

Ana Luiza Bittencourt Paiva

**ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
MICROSSATÉLITES DE *PIMELODUS*
MACULATUS (PISCES, SILURIFORMES)**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Genética do Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte

Departamento de Biologia Geral

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

A minha mãe Maria
Lúcia, a minha irmã
Laura e ao Guilherme.

Agradecimentos

Ao professor Evanguedes Kalapothakis, pela oportunidade, pelos valiosos ensinamentos, pela paciência e pelo constante incentivo e estímulo a ciência.

A todos os colegas do laboratório, Andréa, Anderson, André, Ana Paula, Bárbara, Carol, Higgor, Isabela, Maria, Marcelo, Tatiana e Thaís, pelo apoio às vezes indispensável, pela amizade e pela agradável convivência.

Ao Gabriel pelas dicas e sugestões e a Juliana e Tatiana Barroca que colaboraram de maneira especial para realização desse trabalho.

Ao pessoal do Centro de Transposição de Peixes do ICB pelas coletas de mandis no Rio Grande.

Ao pessoal do Laboratório de Genética Humana e Médica pela incessante colaboração.

Ao pessoal do LBEM pelos seqüenciamentos e ao Leandro pela disponibilidade e paciência.

As amigas Daiane, Joana e Luciana Lara pelo apoio e momentos de descontração.

A professora Cleusa, pela amizade e estímulo.

Aos professores do departamento de Genética e a Marina, pela colaboração.

A minha mãe, pelo carinho e dedicação e a minha irmã pelo companheirismo e incentivo.

Ao Guilherme, por seu amor, incentivo, colaboração e compreensão pela distância.

Sumário

Lista de Figuras	6
Lista de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas	8
Resumo	10
Abstract	11
1. Introdução.....	12
1.1. Efeitos genéticos.....	14
1.2. Sistemas de transposição e repovoamentos.....	15
1.3. A Bacia do Rio Grande	18
1.3.1. A espécie <i>Pimelodus maculatus</i> (Lacépède, 1803)	25
1.4. Marcadores moleculares e microssatélites.....	27
2. Objetivo	32
2.1. Objetivos específicos	32
3. Metodologia	33
3.1. Construção da biblioteca genômica	33
3.1.1. Extração de DNA genômico	33
3.1.2. Corte com enzima de restrição.....	33
3.1.3. Purificação em coluna de <i>Sepharose S400</i>	34
3.1.4. Corte e defosforilação do vetor de clonagem	34
3.1.5. Ligação ao vetor de clonagem.....	34
3.1.6. Preparação de bactérias eletrocompetentes	35
3.1.7. Transformação	36
3.1.8. Seleção pelo sistema IPTG/ X-gal.....	36
3.1.9. Confirmação da presença e do tamanho dos insertos nas colônias brancas.....	37
3.1.10. Coleta dos clones.....	37
3.1.11. Extração de plasmídeo por lise alcalina (<i>prep</i>)	38
3.2. Triagem com sonda radioativa	38
3.2.1. Aplicação dos clones em membranas de <i>nylon</i>	38
3.2.2. Confeção das sondas radioativas	39
3.2.3. Hibridização com as sondas radioativas e exposição ao filme de raio-x....	40
3.2.4. Revelação das autoradiografias	40
3.2.5. Análise das autoradiografias	41
3.3. Preparação para o seqüenciamento	41
3.3.1. Nova transformação dos clones positivos	41
3.3.2. Purificação dos plasmídeos.....	42
3.3.3. PCR dos clones positivos retransformados e purificados	42
3.4. Seqüenciamento	43
3.4.1. Seqüenciamento dos clones positivos retransformados e purificados	43
3.4.2. Consenso de seqüências	43
3.5. Desenho dos <i>primers</i>	44
3.6. Padronização da PCR.....	44
3.7. Coleta de indivíduos e extração de DNA de nadadeiras	45
3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	46
3.9. Genotipagem	46
3.10. Cálculo das freqüências alélicas, H_e e H_o e desvios do EHW	47
4. Resultados.....	48
4.1. Construção da biblioteca genômica	48

4.1.1. Extração e corte do DNA genômico com enzima de restrição e purificação em coluna de <i>Sepharose</i>	48
4.1.2. Defosforilação do vetor de clonagem e ligação ao DNA cortado purificado.....	49
4.1.3. Transformação e seleção pelo sistema IPTG - X-gal.....	49
4.1.4. Confirmação da presença e tamanho dos insertos.....	50
4.2. Hibridização com sondas radioativas	51
4.3. Seqüenciamento dos clones com sinal positivo	54
4.4. Desenho dos <i>primers</i>	55
4.5. Padronização da PCR.....	61
4.6. Cálculo das frequências alélicas, H_e e H_o e desvios do EHW	63
5. Discussão	64
6. Conclusões	69
7. Referências Bibliográficas.....	70

