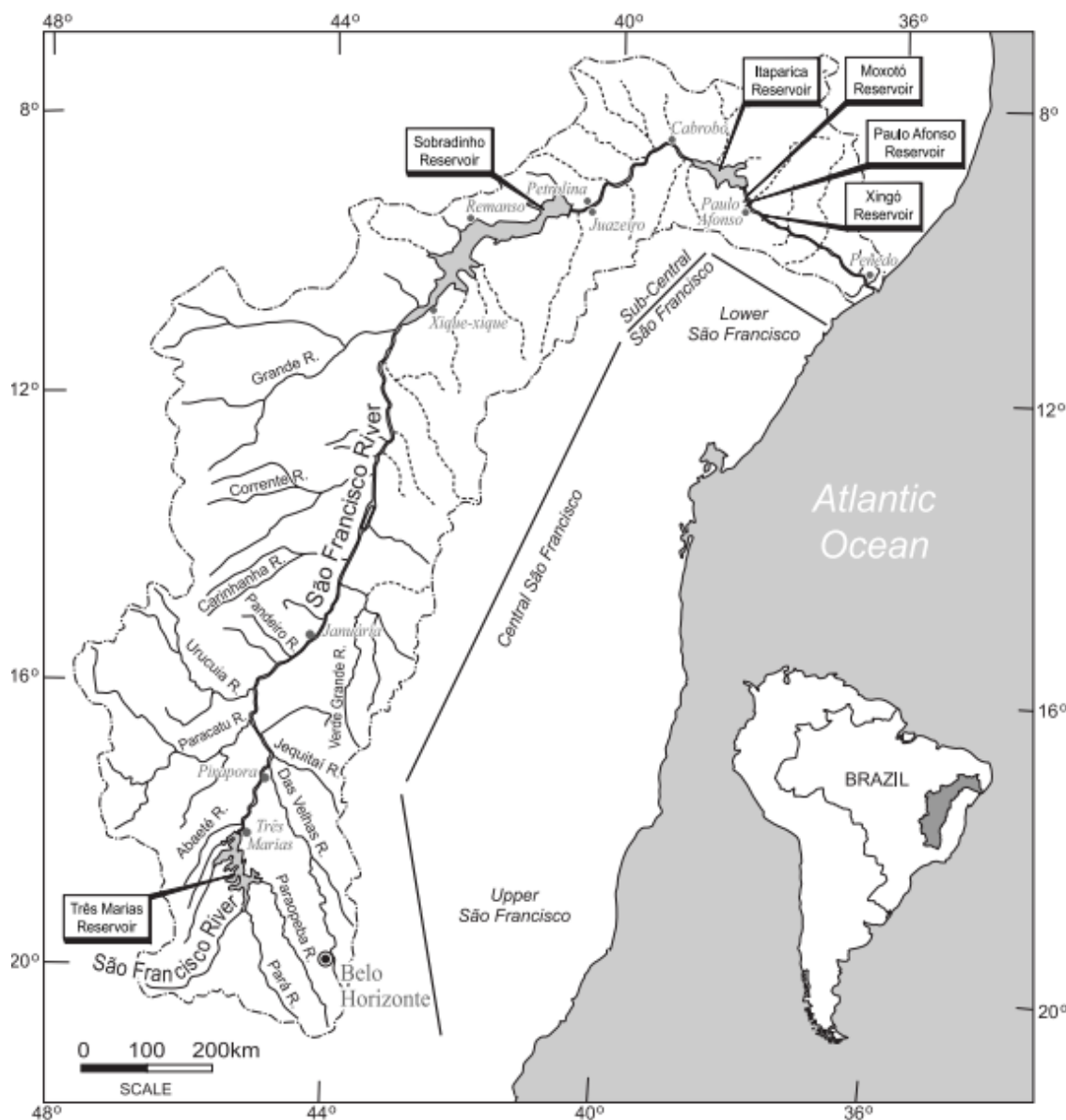


Figura 2: Mapa de localização das Usinas Hidrelétricas do Rio São Francisco.

Modificado de Carolsfield et al. (2003).

De todas essas usinas distribuídas ao longo do rio, apenas a usina de Três Marias está localizada no primeiro terço do rio, enquanto as demais estão localizadas no terço final (MARTELETO, 2011) sendo as regiões do Submédio e Baixo as áreas mais impactadas por essas construções (Tabela 1). Algumas dessas usinas possuem mais de 30 anos e reduzem há décadas as populações de peixes residentes, afetando principalmente os peixes migratórios (MARTELETO, 2011).

Tabela 1. Barragens localizadas no Rio São Francisco.

Complexo	Inauguração	Região
Três Marias	1962	Alto
Sobradinho	1979	Médio
Luiz Gonzaga	1988	Submédio
Moxotó	1977	Submédio
Paulo Afonso I	1954	Submédio
Paulo Afonso II	1961	Submédio
Paulo Afonso III	1971	Submédio
Paulo Afonso IV	1979	Submédio
Xingó	1994	Baixo

Fonte: Martins et al. (2011).

Antigamente, a região do Baixo São Francisco era conhecida pela sua abundância de peixes e crustáceos, sendo considerada a maior produtora do Vale (FONTES e HOLANDA, 2002) Entretanto, atualmente, é juntamente com a região do Submédio as mais atingidas com os barramentos e os prejuízos ambientais.

Muitas populações de peixes que habitam os reservatórios oriundos de represamentos são populações resultantes da reestruturação das comunidades que ocupavam originalmente o rio antes dos barramentos (AGOSTINHO et al., 1999).

Na Bacia do rio São Francisco, parte dos estoques pesqueiros encontram-se sobre-explorados, exigindo uma administração pesqueira adequada, estratégias eficientes no estudo de bioecologia e identificação das espécies existentes em todas as regiões ao longo da bacia, servindo assim de base para ações mitigadoras (FRID et al., 2000; RAMOS 2001).

Pacamã (*Lophiosilurus alexandri*)

A ordem dos Siluriformes se caracteriza por apresentar a pele espessa ou coberta por placas ósseas (total ou parcialmente) (BRITSKI et al., 1988). As nadadeiras são raiadas e bem separadas, sendo o primeiro raio das nadadeiras peitorais e dorsal portador de um acúleo forte e pungente. A nadadeira adiposa encontra-se presente, e é, em geral, bem desenvolvida; já a nadadeira caudal assume formato variável. Há geralmente três pares de barbilhões sensitivos (MEES, 1974).

Os gêneros dessa ordem se subdividem em: *Batrochoglanis*, *Cephalosilurus*, *Lophiosilurus*, *Microglanis* e *Pseudopimelodus* (SHIBATTA, 2003).

A família *Pseudopimelodidae* compreende 26 espécies de peixes, distribuídas na América do Sul, sendo uma grande parte delas consideradas raras, porém Ferraris (2007) classifica 30 espécies pertencentes a essa família.

Uma das principais espécies dessa família é o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), um peixe nativo do rio São Francisco (TENÓRIO et al., 2006) que apresenta comportamento sedentário e predileção por ambientes lânticos e fundos de areia ou com pedras (TRAVASSOS, 1959) além de apresentar um grande potencial para a aquicultura (SATO et al., 2003; SHIBATTA, 2003).

Sua cabeça é achatada com mandíbula ultrapassando a maxila superior e dentes da mandíbula fora da boca quando fechada (BRITSKI et al., 1986). Sua reprodução ocorre através de desova parcelada liberando seus ovos em substrato arenoso (SATO et al., 2003) formando ninhos, sendo assim classificado como psamófila (RIZZO; GODINHO, 2003).

Seus ninhos feitos em bancos de areia na parte rasa do rio apresentam de 40 a 50 cm de tamanho e uma profundidade de 8 a 10 cm (SATO et al., 2003). As fêmeas dessa

espécie apresentam desova parcelada, se reproduzindo durante quase todo o ano, menos nos meses frios e os reprodutores apresentam cuidado parental com ovos e larvas.

Seus ovócitos não hidratados são considerados os maiores em tamanho dentre as espécies estudadas na Bacia do São Francisco, com um diâmetro de $(3056,72 \pm 154,24 \mu\text{m})$ e com larvas recém eclodidas variando de $8405,10 \pm 104,20 \mu\text{m}$ de tamanho contra $2876,01 \pm 81,95 \mu\text{m}$ do surubim, por exemplo (SATO et al., 2003).

Segundo Cardoso et al. (1996) um pacamã em sua fase adulta pode atingir mais de 8kg. Luz et al. (2011) relatam que a espécie não apresenta dimorfismo sexual, o que acaba dificultando realização de trabalhos quanto à sua reprodução.

Essa espécie é bastante apreciada pela população devido à ausência de espinhos intramusculares e sabor agradável (LUZ e SANTOS, 2008), sendo uma espécie de alto valor na região (TENÓRIO, 2003; PEDREIRA et al., 2008).

Melo et al. (2006) relata em trabalho realizado na região do sertão do São Francisco (Juazeiro, BA e Petrolina, PE) que 15% dos consumidores, entre as classes baixa, média ou alta, procuram a carne de pacamã, porém sua presença em feiras livres vem sendo reduzida ao longo dos anos.

Luz e Santos (2008) também relatam a dificuldade de se encontrar o pacamã não só para ser utilizado como peixe ornamental, mas principalmente para o consumo de sua carne, já que existe uma grande carência de criatórios com produção em escala comercial, sendo grande parte do pescado encontrado advindo da pesca extrativa.

Ao longo dos anos a ocorrência do pacamã tem sido reduzida consideravelmente ao longo do rio São Francisco, já tendo sido classificada há alguns anos como uma espécie ameaçada de extinção por alguns autores (MEURER et al., 2010; SATO et al., 2003), presumivelmente ameaçada de extinção (LINS et al., 1997) e atualmente o

Instituto Chico Mendes a classificou como espécie Vulnerável (VU) à extinção de acordo com a Portaria MMA nº 43/2014 (ICMBio, 2014).

Ao mesmo tempo em que a espécie em ambiente selvagem encontra-se prejudicada por diversos fatores, Sato et al. (2003) relatam que a mesma tem despertado crescente interesse devido aos seus resultados favoráveis na aquicultura (SATO et al., 2003) como adaptabilidade a várias densidades (LUZ e SANTOS, 2008) e ao alimento inerte (LUZ et al., 2007), possibilitando seu uso em programas de repovoamento (SATO e SAMPAIO, 2005).

Vários estudos tem sido realizados com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre esta espécie em relação ao seu potencial na aquicultura (CARDOSO et al., 1996; SATO et al., 2003; BARROS et al., 2007; GODINHO, 2007) porém ainda são necessários estudos para dar subsídio à manutenção dos estoques desta espécie em estações de piscicultura com produção de alevinos e juvenis para repor estoques naturais (MEURER et al., 2010).

Marcadores Microssatélites

O uso de marcadores moleculares em estudos genético-populacionais e filogeográficos é importante no auxílio da implementação de programas para a conservação das espécies, uma vez que o objetivo central da genética da conservação é o estudo da variabilidade genética nas populações naturais das espécies sob impacto antropogênico (FRANKHAM et al., 2002).

Os marcadores microssatélites são sequências presentes no DNA que possuem de um a seis nucleotídeos repetidos consecutivamente, raramente excedem 200 pares de base no comprimento total, estão distribuídos ao acaso no genoma, possuem expressão co-dominante, são multialélicos, são encontrados com alta frequência nos genomas de

eucariotos, apresentando o maior conteúdo informativo por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares disponíveis (GOLDSTEIN e SCHLÖTTERER, 1999).

As diferenças nas quantidades de unidades de repetição, resultantes da adição ou redução de uma ou mais unidades, revelam o alto grau de polimorfismo presentes *loci* em todos os organismos eucarióticos (MENOTTI-RAYMOND e O'BRIEN, 1995).

Regiões de microssatélites podem se mostrar altamente variáveis quanto à composição da sequência repetida, sendo classificadas como: perfeitas, imperfeitas, interrompidas ou compostas (WEBER, 1990; OLIVEIRA et al., 2006).

As microssatélites perfeitas são caracterizadas por não apresentarem bases de interrupção (ex: TATATATATATATATA), as regiões imperfeitas são aquelas que possuem um par de bases diferente entre os motivos que se repetem (ex: TATATATACTATATA), as regiões interrompidas possuem uma sequência diferente dentro do motivo que se repete (ex: TATATACGTGTATATATATA), já as microssatélites compostas são as regiões que apresentam duas sequências que se repetem (ex: TATATATATAGTGTGTGTGT) (WEBER, 1990; OLIVEIRA et al., 2006).

Essas regiões são altamente informativas, o que permite aos microssatélites serem utilizados em estudos de conservação, na investigação de processos microevolutivos que ocorrem nas populações (HEYWOOD e IRIONDO, 2003), utilizados para estimar parentescos, hibridização (GUICHOUX et al., 2011), em estudos de acasalamento em espécies de difícil comportamento reprodutivo (COLBOURNE et al., 1996) e podem ainda identificar diferentes espécies, independente do estágio de vida do animal (FERGUNSOM, 1995) sendo de acordo com Goldstein e Schlotterer (1999) e

Schlotterer et al., 2004 o marcador molecular mais usado em estudos de ecologia e genética desde a década de 90.

Kazazian (2004) explica a ocorrência dessas regiões pela dispersão dessas sequências repetitivas pelo genoma por elementos transponíveis, possuindo assim locais com uma possível predisposição à formação dessas microssatélites, estando presente em alta frequência no genoma nuclear da maioria dos organismos existentes (AVISE, 2004)

Segundo Jehle e Arntzen (2002), a rápida taxa mutacional apresentada por esses marcadores microssatélites favorece o seu uso em estudos de avaliação entre subespécies e populações próximas, podendo diferenciar populações, quantificar a extensão e o fluxo gênico, as proximidades genéticas e relação com a população de origem mais provável.

Chistiakov et al. (2006) cita a utilidade desses marcadores para o uso na aquicultura, como sendo ferramentas importantes para caracterizar populações, selecionar gerações, mapear genes com características importantes fisicamente e economicamente e a aplicação dessas regiões do DNA em programas de criação assistidos por marcadores.

Todavia, ainda não há na literatura loci microssatélites para a maioria das espécies que compõem a diversidade da ictiofauna neotropical (SILVA e HILSDORF, 2011) e há um déficit ainda menor de trabalhos sobre espécies pequenas e sedentárias (MOESER e BERMINGHAM, 2005; MOYSES et al., 2005; TELLES et al., 2010).

Porém, ao longo dos anos a tecnologia de sequenciamento de DNA tem avançado suas pesquisas resultando em métodos mais eficientes e produção de marcadores moleculares com um menor custo para espécies ainda não estudadas (CASTOE et al., 2012; LANCE et al., 2013).

3- Referência bibliográfica

AGOSTINHO, A.A.; MIRANDA, L.E.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; THOMAZ, S.M.; SUZUKI, H.I. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognoses on aging. In: TUNDISI, J. G.; STRASKRABA, M. Theoretical reservoir ecology and its applications. São Carlos: Brazilian Academic of Sciences and Backhuy Publishers, 1999. p. 227-265.

AGOSTINHO, A.A.; ZALEWSKI, M. The dependence os fish community structure and dynamics on floodplain and riparian ecotone zone in Parana River, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 303, p. 131-148, 1995.

ANA/GEF/PNUMA/OEA. Projeto de Gerenciamento Integrado das Atividades Desenvolvidas em Terra na Bacia do São Francisco, Sub-projeto 4.5C – Plano Decenal de Recursos Hídricos da Bacia do Rio São Francisco – PBHSF (2004-2013). Navegação. Estudo Técnico de Apoio nº 08. Brasília: SUM/ANA, 2004. 49p.

ANDRADE, R. Da transposição das águas do Rio São Francisco à revitalização da bacia: as várias visões de um rio. **Fundação Joaquim Nabuco**, 2002.

ARAÚJO, F.G. Adaptação do índice de integridade biótica usando a comunidade de peixes para o rio Paraíba do Sul. *Revista Brasileira de Biologia*, v.58, n.4, p.547-558, 1998.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**, second edition. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2004. 541 p.

BARROS, M.D.M.; GUIMARÃES-CRUZ, R.J.; VELOSO-JÚNIOR, V.C.; SANTOS, J.E. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri*

VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*... Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). **Revista Brasileira de Zoologia**, v.24, n.1, p.213-221, 2007.

BAZOLLI, N. Parâmetros reprodutivos de peixes de interesse comercial na região de Pirapora. In: GODINHO, A. L. e GODINHO, H. P. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais, Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 291-306.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y. e 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)**. Brasília: Câmara dos Deputados, CODEVASF, 1984. 143p.

BRITSKI, H.A. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco**. Brasília: Codevasf, 1986.

BRITSKI, H.A., SATO, Y. e 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)**. Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco - CODEVASF, Brasília, 1988.

BUGENYI, F.W.B. Ecotones in a changing environment: management of adjacent wetlands for fisheries production in the tropics. **Mitteilungen Internationale Vereinigung fur Theoretische und Angewandte Limnologia**, Stuttgart, v.24, n.4, p.2547-2551, 1991.

CARDOSO, E.L.; CHIARINI-GARCIA, H.; FERREIRA, R.M.A.; POLI, C.R. Morphological changes in the gills of *Lophiosilurus alexandri* exposed to un-ionized ammonia. **Journal of Fish Biology**, v.49, p.778-787, 1996.

VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri...*

CAROLSFIELD, J., B. HARVEY, C. ROSS e A. BAER. **Migratory fishes of South America: Biology, Fisheries, and Conservation Status**. World Fisheries Trust/Banque mondiale/CRDI, 2003. 380p.

CASTOE, T.A.; POOLE, A.W.; KONING, A.P.J. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. **PLoS ONE**, v.7, p.1-10, 2012.

COLBOURNE, J.K.; NEFF, B.D.; WRIGHT, J.M.; GROSS, M.R. DNA fingerprinting of bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) using (GT)_n microsatellites and its potential for assessment of mating success. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.53, p.342-349, 1996.

COLLEVATI, R.G., BRONDANI, R.V.P., GRATTAPAGLIA, D. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, v.83, p.748-756, 1999.

CUNHA, P. P. da. Responsabilidade social corporativa: a memória do Programa de Reassentamento dos Atingidos pela Barragem da Usina Hidrelétrica Luiz Gonzaga (ex-Itaparica). 2012. 118p. **Dissertação (Mestrado)** – Escola Brasileira de Administração Pública e de Empresas, Rio de Janeiro, RJ.

DIEGUES, A.C. Na inventory of Brazilian wetlands. Switzerland, IUCN, 1994. 224p.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODHOL, A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. **Journal Fish Biology**, v.47, p.103-126, 1995.

VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri...*

FERRARIS, C.J. Checklist of catfishes, recent and fossil (Osteichthyes, Siluriformes), and catalogue of siluriform primary types. **Zootaxa**, v.1418, p.1-628, 2007.