Lista de Figuras

Fig. 1 - Mapa da Bacia do Rio Grande.....	19
Fig. 2 - Localização das represas no rio Grande	20
Fig. 3 - Perfil vertical do Rio Grande com suas represas hidrelétricas	21
Fig. 4 - Relação entre a ocorrência de espécies de peixes nativos e represas hidrelétricas da Bacia do Rio Grande.....	24
Fig. 5 - <i>Pimelodus maculatus</i> com cerca de 25 cm de comprimento.....	25
Fig. 6 - Vetor pUC18 utilizado na montagem da biblioteca genômica do peixe <i>Pimelodus maculatus</i>	35
Fig. 7 - Esquema da aplicação dos clones nas membranas de <i>nylon</i>	39
Fig. 8 - a) Gel de agarose 0,8% com resultado da extração de DNA genômico e corte com enzima de restrição b) gel de agarose 1% com resultado da purificação em coluna de <i>Sepharose S400</i>	48
Fig. 9 - Gel de agarose 1% com resultado da defosforilação do vetor de clonagem ...	49
Fig. 10 - Placa de Petri com colônias resultantes da transformação	50
Fig. 11 - Gel de agarose 1% corado com resultado da PCR de colônias brancas.....	50
Fig. 12 - Autoradiografia da membrana 1 lavada com SSC 5X a 50°C.....	52
Fig. 13 - Autoradiografia da membrana 1 lavada com SSC 3X a 55°C.....	52
Fig. 14 - Autoradiografia da membrana 1 lavada com SSC 2X a 60°C.....	53
Fig. 15 - Autoradiografia de membrana de confirmação de clones positivos lavada com SSC 3X a 55°C	53
Fig. 16 - Gel de acrilamida 10% corado com nitrato de prata com amplificação do locus 1T35..	62
Fig. 17 - Gel de acrilamida 10% corado com nitrato de prata com amplificação do locus 1X3.	62
Fig. 18 - Gel de acrilamida 10% corado com nitrato de prata com amplificação do locus 1V26.	62

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Usinas Hidrelétricas situadas no Rio Grande - MG	22
Tabela 2 - Quantidades de reagentes utilizados na padronização da PCR.....	44
Tabela 3 - Resultado da triagem com sondas radioativas na biblioteca de <i>P. maculatus</i>	51
Tabela 4 - Motivos microssatélites encontrados e quantidade de clones correspondentes.	54
Tabela 5 - Lista dos clones utilizados para desenho dos <i>primers</i>	56
Tabela 6 - Lista dos <i>loci</i> com amplificação satisfatória e condições de PCR utilizadas.	61
Tabela 7 - Resultado da análise pelos programas LabImage e Genepop.	63
Tabela 8 - Frequências alélicas de cada <i>locus</i> calculadas pelo programa Genepop.....	63

Lista de Abreviaturas

AFLP - Amplified Fragment Length Polymorphism

ATP - Adenosina trifosfato

dNTP - Desoxi (nucleotídeo) 5.-trifosfato

°C - Graus Celsius

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DO600 - Densidade Ótica em comprimento de onda de 600 nm