FONTES, L.C. da S.; HOLANDA, F. S. R. **Estudo do processo erosivo das margens do baixo São Francisco e seus efeitos na dinâmica de sedimentação sedimentação do rio.** Aracaju, SE, BrazilBrasil: Relatório Final Projeto GEF São Francisco, 2002.

FRANKHAM R.; BALLOU J.R.; BRISCOE D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge: Cambridge University Press, Cambridge, England, UK.2002.

FRID, C.L.J.; HARWOOD, K.G.; HALL, S.J.; HALL, J.A. Long-term changes in the benthic communities on North Sea fishing grounds. **ICES Journal of Marine Science**, v.57, p.1303-1309, 2000.

GABRIEL NETO, F.A.; STEGMANN, L.F.; SILVA, K.M.S.; FRANÇA, E.J.; ELDEIR, A.C.A.; SEVERI, W. Composição da ictiofauna do Rio São Francisco no trecho médio e submédio. Anais do. In: VIII Congresso de Ecologia do Brasil, 23 a 28 de Setembro de 2007. Anais. Caxambu, 2007.

GODIM FILHO, J.G.C.; FORMIGA, K.T.M.; DUARTE, R.X.M.; SUGAI, M.R.V.B. Análise da cheia de 2004 na bacia do rio São Francisco - Desenvolvimento da pesca e aquicultura. Subprojeto 4.5C - Plano Decenal de Recursos Hídricos da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco-PBHSF (2004-2013), 15p., 2004.

GODINHO, H.P. e GODINHO, A.L. GODINHO. Fish communities in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. **Acta Limnol. Bras.** v.5, p.187-197, 1994.

- VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri...*
- GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (Org.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003.
- 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, p.351-360, 2007.
- GOLDSTEIN, D.B.; SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites: evolution and applications**. New York: Oxford University Press. 1999. 352p.
- GOULDING, M. **The fishes and the forest. Explorations in Amazonian Natural History**. Berkeley: University of California Press, 1980, 279p.
- GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSE, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F. e PETIT, R.J. Current trends in microsatellite genotyping. **Molecular Ecology Resources**. v.11, p.591-611, 2011.
- HEYWOOD, V.H. e IRIONDO, J.M. Plant conservation: Old problems, new perspectives. **Biological Conservation**. v.113, p.321-335, 2003.
- ICMbio, 2014 – Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em:<<http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/6358-especie-358.html?highlight=WyJsb3BoaW9zaWx1cnVzII0=>>>. Acesso em: 10 janeiro 2015.
- JEHLE, R. e ARNTZEN, J.W. Review: Microsatellite markers in amphibian conservation genetics. **Herpetological Journal**, v.12, p.1-9, 2002.

VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*...

KAZAZIAN, H. H. JR. Mobile elements: drivers of genome evolution. **Science**, v.303, p.1626, 2004.

KOHLER, H.C. Aspectos geocológicos da bacia hidrográfica do São Francisco (primeira aproximação na escala 1:1 000 000. In: H. P. GODINHO e A. L. GODINHO (org.). Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003, p.23-35.

LANCE, S.L.; LOVE, C.N.; NUNZIATA, S.O.; O'BRYHIM, J.R.; SCOTT, D.E.; WESLEY FLYNN, R.W. 32 species validation of a new Illumina paired-end approach for the development of microsatellites. **PLoS ONE**, v.8, p.1-11, 2013.

LINS, L.V.; MACHADO, A.B.M.; COSTA, C.M.R.; HERMANN, G. **Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 1997, 55p.

LOPES, R.; BRUCKNER, C.H.; LOPES, M.T.G. Polimorfismo isozimático e potencial de utilização das isozimas como marcadores genéticos em aceroleira. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.151-158, 2002.

LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E. Densidade de estocagem e salinidade de água na larvicultura de Pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.43, p.903- 909, 2008.

LUZ, R.K.; SANTOS, J.C.E. dos; BAZZOLI, N. Condicionamento alimentar de juvenis de *Lophiosilurus alexandri*. In: Congresso Brasileiro de Produção de Peixes Nativos de Água Doce. Dourados. **Anais**. Dourados: Embrapa Pecuária Oeste, 2007.

- VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*...
- MARTELETO, F.M. Influência de barragens hidrelétricas sobre a estruturação genética de *Prochilodus* Spp (Characiformes, Prochilodontidae) nas Bacias Hidrográficas do Rio Tocantins e do Rio São Francisco. 2011.
- MARTINS, D.M.F.; CHAGAS, R.M.; NETO, J.O.M.; JÚNIOR, A.V.M. Impactos da construção da usina hidrelétrica de Sobradinho no regime de vazões no Baixo São Francisco. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.15, n.9, p.1054– 1061, 2011.
- MEDEIROS, P.P. Comportamento da turbidez e material em suspensão, em um rio com vazão regularizada por sistema de barragens em cascata: Rio São Francisco (NE, Brasil). **Geochimica Brasiliensis**, v.29, n.1, 35, 2015.
- MEES, G.F. The Auchenipteridae and Pimelodidae of Suriname (Pisces, Nematognathi). **Zoologische Verhandelingen**, v. 1-256, 1974.
- MELO, J.F.B.; SANTOS, A.S.; DOURADO, L.A.M.; RODRIGUES, V.J.; GUIMARÃES, M.E.C. Situação atual e perspectivas da aquicultura (piscicultura) no Vale do São Francisco. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO ANIMAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO, Petrolina. **Anais**. Petrolina: UNIVASF, 2006. p. 201-214.
- MENEZES, N.A. Methods for assessing freshwater fish diversity. In: BICUDO, C.E.M. BICUDO e MENEZES, N.A. MENEZES. Biodiversity in Brazil: a first approach. São Paulo, CNPq, 1996. 326p.
- MENOTTI-RAYMOND, M.A. e O'BRIEN, S. Evolutionary conservation of tem microssatellites loci in four species of FELIDAE. **Journal of Heredity**, v.86: 319-322, 1995.

- VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*...
- MEURER, F.; OLIVEIRA, S.T.L.; DOS SANTOS, L.; OLIVEIRA, J.S.; COLPINI, LEDA M.S. Níveis de oferta de alimento vivo para alevinos de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*). **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**. 2010.
- MOESER, A.A. & BERMINGHAM, E. Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae). **Molecular Ecology**. Notes 5, p.363–365, 2005.
- MOYSES, C.B., MOCKFORD, S., ALMEIDA-TOLEDO, L.F. & WRIGHT, J.M. Nine polymorphic microsatellite loci in the Neotropical electric eel *Eigenmannia* (Teleostei, Gymnotiformes). **Molecular Ecology**. Notes 5, p.7–9, 2005.
- MURTA, B. H. M. **Gestão do Território e dos Recursos Hídricos e o Impacto da Implantação das Pequenas Centrais Hidrelétricas - PCHs**. UVRD, 2009.
- OLIVEIRA, K.K.C. Desenvolvimento e validação de microssatélites para estudos genéticos do piau-verdadeiro, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850), na Bacia do São Francisco. **Tese (Doutorado)** – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p.294-307, 2006.
- PAIVA, M. P. **Grandes represas do Brasil**. Brasília: Editerra, 1982. 304p.
- PEDREIRAS, M.M.; SANTOS, J.C.E.; SAMPAIO, E.V.; FERREIRA, F.N.; SILVA, J.L. Efeito do tamanho da presa e do acréscimo de ração na larvicultura de pacamã. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, p.1144-1150, 2008.

- VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri...*
- POWELL, W.; MACHRAY, G.C. e PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci**, v.1, p.215-222, 1996.
- RAMOS, V.O.C. **Pesca, pescadores e políticas públicas no Baixo São Francisco, Sergipe, Brasil**. Brasília, IBAMA, 2001. 197p.
- REIS, R.E.; KULLANDER, S.O; FERRARIS, F.J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003. 729p.
- RIZZO, E.; GODINHO, H.P. Superfície de ovos de peixes characiformes e siluriformes. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 115-132.
- ROSA, R.S.; MENEZES, N.A.; BRITSKI, H.A.; COSTA, W.J.E.M.; GROTH, F. Diversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da caatinga. In: LEAL, I.R. LEAL; TABARELLI, M. TABARELLI; SILVA, J.M.C. SILVA (eds.). *Ecologia e conservação da caatinga*. pp. 135-180. Recife: Editora Universitária, UFPE, Recife, 2003. p. 135-180.
- ROSA, V.H.S. Energia elétrica renovável em pequenas comunidades no Brasil: em busca de um modelo sustentável. 2007. **Tese (Doutorado)** - Centro de Desenvolvimento Sustentável. Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- RYMAN, N.; UTTER, F. **Population Genetics and Fishery Management**. Seattle: Univ. Washington Press, 1987.
- SATO, Y. e GODINHO, H.P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWEMCCONNELL, R.H. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*.

- VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri...*)
- Tradução: VAZZOLER, A.E.A.M.; AGOSTINHO, A.A.; CUNNINGHAM, P. São Paulo, EDUSP, 1999. p.534.
- SATO, Y.; FENRICH-VERANI, N.; NUÑER, A.P.O.; GODINHO, H.P.; VERANI, J.R. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p.229-274.
- SATO, Y.; SAMPAIO, E.V. A ictiofauna na região do alto São Francisco, com ênfase no reservatório de Três Marias, Minas Gerais. In: NOGUEIRA, M.G.; HENRY, R.; JORCIN, A. Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascata. São Carlos: RiMa, 2005. p.251-274.
- SCHLÖTTERER, C., KAUER, M. e DIERINGER, D. Allele excess at neutrally evolving microsatellites and the implications for tests of neutrality. Proc. Royal Society Lond. B, **Biological Sciences**, v.271, p.869–874, 2004.
- SHIBATTA, O.A. Pseudopimelodidae (Bumblebee catfishes, dwarf marbled catfishes), p. 401-405. In: REIS, R.E. REIS; KULLANDER, S.O. KULLANDER e FERRARIS JR, C.J. FERRARIS JR (Eds). Checklist of the freshwater fishes of South and Central America. Porto Alegre, EDIPUCRS, 2003. p.401-405.
- SILVA, J.V. e HILSDORF, A.W.S. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae). **Conservation Genetics and Molecular Research**, v.3, p.437–439, 2011.
- TELLES, M.P.C., RESENDE, L.V., BRONDANI, R.P.V., COLLEVATTI, R.G., COSTA, M.C. & SILVA JUNIOR, N.J. Isolation and characterization of microsatellite

- VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*...) markers in the armored catfish *Hypostomus gymnorhynchus* (Loricariidae). **Genetics and Molecular Research**, v. 9, p.1770–1774, 2010.
- TENÓRIO, R.A. Aspectos da biologia reprodutiva do niquim *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Actinopterygii, Pimelodidae) e crescimento da progênie em diferentes condições ambientais. 2003. 73p. **Dissertação (Mestrado)** - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.
- TENÓRIO, R.A.; SANTOS, A.J.G.; LOPES, J.P.; NOGUEIRA, E.M. de S. Crescimento do niquim (*Lophiosilurus alexandri* Steindachner 1876), em diferentes condições de luminosidade e tipos de alimentos. **Biological Sciences**, v.28, p.305-309, 2006.
- TORRES, C.J.F.; BRAMBILLA, M.; FONTES, A.S. e MEDEIROS, Y.D.P. Conflitos pelo uso da água para a irrigação, geração de energia hidroelétrica e manutenção do ecossistema aquático no baixo trecho do Rio São Francisco. **Revista Gestão e Sustentabilidade Ambiental**, v.4, p.195-210, 2015.
- TRAVASSOS, H. 1960. Catálogo dos peixes do vale do São Francisco. **Bol. Soc. Cear. Agron.** v.1, p.1-66, 1960.
- TRAVASSOS, H. Nótula sobre o pacamã, *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876. **Atas Societ Biology**, v.4, p.1-2, 1959.
- WEBER, J.L. Informativeness of human (dC-dA)_n. (dG-dT)_n polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.

VENTURA-LIMA, R. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri...*

WELCOMME, R.L.; HALLS, A.S. Dependence of tropical river fisheries on flow. In: International Symposium on the management of large rivers for fisheries, 2, 2004, Bangkok, FAO, 2004. v.2, p. 2676-283.

4- Artigo científico

Artigo científico a ser encaminhado ao periódico científico
Neotropical Ichthyology.

Todas as normas de redação e citação, deste capítulo, atendem as estabelecidas pela referida revista (em anexo).

Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876): uma espécie endêmica ameaçada de extinção no rio São Francisco

Raquel Ventura Lima¹, Hozana Leite Dantas¹, Ana Patrícia Souza de Lima¹, Maria Raquel Moura Coimbra¹

¹Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manuel de Medeiros, Dois Irmãos, CEP: 52171-900 Recife/Pernambuco (PE), Brasil. (RVL) quel.ventura@hotmail.com, (HLD) hozanadantas@gmail.com, (APSL) patillima@gmail.com, (MRMC) maria.rmcoimbra2@ufrpe.br (corresponding author)

Resumo

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é uma espécie de bagre endêmico do rio São Francisco pertencente a ordem dos Siluriformes. Trata-se de uma espécie muito apreciada nas regiões do rio São Francisco pela ausência de espinhos intramusculares e qualidade de seu filé, se destacando também pelo grande potencial para a aquicultura. O pacamã figura entre as espécies mais ameaçadas e programas de repovoamento nas diversas regiões desta bacia vêm sendo desenvolvidos. O objetivo deste trabalho foi desenvolver marcadores microssatélites inéditos para o pacamã que possam servir para estudos genéticos sobre essa espécie e suas populações. Amostras de tecido foram coletadas de peixes adultos capturados pela pesca artesanal entre os reservatórios de Sobradinho-BA e Itaparica-PE. Inicialmente, uma biblioteca genômica de DNA foi realizada e um conjunto de microssatélites foi obtido. Após a genotipagem, o número de alelos variou de dois a nove e as heterozigosidades médias foram de 0,659 (H_e) e de 0,416 (H_o), respectivamente. Apenas um marcador apresentou desvio do EHW e presença de alelos nulos. O coeficiente de endocruzamento total (F_{IS}) foi de 0,091, sugerindo a presença de homozigotos, que pode ser em decorrência de características da espécie. O conteúdo de informação polimórfica foi, na maioria dos casos, superior a 0,5, atestando a eficiência desses marcadores para estudos genéticos futuros.

Introdução

A Bacia do rio São Francisco ocupa aproximadamente 7% do território brasileiro, abrangendo as regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste (Paiva, 1982). Suas águas são utilizadas para diversos fins como agricultura, navegação, irrigação, turismo, aquicultura e outros, sendo a geração de energia a principal atividade econômica realizada nessas águas (Ana/Gef/Pnuma/Oea, 2004).

A interferência antrópica para a construção de usinas hidrelétricas tem interferido no fluxo natural destes ambientes, afetando a dinâmica e influenciando de forma direta os hábitos alimentares e reprodutivos dos peixes daquele local.

Dentre os peixes mais impactados encontra-se o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*), uma espécie endêmica do rio São Francisco que pertence à ordem Siluriforme e a família *Pseudopimelodidae*, uma família pouco estudada de bagres neotropicais de água doce, que ocorre apenas na América do Sul (Barros *et al.*, 2007) e que apresentam olhos reduzidos e boca grande, sugerindo uma pequena dependência da visão, atividade noturna e hábitos predatórios (Shibatta, 2013).

É carnívoro e bastante apreciado pela população local pelo sabor da sua carne, estando entre as espécies regionais de mais alto valor comercial (Luz & Santos, 2008). Possui grande potencial econômico para a aquicultura e uso internacional em aquários ornamentais (Santos & Luz, 2009), porém vários impactos ambientais tem reduzido seus estoques naturais (Mello *et al.* 2015).

Essa espécie assim como várias outras carecem de maior atenção e habilidade no exercício da administração pesqueira do rio São Francisco, necessitando de estratégias eficientes no estudo da bioecologia, identificação e diversidade das espécies distribuídas no Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco (Frid *et al.*, 2000; Ramos, 2001).

Para avaliar a diversidade genética de peixes, várias ferramentas genéticas têm sido utilizadas, como os marcadores de DNA que revelam polimorfismo em indivíduos geneticamente relacionados. Tais marcadores podem ser empregados em diversos fins, como filogenia molecular, ecologia, genética de populações, mapeamento e análises de similaridade e distância genética (Lopes *et al.*, 2002).

Os marcadores moleculares do tipo microssatélite são altamente polimórficos, com larga distribuição no genoma e facilidade de identificação, possibilitando a avaliação da diversidade genética (Powell *et al.*, 1996, Collevatti *et al.*, 1999), a estruturação de populações, a conservação de espécies (Tavares *et al.*, 2013), a

endogamia, os índices de diferenciação de populações e variabilidade de estoques (Yue *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010).

Para o uso desse tipo de marcador molecular, faz-se necessário o desenvolvimento de *primers* específicos, que são sequências únicas de DNA que cercam os microssatélites no genoma das espécies (Oliveira, 2012).

Até o presente momento não há registro de marcadores microssatélites específicos para o pacamã, tampouco qualquer avaliação da diversidade genética da espécie foi feita nesta Bacia. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar marcadores microssatélites para *Lophiosilurus alexandri* em uma população do Submédio São Francisco, coletada entre os reservatórios de Sobradinho (BA) e Itaparica (PE), disponibilizando assim ferramentas para que estudos genéticos sobre essa espécie possam ser realizados.

Material e Métodos

Amostragem

Foram coletadas amostras de tecido de uma população de *L. alexandri* selvagem (32 indivíduos) capturados na região do Submédio São Francisco, entre os reservatórios de Sobradinho (BA) e Itaparica (PE) entre os meses de março e abril de 2015. As amostras teciduais da nadadeira caudal de todos os indivíduos foram preservadas em etanol 95% e armazenadas no Laboratório de Genética Aplicada da Universidade Federal Rural de Pernambuco.

Extração do DNA genômico das populações de *L. alexandri*

O DNA total das 32 amostras de *L. alexandri* foi extraído seguindo o protocolo padrão de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (FCI), com poucas modificações (Sambrook *et al.*, 1989). Em cada amostra foram adicionados 700µL de tampão de extração (Tris-HCl 100 mM pH 7.5, 1% SDS) e 30µL de Proteinase K (10µg/mL). Em seguida as amostras foram incubadas a 50°C por 2 horas e depois a 37°C por 12 horas. Posteriormente 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 10 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 1 mL de etanol absoluto gelado, seguido de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos. Para a remoção final do excesso de sal e etanol o precipitado foi lavado com 500 µL de etanol a 70% e brevemente centrifugado

(10.000 g por 5 min). O DNA foi re-suspendido em TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0) e armazenado em freezer a -20°C. Para a quantificação do DNA foi utilizado um fluorímetro (QuantiFluor/Promega) e a integridade foi avaliada em eletroforese em gel de agarose a 1%.

Construção de biblioteca genômica parcial enriquecida para microssatélites

A biblioteca genômica foi construída com motivos di, tri e tetranucleotídicos de acordo com o protocolo de Glenn & Schable (2005), com algumas modificações. Foi extraído o DNA genômico de um único indivíduo utilizando fenol/clorofórmio/álcool isoamílico de acordo com o protocolo padrão de Sambrook *et al.* (1989). Em seguida, o DNA total foi quantificado e diluído para a concentração de 100 ng/μL. Foi realizada uma reação de digestão enzimática a 37°C por 16h seguida de inativação a 65°C por 20 minutos, para avaliar a eficiência das enzimas de restrição *Rsa* I, *Hae* III, *Dra* I, *Bst* I e *Hinc* III. A enzima *Rsa* I foi a que melhor digeriu o DNA. Após a digestão o DNA foi purificado com o kit Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega), desfosforilado para evitar a autoligação, e purificado novamente com o mesmo kit. Após a purificação, o DNA foi ligado aos adaptadores SNX-F (5'-GTAAAGGCCTAGCTAGCAGAATC-3') e SNX-R (5'-pGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAAA-3') na presença da enzima *Xmn* I para evitar a formação de dímeros de adaptadores.

Posteriormente, uma PCR assimétrica foi feita com o adaptador SNX-F para restabelecimento das fitas duplas de DNA. As amplificações foram feitas com um volume de reação de 50 μL, contendo: 100 ng DNA, 1 X Tampão de Thermopol®, 2 mM de MgSO₄, 8 mM de dNTP's, 0,5 U de Taq Thermopol® e 10 pmoles de adaptador SNX-F; nas seguintes condições: 72°C durante 5 min, 95°C durante 5 min, seguido de 25 ciclos (95°C durante 45 s, 62°C durante 1 min e 72°C durante 2 min) e uma extensão final de 72°C durante 10 min.

Os fragmentos gerados pela PCR assimétrica foram ligados aos adaptadores e hibridizados com sondas biotinizadas de motivos dinucleotídeos (AG)₁₂, (TG)₁₂ e (AC)₁₂, trinucleotídeos (AAG)₈, (AAT)₁₂, (AAC)₈ e (ATC)₈ e tetranucleotídeos (GACA)₄ e (GATA)₇. Os fragmentos hibridizados foram capturados com nanoesferas magnéticas com auxílio de um concentrador magnético de partículas.

O DNA enriquecido foi amplificado e purificado com o kit QIAquick (QIAGEN). A clonagem dos fragmentos foi feita utilizando o kit pGEM-T Easy Vector Systems

(Promega), que consistiu na ligação dos fragmentos de DNA ao vetor, seguido da transformação por choque térmico em células competentes de *Escherichia coli* JM109 (Promega). Em seguida as células foram cultivadas em meio sólido InMedia AmpBlue a 37°C por 16h, um segundo cultivo foi feito a partir das colônias positivas no meio LB a 37°C, durante 16h a 200 rpm. Ao final do processo de clonagem, foi extraído o DNA plasmidial, seguindo o protocolo padrão.

A biblioteca genômica gerou um total de 186 clones positivos onde todos foram sequenciados no Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems). Trinta e nove clones com tamanho compatível para discriminação de alelos em poliacrilamida foram selecionados, dos quais 24 apresentaram repetições dinucleotídicas, quatro foram trinucleotídicas, nove apresentaram repetições tetranucleotídicas e duas pentanucleotídicas. Todas as repetições foram classificadas como perfeitas (Tabela 2).

Tabela 2. Clones de microssatélites de pacamã com respectivos tamanhos e motivos.

Clone	Tamanho (pb)	Repetições	Clone	Tamanho (pb)	Repetições	Clone	Tamanho (pb)	Repetições
Lale01	135	(CA)11	Lale14	220	(AGTA)8	Lale27	149	(TA)6
Lale02	140	(GT)11	Lale15	232	(CA)5	Lale28	205	(TA)5
Lale03	310	(CTAT)17	Lale16	235	(TAA)7	Lale29	188	(TG)9
Lale04	210	(CA)11	Lale17	235	(TATT)11	Lale30	168	(TA)5
Lale05	130	(CA)9	Lale18	211	(TTCC)5	Lale31	125	(CA)9
Lale06	208	(GT)6	Lale19	211	(ATGG)6	Lale32	218	(TTCA)7
Lale07	237	(CA)6	Lale20	230	(TTA)5	Lale33	218	(ATAAT)6
Lale08	162	(AC)6	Lale21	232	(TG)6	Lale34	263	(AG)5
Lale09	209	(GA)19	Lale22	238	(AATG)5	Lale35	136	(AG)5
Lale10	199	(CA)5	Lale23	244	(TATT)15	Lale36	153	(TG)12
Lale11	195	(TAA)16	Lale24	170	(TAA)4	Lale37	194	(AC)5
Lale12	217	(AAAT)6	Lale25	156	(TA)8	Lale38	236	(AT)5
Lale13	218	(TTATT)5	Lale26	156	(GA)5	Lale39	278	(TG)13

Em seguida as sequências dos clones selecionadas foram editadas e inspecionadas no software BioEdit v.7.1.9 (Hall, 1999) e os primers de microssatélites, desenhados através dos softwares GeneRunner v.3.01 (Hastings Software, 1994) e WebSat (Martins *et al.*, 2009).

Otimização, amplificação e genotipagem dos marcadores microssatélite

Todos os primers foram otimizados via Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e as reações 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 por 45s, extensão a 72° C por 1 min e extensão final a 72°C por 10 min. Cada reação continha 1U de *Taq* polimerase, 200 µM de cada dNTP, 10 mM de Tris-HCL (pH 8,3), 50 mM de KCl, 2,5mM de MgCl₂, 1µM de cada *primer* e 100ng de DNA para um volume final de 10 µL.

Em seguida os produtos gerados pelas PCRs foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida vertical a 4% ou 5%, dependendo do tamanho do fragmento esperado. A eletroforese durou em média 1 hora e 30 minutos a 2000 V, 60 MA e 55 W. Ao término da corrida, o gel de poliacrilamida foi fixado com ácido acético a 10%, seguido de coloração com nitrato de prata a 0,1% e revelado com carbonato de sódio. O registro da imagem foi feito em um scanner. Ao final do processo de otimização, sete pares de primers polimórficos (Tabela 3) foram selecionados de acordo com a definição dos amplicons e reprodutibilidade.

Posteriormente, os sete marcadores foram utilizados para amplificar a população de pacamã via PCR e seus produtos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida. Um marcador de peso molecular de 10 pb (Invitrogen) foi utilizado para estimar o tamanho dos alelos. Para a avaliação do tamanho esperado do genótipo de cada indivíduo foi utilizado o programa Molecular Imaging Software Version 4.0 (©1994-2005 EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, New York, (USA).

Tabela 3. Marcadores microssatélites para *L. alexandri*.

<i>Loci</i>	Primers (5' - 3')	T° anelamento	Tamanho pb
Lale01	F: CTAGAGATGGTTGTGTGTGA R: GTGGATGAGTAAATGTGGA	55°	310
Lale02	F: AGCCGTTTCCATGGTTTCCA R: GGAGTTCCGTGCGTTATTGC	65°	217
Lale03	F: GCGGCTGACTAAATACCCCA R: TTGGTTGCCCTGGACTGATC	65°	235
Lale04	F: GGAGCAGAGGCATTGCAAAG R: TGCCCTTTCTGACCTTGTGG	62°	188
Lale05	F: GGCCATGCATGCACACTTTA R: CCCC GACCCTATTCAGGAA	61°	218

Lale06	F: GACATCCCACCCAGCAAGAA	60°	218
	R: CCGCAATAGCACCTTTCAGC		
Lale07	F: ATTGGCGCATGGGTTGGAC	63°	162
	R: CTCGGGCAAGAACTGTGAGATAG		

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas através do software GENEPOP 4.0 (Raymond & Rousset, 1995), onde parâmetros, tais como número de alelos (N_a), heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foram calculados. Para estimar o desvio do EHW foi aplicado o método da cadeia de Markov usando os seguintes parâmetros: desmemorização = 1000, número de séries = 100, e número de iterações = 1000. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) de cada marcador foi calculado através do Microsatellite Toolkit 3.3.1 (Park, 2001).

Os alelos nulos são alelos não amplificados, que podem ocorrer devido a substituições, inserções ou deleções no sítio de anelamento dos *primers* (Callen *et al.*, 1993) resultando em um falso homozigoto. Podem aparecer quando ocorrem mutações nas regiões flangeadoras impedindo que um ou os dois *primers* se liguem (Tavares, 2007) e a sua frequência em marcadores microssatélites já foi relatada por alguns autores (Bruford & Wayne, 1993; Li *et al.*, 2003; Karlsson & Mork, 2005).

O software Micro-checker (Oosterhout *et al.*, 2006) foi utilizado para verificar a ocorrência desses alelos (A_n). O número de alelos efetivos (A_e), ou seja, aqueles que efetivamente passarão à geração seguinte e o número de alelos privados (N_p), únicos de cada população, foram obtidos pelo programa GenAIEx 6.1 (Peakall & Smouse, 2006). A significância de múltiplos testes foi corrigida pelo método de Bonferroni (Rice, 1989).

O tamanho efetivo populacional (N_e), ou seja, o número de indivíduos capaz de reter a variabilidade genética de uma população e passar para a próxima geração, foi obtido pelo método indireto baseado no desequilíbrio de ligação através do software Ne-Estimator (Ovenden *et al.*, 2007).

Resultados

A variabilidade genética da população de pacamã está descrita na tabela 4, considerando os genótipos de 32 indivíduos. Um total de 39 alelos foi encontrado para todos os *loci* com uma média de 5,5 alelos, sendo o Lale06 o que apresentou o maior número de alelos. Nenhum dos sete loci estava em desequilíbrio de ligação.

A média das heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) foi de 0,603 e 0,659, respectivamente. O desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi significativo apenas para o *locus* Lale04 (Tabela 4).

Tabela 4. Diversidade genética de *L. alexandri* no rio São Francisco para sete marcadores microssatélites. N, número de indivíduos; N_a , número de alelos; A_e , número de alelos efetivos; H_o , heterosigiosidade observada; H_e , heterosigiosidade esperada; Na, ocorrência de alelos nulos; N_p , alelos privados; F_{IS} , coeficiente de consanguinidade; desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), ns (não significativo), * $p < 0,05$.

População	Lale01	Lale02	Lale03	Lale04	Lale05	Lale06	Lale07	Média
N	29	24	29	30	25	31	32	-
N_a	7	4	8	5	4	9	2	5,571
A_e	5,881	2,043	6,094	2,219	2,148	4,491	1,998	3,553
H_o	0,827	0,500	0,758	0,400	0,720	0,741	0,281	0,603
H_e	0,844	0,521	0,850	0,558	0,545	0,790	0,507	0,659
Na	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Sim	-
N_p	1	3	5	5	4	8	-	-
F_{IS}	0,020	0,041	0,109	0,287	-0,329	0,061	0,449	0,091
PIC	0,807	0,469	0,814	0,509	0,458	0,745	0,375	-
HWE	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns	-

Em relação ao coeficiente de endogamia (F_{IS}) a população apresentou média de 0,091 (Tabela 4) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,375 a 0,814 (Tabela 4). Os *loci* Lale04 e Lale07 foram os únicos que apresentaram alelos nulos e o tamanho efetivo da população (N_e) foi menor que 100.

Tabela 5. Tamanho efetivo da população (N_e)*

	Submédio
Desequilíbrio de ligação	73,8
IC 95%	20,8 - ∞

*NeEstimator v1,3; IC 95% = intervalo de confiança

Discussão

Os marcadores microssatélites têm sido bastante utilizados para o monitoramento genético, principalmente através da avaliação de sistema de cruzamento, fluxo gênico e estrutura genética dos estoques de várias espécies de peixes (Yue & Orban, 2002). Apesar de o Brasil possuir uma grande diversidade de peixes de água doce, com interesse para o cultivo e pesca extrativa, ainda existe uma reduzida quantidade de trabalhos utilizando marcadores genéticos para a avaliação dessas populações (Oliveira *et al.* 2009).

Os loci microssatélites desenvolvidos para o *L. alexandri* demonstraram um alto grau de polimorfismo. Porém, esse valor é menor ao encontrado para outras espécies de siluriformes, como é o caso do *Pseudoplatystoma corruscans* (Dantas *et al.* 2013) que também ocorre no rio São Francisco.

O estudo sugere que essa baixa quantidade de alelos seja explicada como um reflexo da redução da população, que provavelmente sofre ao longo dos anos com os vários barramentos do rio São Francisco para a construção de usinas hidrelétricas, ou pelo fato de que espécies não migradoras podem apresentar menor variabilidade genética que espécies migradoras (Ward *et al.*, 1992; Lassala & Renesto, 2007).

Com relação ao conteúdo de informação polimórfica (PIC), a maioria dos marcadores desenvolvidos apresentou-se altamente informativo, podendo ser utilizados para estudos sobre estruturação populacional, diversidade genética e outros de grande relevância para a espécie.

Uma medida fundamental para avaliar a diversidade genética em populações é a heterozigosidade, que determina a variação por loco em uma população e é uma medida importante para validar marcadores.

No presente estudo os valores de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) foram semelhantes e apenas um dos marcadores desenvolvidos apresentou desvio significativo do EHW, o que parece ter sido ocasionado pela presença de alelos nulos e a sua

ocorrência é um problema comum em marcadores microssatélites (Callen *et al.*, 1993; O'Connell & Wright, 1997).

Benites (2008) estudando *P. corruscans* encontrou desvios de EHW em todas as populações analisadas através de marcadores microssatélites e encontrou também alelos nulos na maioria dos casos em que ocorriam os desvios. Os valores encontrados para o Coeficiente de Endogamia (F_{IS}) foram, em sua maioria, positivos sugerindo a presença de homozigotos nas amostras, o que pode ser explicado pelo fato de que esta espécie costuma se agrupar enterrando-se sob a areia e não realiza grandes movimentos (Athiê Guerra, comunicação pessoal), podendo favorecer o cruzamentos entre indivíduos aparentados.

Kincaid (1976) relata ao estudar truta arco-íris que os altos índices de endogamia resultaram em alta incidência de deformação morfológica, na redução da taxa de sobrevivência e diminuição significativa no peso médio dos juvenis. Alguns autores ao avaliar guppies (*Poecilia reticulata*) evidenciaram que a endogamia reduziu notavelmente a tolerância desses animais à salinidade e à temperatura (Fujio & Nakajima, 1992; Nakajima & Taniguchi, 2001; Shikano *et al.*, 2001a, b), enquanto Cena *et al.* (2006) constataram uma relação negativa entre a endogamia e o crescimento de *Sander vitreus*.

Alguns autores como Guttman & Berg (1998); Oliveira *et al.* (2002); Lopera-Barrero *et al.* (2006) e Povh *et al.* (2008) citam a redução da variabilidade genética como um dos principais fatores que influenciam diretamente a susceptibilidade desses animais a variações ambientais, podendo resultar na extinção de espécies. Segundo Moreira (2001) e Porta *et al.* (2006) essa redução pode afetar também o crescimento e até mesmo a reprodução das espécies.

Com relação ao número efetivo populacional (N_e) que descreve quantos indivíduos daquela população são capazes de carregar a diversidade genética da população (Wright, 1931), o valor obtido foi de 73,8 sugerindo, segundo Frankham (1996) que essa espécie enfrenta uma redução em seu potencial evolutivo. Franklin & Frankham (1998) relatam ainda valores referência entre 500 e 1.000 para que o potencial evolutivo das populações ameaçadas possam ser mantidas. Já Lynch & Lande (1998) recomendam valores de referência entre 1.000 e 5.000 para manter (a longo prazo) a segurança genética dessas espécies.

Valores reduzidos de N_e em uma população podem resultar em altas taxas de endogamia, gerando descendentes aparentados (Eldridge *et al.*, 1999; Lynch, 1996; Slate *et al.*, 2000) e esse é um dos critérios utilizados pela IUCN para inserir espécies na lista vermelha de animais ameaçados (Frankham, 2014).

O reduzido valor de N_e encontrado pode sugerir que com o tempo os descendentes dessa população venham a sofrer com altas taxas de endogamia e problemas resultantes, como: o

acúmulo de genes recessivos deletérios, redução da fecundidade, aumento da mortalidade, retardo no crescimento, defeitos no desenvolvimento, aumento na susceptibilidade à doenças e redução da plasticidade (Lacy, 1997).

Uma baixa diversidade e o aumento da consanguinidade podem resultar na vulnerabilidade de espécies à extinção (Lacy, 1997; Lynch, 1996). Alguns autores relatam que os tamanhos ideais para evitar a fixação de genes deletérios é de 1000 indivíduos e para proteger a população de variação genética adaptativa seria de 10.000 adultos (Lynch, 1996) porém em espécies vulneráveis à extinção e populações impactadas pelas ações antrópicas, esse tamanho populacional é praticamente impossível de ser alcançado.

No presente estudo foram desenvolvidos marcadores moleculares para a espécie *Lophiosilurus alexandri* que serão um legado permanente para espécie. Espera-se que essas ferramentas possam servir de base para futuros estudos sobre a conservação, manejo da espécie em seu ambiente natural e monitoramento dos programas de repovoamento.

Referências

- Ana/Gef/Pnuma/Oea. 2004. Projeto de Gerenciamento Integrado das Atividades Desenvolvidas em Terra na Bacia do São Francisco. PBHSF. Estudo Técnico de Apoio nº 08. Brasília, 49p.
- Barros, M. D. M., R. J. Guimarães-Cruz, V. C. Veloso-Júnior & J. E. Santos. 2007. Reproductive apparatus and gametogenesis of *Lophiosilurus alexandri* Steindachner (Pisces, Teleostei, Siluriformes). *Revista Brasileira de Zoologia*, 24: 213-221.
- Benites, C. 2008. Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Spix e Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores do tipo microssatélites. Tese, Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 88p.
- Bruford, M. W. & R. K. Wayne. 1993. Microsatellites and their application to populations genetics studies. *Current Opinion in Genetics & Development*, 3: 939-943.
- Callen D. F., A. D. Thompson, Y. Shen, H.A. Phillips, R. I Richards, J. C. Mulley & G. R. Sutherland. 1993. Incidence and origin of 'null' alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American Journal Human Genetic*, 52:922-927.
- Cena, C. J., G. E. Morgan, M. D. Malette & D. D. Heath. 2006. Inbreeding, outbreeding and environmental effects on genetic diversity in 46 walleye (*Sander vitreus*) populations. *Molecular Ecology*, 15: 303-320.
- Collevatti, R. G., R. V. P. Brondani & D. Grattapaglia. 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, 83: 748-756.
- Dantas, H. L. 2010. Avaliação da estrutura genética do surubim, *Pseudoplatystoma corruscans* (Actinopterygii: Siluriformes) como subsídio para o repovoamento do Submédio São Francisco. Dissertação, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 49p.
- Eldridge, M. D. B, J. M. King, A. K. Loupis, P. B. S. Spencer, A. C. Taylor, L. C. Pope & G. P. Hal. 1999. Unprecedented low levels of genetic variation and inbreeding depression in an island population of the black-footed rock-wallaby. *Conservation Biology*, 13:531-541.
- Frankham R., C. J. A. Bradshaw & B. W. Brook. 2014. Genetics in conservation management: revised recommendations for the 50/500 rules, red list criteria and population viability analyses. *Biological Conservation*. 170: 56-63.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. *Conservation Biology*, 10: 1500-1508.
- Franklin, I. R. & R., Frankham. 1998. How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, 1: 69-70.
- Frid, C. L. J., K. G., Hardwood, S. J. Hall & J. A, Hall. 2000. Long-term changes in the benthic communities on North Sea fishing grounds. *ICES Journal of Marine Science*, 57: 1303-1309.

- Fujio, Y. & M. Nakajima. 1992. Estimation of genetic load in guppy populations. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 58: 1603–1605.
- Glenn, T. C. & N. A. Schable. 2005. Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395: 202–222.
- Guttman, S. I. & D. Berg. 1998. Changes in the genetic diversity of aquatic organisms in the great lakes: causes and consequences. *Setac News*. 23-24.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Series*, 41:95-98.
- Karlsson, S. & J. Mork. 2005. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science*, 62: 1588-1896.
- Kincaid, H. L. 1976. Effects of inbreeding on rainbow trout populations. *Transactions of the American Fisheries Society*, 105(2): 273-280.
- Lacy, R. C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78: 320-335.
- Lassala, M. D. P. & E., Renesto. 2007. Reproductive strategies and genetic variability in tropical freshwater fish. *Genetics and Molecular Biology*, 30 (3): 690-697.
- Li, Q., C. Park, T. Kobayashi & A. Kijima. 2003. Inheritance of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone *Haliotis discos hannai*. *Marine Biotechnology*, 3: 331-338.
- Lopera-Barrero, N. M., R. P. Ribeiro, R. N. Sirol, J. A. Povh, P. C. Gomes, L. Vargas & D. P. Streit Jr. 2006. Genetic diversity in piracanjuba populations (*Brycon orbignyanus*) with the RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) markers. *Journal Animal Science*, 84:170-170.
- Lopes, R., C. H. Bruckner & M. T. G. Lopes. 2002. Polimorfismo isozimático e potencial de utilização das isozimas como marcadores genéticos em aceroleira. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 37: 151-158.
- Luz, R. K., J. C. E. Santos. 2008. Densidade de estocagem e salinidade de água na larvicultura de Pacamã. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 43: 903- 909.
- Lynch, M. & R. Lande. 1998. The critically effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation*, 1: 70-72.
- Lynch, M. 1996. A quantitative-genetic perspective on conservation issues. Pp. 471-501. In: Avise, J. C. & Hamrick, J. L. *Conservation genetics. Case histories from nature*. New York.
- Martins, W. S., D. C. Lucas, K. F. Neves & D. J. Bertioli. 2009. WebSat—a web software for microsatellite marker development. *Bioinformatics*, 3: 282-283.
- Mello, G. C. G. D., J. E. D. Santos, R. J. Guimarães-Cruz., A. L. Godinho & H. P. Godinho. 2015. Allometric larval growth of the bottom-dwelling catfish *Lophiosilurus alexandri*

- Steindachner, 1876 (Siluriformes: Pseudopimelodidae). *Neotropical Ichthyology*, 13(4), 677-684.
- Moreira, H. L. M. 2001. Genética e melhoramento de peixes. Pp. 135-147. In: Moreira, H.L.M., L. Vargas, R.P. Ribeiro & S. Zimmermann (Eds). *Fundamentos da moderna aquicultura*. Canoas, Editora da Ulbra.
- Nakajima, M. & N. Taniguchi. 2001. Genetics of the guppy as a model for experiment in aquaculture. *Genetica*, 111: 279-289.
- O'Connell, M. & M. Wright. 1997. Microsatellite DNA in fish. *Reviews in Fish. Biology and Fisheries*, 7: 331-363.
- Oliveira, K. K. C. 2012. Desenvolvimento e validação de microssatélites para estudos genéticos do piau-verdadeiro, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850), na Bacia do São Francisco. Tese, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 55p.
- Oliveira, C., F. Foresti & A. W. S. Hilsdorf. 2009. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1): 81-100.
- Oliveira, A. V., J. A. Prioli, S. M. A. P. Prioli, C. S. Pavanelli, H. F. Júlio Jr. & R. S. Panarari. 2002. Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the Upper Paraná river floodplain. *Genetica*, 115: 259-257.
- Ovenden, J. R., D. Peel, R. Street, A. J. Courtney, S. D. Hoyle, S. L. Peel & H. Podlich. 2007. The genetic effective and adult census size of an Australian population of tiger prawns (*Penaeus esculentus*). *Molecular Ecology*, 16:127-138.
- Paiva, M. P. (Eds.). 1982. *Grandes represas do Brasil*. Brasília, Editerra, 304p.
- Patel, A., P. Das, A. Barat, P. K. Meher & P. Jayasankar. 2010. Utility of cross-species amplification of 34 rohu microsatellite *loci* in *Labeo bata*, and their transferability in six other species of the Cyprinidae family. *Aquaculture Research*.41: 590-593.
- Peakall R. & P. E. Smouse. 2006. GENALEX 6.4: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology*, 6: 288-295.
- Porta, J., J. M. Porta, G. Matínez-Rodríguez & M. C. Alvarez. 2006. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. *Aquaculture*, 251:46-55.
- Povh, J. A., N. M. Lopera- Barrero, R. P. Ribeiro, E. Lupchinski Junior, P. C. Gomes & T. S. Lopes. 2008. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35: 5-15.
- Powell, W., G. C. Machray, V. Bretagnolle, J. F. Humbert, G. Periquets & Y. Bigot. 1999. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology*, 8: 493-503.
- Ramos, V. O. C. 2001. Pesca, pescadores e políticas públicas no Baixo São Francisco. Sergipe, IBAMA, 197p.

- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, J. C. E. & R. K. Luz. 2009. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. *Aquaculture*, 287: 324-328.
- Shibatta, O. A. 2013. Pseudopimelodidae. Pp. 338-346. In: Queiroz, L. J., G. Torrente-Vilara, W. M. Ohara, T. H. S. Pires, J. Zuanon & C. R. C. Doria (Orgs.). *Peixes do rio Madeira*. São Paulo, Dialeto Latin American Documentary.
- Shikano, T., T. Chiyodubo & N. Taniguchi. 2001b. Effect of inbreeding on salinity tolerance in the guppy (*Poecilia reticulata*). *Aquaculture*, 202: 45-55.
- Shikano, T., T. Chiyokubo, & N. Taniguchi. 2001a. Temporal changes in allele frequency, genetic variation, and inbreeding depression in small populations of the guppy (*Poecilia reticulata*). *Heredity*, 86: 153-160.
- Slate, J., L. E. B. Kruuk, T. C. Marshall, J. M. Pemberton & T. H. Clutton-Brock. 2000. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Biological Sciences*, 267:1657-1662.
- Tavares, A. 2007. Análise da estruturação genética da sub-espécie *Patella candei gomesii* Drouet 1858 (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) no arquipélago dos Açores. Dissertação. Faculdades de Ciências da Universidade do Porto, Porto.
- Wang, S., J. J. Hard & F. Utter. 2002. Salmonid inbreeding: a review. *Reviews in fish biology and fisheries*, 11: 301-319.
- Yue, G. H., Z. Y. Zhu, L. C.A. Lo, C. M. Wang, G. Feng, H. Y. Pang, J. Li, P. Gong, M. H. Liu, J. Tan, R. Chou, H. Lim & L. F. Orban. 2009. Genetic variation and population structure of Asian seabass (*Lates calcarifer*) in the Asia-Pacific region. *Aquaculture*, 293: 22-28.
- Yue, G. H. & L. Orban. 2002. Microsatellites from genes show polymorphism in two related *Oreochromis* species. *Molecular Ecology Notes*, 2: 99-100.

4. 1- Normas da Revista Neotropical Ichthyology

NEOTROPICAL ICHTHYOLOGY

INSTRUCTIONS TO AUTHORS - March 2015

SCOPE AND POLICY

Neotropical Ichthyology is the official journal of the Sociedade Brasileira de Ictiologia (SBI). It is a peerreviewed periodical that publishes original articles on Neotropical freshwater and marine fish in the areas of Biochemistry, Biology, Ecology, Ethology, Genetics, Molecular Biology, Physiology and Systematics. Submitted manuscripts must be relevant contributions within their specific research area and must provide clear theoretical foundations of the subject, description of the objectives and/or hypotheses under consideration, in addition to sampling and analytical designs consistent with the proposal. Descriptive original works of high quality and relevance will be considered for publication. Casual observations, scientific notes or studies merely descriptive not associated with relevant theoretical issues will not be considered. Editor and Section Editor of the area will evaluate the submitted manuscript to determine if its content is suitable for publication in the journal Neotropical Ichthyology. The journal is open for submissions to all researchers on Neotropical ichthyofauna. Payment of publication costs may be required if none of the authors is a member of the SBI. Submission of manuscripts

Manuscripts must be submitted as digital files at <http://mc04.manuscriptcentral.com/ni-scielo>. With each new manuscript submission, authors must include a cover letter with a statement that it constitutes original research and is not being submitted to other journals. In multi-authored papers, author responsible for submission must declare in the cover letter that all coauthors are aware and agree with the submission. All coauthors and respective mailing addresses and e-mails must be registered in the appropriate forms along with manuscript submission. During the submission, indicate the area of Ichthyology (Biochemistry and Physiology, Biology, Ecology, Ethology, Genetics and Molecular Biology or Systematics) to which the manuscript is referable. During the submission, indicate three possible referees (name, institution, country, and e-mail). Manuscripts that are not formatted according to instructions to authors will be returned to authors. Please, use the checklist bellow to review your manuscript before submission. Each item of the checklist must be filled and the file must be sent as supplemental file for review when submitting the manuscript. Only items not applicable for the article must be kept empty. Manuscripts submitted out of format, without some required file or in poor English will be returned without review.

FORM AND PREPARATION OF MANUSCRIPTS

Text must be submitted in English. Text must be in MS-Word or rtf file formats. Figures and tables must be uploaded separately as individual files. Do not duplicate information in the text, Figures and Tables. Submit only Figures and Tables that are strictly necessary. Supplementary files such as appendices, videos and others can be uploaded already formatted, as pdf or video files, and will be available only in the on line version. In taxonomic papers check also: [Neotropical Ichthyology taxonomic contribution style sheet](#).

Manuscript must contain the following items, in bold, unnumbered, not using pages break, in the cited order: Title, Abstract (in English), Resumo or Resumen (in Portuguese or Spanish), Keywords, Running Head, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements (optional), and References.

CHECKLIST FOR FORMATTING RULES

Please, be sure you have checked all the items carefully TITLE Title is presented in bold and lower case. In the title, subordinate taxa are separated by “:” as follows: “(Siluriformes: Loricariidae)”. New taxa names are not given/listed in title or abstract. Ex. “ A new species of loricariid catfish from the rio Ribeira de Iguape basin, Brazil (Ostariophysi: Siluriformes)”.

Title presents the scientific names (instead vernacular names) with authorship and year of description of the species, if applicable, and higher taxonomic categories in parentheses. Title reflects the contents of the paper.

AUTHORS

Only initial of authors names are in uppercase. First name of authors is not abbreviated. Superscript numerals are used to identify multiple addresses. The names of the last two authors of the manuscript are separated by “and”.

Ex. George S. Myers¹, Carl H. Eigenmann² and Rosa S. Eigenmann^{1,2}

AUTHORS ADDRESSES

Footnotes are not used.

Full mailing addresses and e-mail of all authors are provided, including institution name, ZIP codes, cities, states and countries. Corresponding author is informed by adding (corresponding author) after the email address. Superscript numerals are used to identify multiple addresses. Names of Institutions and Departments are in the original spelling and not translated to English. RUNNING HEAD Provided suggestion for the running head up to 50 characters.

ABSTRACT

It is concise, presented in English and do not contain new taxa names or authorship.

RESUMO or RESUMEN It is in Portuguese or Spanish. It is an accurate translation of the Abstract in English. **KEYWORDS** Five keywords are provided in English and in alphabetic order. Keywords do not repeat title words or expressions, or include Neotropical, that is the name of the Journal. Keywords mentions key of identification, if applicable.

TEXT

Text pages do not include headers, footers, or footnotes (except page number).

- Text is aligned to the left, not fully justified. All text is in Times New Roman font size 12. Text is not hyphenated. Lines are not numbered. The font “symbol” is used to represent the following characters: $\chi \mu \theta \omega \varepsilon \rho \tau \psi \upsilon \iota \circ \pi \alpha \sigma \delta \varphi \gamma \eta \phi \kappa \lambda \ni \beta \nu \cong \Theta \Omega \Sigma \Delta \Phi$

- Species, genera, and Latin terms (et al., in vitro, in vivo, vs., i.e, e.g.) are in italics. Scientific names are cited according to the ICZN (<http://iczn.org/iczn/index.jsp>). Authorship is given at the first reference of a species or genus. Spelling, current valid names and authorship of species have been checked in the Catalog of Fishes at <http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>.

- Latin terms presented between the generic and specific names (cf., aff., etc., e.g. *Hoplias* cf. *malabaricus*) are not in italics. The genus name is always fully spelled in first appearance in the text, in the beginning of a sentence and at least once in the figure and table caption(s).

There are no underlined words.

Abbreviations used in the text are listed under

Material and Methods, except for those in common use (e.g., min, km, mm, kg, m, sec, h, ml, L, g). Measurements use the metric system A list of institutional acronyms is given in Material and Methods section OR a reference to a published paper with a list of acronyms is given in Material and Methods section. A list of catalog numbers of voucher specimens is furnished. Reference(s) for species identification and classification used is(are) provided. Geographic descriptors (rio, igarapé, arroio, córrego) are given in lower case, except when referring to a locality name (e.g., Municipality of Arroio dos Ratos, State of Rio Grande do Sul).

ACKNOWLEDGMENTS

Acknowledgments are concise and include both first and last names of persons. Names of Sponsor Institutions are listed in their original spelling and not translated to English.

TABLES

Tables are numbered sequentially in Arabic numerals according to the order of citation in the text Tables are cited in the text using the following formats: Table 1, Tables 1-2, Tables 1, 4. In Table caption, the word Table, its respective number and final dot after the number are in bold. Ex. “Table 1., and must end in period. Tables are constructed in cells using lines and columns, and not “tab” or “space”. Table caption is self-explicative and presenting, if applicable, at least once the genus name spelled out. Tables do not contain vertical lines or footnotes [content of footnotes must be included in the caption]. Captions are listed at the end of the manuscript, in the following format: Table 1. Monthly variation of the gonadosomatic index in *Diapoma speculiferum*. Approximate locations where tables should be inserted must be indicated along the right margin of the text.

FIGURES

Figures are numbered sequentially in Arabic numerals according to their citation in the text. Figures are cited in the text using the following formats: Fig. 1, Figs. 1-2, Fig. 1a, Figs. 1a-b, Figs. 1a, c. Citations of subsections of the figures are indicated by not capital letters both in the figure and caption. Citations of figures from cited articles are cited using the same formats as figures published in the present article, but not capitalized: e.g., according to the figs. 2b of Vari & Harold (2001). In Figure caption, the word Fig., its respective number and final dot after the number are in bold. Ex. “Fig. 1.” and must end in period. Figures are of high quality and definition. Figures are submitted as Figure files. Figures are not being submitted as images inserted in Word files. Text included in graphs and pictures have a font size compatible with reductions to page width (175 mm) or column width (85 mm). Composed figures are prepared to fit either the page (175 mm) or column width (85 mm).

Illustrations include either a scale or reference to the size of the item in the figure caption. Objects or illustrations are not included in the figure caption. Replace with text (e.g. “black triangle”) or represent its meaning in the figure itself. A list of figure captions is presented at the end of the manuscript file in the following format: Fig. 1. _____ Approximate locations where figures should be inserted are indicated along the left margin of the text.

REFERENCES

References are cited in the following formats in the text: Eigenmann (1915, 1921) or (Eigenmann, 1915, 1921; Fowler, 1945, 1948) or Eigenmann & Norris (1918) or Eigenmann *et al.* (1910a, 1910b), always in chronological order after alphabetical order in case of more than one author cited. References do not include abstracts, technical reports or undergraduate monographs. Master Thesis or Ph.D. dissertations are listed only if necessary. References are not formatted with “tab” or “space”. References are rigorously ordered alphabetically. References published by two or more authors are listed in alphabetic order of the first author surname, then of second author surname, and successively. Journal names are given in full, not abbreviated. Italic or bold are not used for books titles and journals.

References rigorously match text citations.

Books are listed in the following formats:

Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). 1998. Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, Edipucrs, 603p.

Graça, W. J. & C. S. Pavanelli. 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá, Eduem, 241p.

Chapters are listed in the following format:

Campos-da-Paz, R. & J. S. Albert. 1998. The gymnotiform “eels” of Tropical America: a history of classification and phylogeny of the South American electric knifefishes (Teleostei: Ostariophysi: Siluriphysi). Pp. 401-417. In: Malabarba, L. R., R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena & C. A. S. Lucena (Eds.). Phylogeny and classification of Neotropical fishes. Porto Alegre, Edipucrs.

Thesis/Dissertations are listed in the following format:

Langeani Neto, F. 1996. Estudo filogenético e revisão taxonômica da família Hemiodontidae Boulenger, 1904 (sensu Roberts, 1974) (Ostariophysi, Characiformes). Unpublished Ph. D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, 171p.

Articles are listed in the following format:

Vari, R. P., C. J. Ferraris Jr. & M. C. C. de Pinna. 2005. The Neotropical whale catfishes (Siluriformes: Cetopsidae: Cetopsinae), a revisionary study. *Neotropical Ichthyology*, 3: 127-238. Internet sources are listed in the following format: Author(s). 2002.

Title of website, database or other resources,

Publisher name and location (if indicated), number of pages (if known). Available from: <http://xxx.xxx.xxx/> (Date of access – dd Month yyyy, e.g. 20 August 2013).

Softwares available online are listed in the following format:

Author(s). 2003. Title of the Software (Version) [Software], Publisher name and location (if indicated). Available from <http://www.xxxx/> (Date of access – dd Month yyyy, e.g. 20 August 2013).

Further information Contact Editor at neoichth@nupelia.uem.br