DTT - Ditionitrito

EHW - Equilíbrio de Hard-Weinberg

g - grama

H_e - Heterozigosidade esperada

H_o - Heterozigosidade observada

LB - Meio Luria Bertani para cultura de bactérias

M - Molar

mM - milimolar

mA - mili Ampere

min - Minuto

ml – Mililitro

mCi- milicurie

ng – nanograma

µg – micrograma

µl – Microlitro

pb - Pares de base

PCR - Reação em cadeia da polimerase

pH - Potencial hidrogeniônico

Pmol - Picomol

PTC - *Programmable Thermal Controller*

q.s.p. - quantidade suficiente para

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

RFLP- Restriction Fragment Length Polymorphism

rpm. - Rotações por minuto

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

SNP- Single Nucleotide Polimorphism

TAE - Tris, Ácido acético, EDTA

Taq DNA polimerase - DNA polimerase termoestável de *Thermus aquaticus*

TE - Tris, EDTA

Temed - N,N,N', N' - tetrametiletilenodiamino

U - Unidade de enzima

UV - Ultra Violeta

V- volts

Resumo

Nas últimas décadas, a crescente demanda por energia elétrica tem levado a construção de inúmeras usinas hidrelétricas, sendo que muitos rios têm se transformado numa sucessão de reservatórios. Além de alterações no regime hídrico e bloqueio de rotas migratórias de peixes de piracema, uma das consequências do represamento é o isolamento de populações nativas de peixes, podendo levar a efeitos como perda de variabilidade genética e depressão endogâmica, reduzindo o valor adaptativo médio populacional e aumentando o risco de extinção local de espécies. Assim, é de grande relevância a realização de estudos populacionais em espécies cujo habitat esteja sofrendo fragmentação devido a construção de barragens. Os marcadores moleculares do tipo microssatélite vêm sendo amplamente utilizados em análise populacional de várias espécies, pois apresentam alto grau de polimorfismo, sendo que os *loci* são geralmente caracterizados por uma alta heterozigosidade. O objetivo desse trabalho foi o isolamento de regiões microssatélites de *Pimelodus maculatus*, conhecido popularmente como mandi ou mandi amarelo, para posteriores estudos populacionais dessa espécie na Bacia do Rio Grande. Atualmente, estão instaladas doze usinas hidrelétricas nesse rio e em consequência tem havido modificações na composição e na abundância da fauna nativa de peixes. Apesar dessas alterações, *Pimelodus maculatus* ainda é encontrado com frequência em algumas regiões do rio e não sofre medidas de peixamento, podendo se tratar de um bom modelo para estudos. O isolamento das regiões microssatélites foi feito a partir da construção de uma biblioteca genômica e posterior varredura com sondas de oligonucleotídeos com vários tipos de seqüências repetitivas marcadas radioativamente. Na varredura foram encontrados cerca de 5% de clones positivos. Destes, foram seqüenciados 118 clones e 82 (69%) possuíam algum tipo de seqüência microssatélite. Foram desenhados *primers* para 15 dessas seqüências, e conseguiu-se a padronização da PCR de 6 destes *loci* que foram testados em 48 indivíduos coletados na represa de Igarapava. Foram observados de três a quatorze alelos por locus, sendo que as heterozigosidades observadas e esperadas variaram de 0,5 a 0,89 e de 0,53 a 0,95 respectivamente. Dos seis *loci*, todos exceto um (1V26) não apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hard-Weimberg, indicando sua utilidade para análises populacionais. Espera-se que estes *loci* possam ser eficientemente utilizados em estudos de variabilidade genética de *Pimelodus maculatus*, e que juntamente com estudos de outras espécies da Bacia do Rio Grande, contribuirão para o desenvolvimento de estratégias de manejo e conservação que minimizem os efeitos causados pelo represamento.

Abstract

In the last decades, increasing demand for electric energy have led to the construction of many hydroelectric power plants, and many rivers have been transformed into a succession of reservoirs. Besides the flood regime changes and blocking of migratory routes of migratory fishes, one of the consequences of the construction of dams is the isolation of native populations, which can lead to effects such as the loss of genetic variability and endogamic depression. This can reduce the fitness and increase the risk of local extinction of the species. Thus, it is of huge relevance the accomplishment of populational studies in species which been suffering habitat fragmentation because of the implementation of dams. Molecular markers as microsatellites have been largely used in populational analysis of many species, because their high level of polymorphism and the *loci* are usually known by their high heterozygosity. The objective of this study was to isolate and to characterize microsatellite regions of *Pimelodus maculatus*, known as mandi, for further populational studies of this species in Bacia do Rio Grande. Currently, 12 hydroelectric power plants are built in this river and as a consequence there have been many changes in the species composition and the abundance of native fishes. Even in face of those changes, *Pimelodus maculatus* still can be frequently found in some regions of the river and do not suffer stocking and thus may constitute a good model for population studies. For the isolation of the microsatellites, a genomic library was constructed and hybridized with repetitive sequences of radioactively labeled oligonucleotides. About 5% of the clones showed positive signal. Of 118 analyzed clones, 82 (69%) contained microsatellite motifs, of which we were able to design primers for 15. Among these primer pairs, 6 showed clear band patterns and were tested in 48 individuals collected from the Igarapava dam. We detected three to fourteen alleles per locus and the observed and expected heterozygosities ranged from 0.50 to 0.89 and from 0.53 to 0.95, respectively. Out of the six tested *loci*, all but one (1V26) did not display significant deviations from Hardy–Weinberg expectations, indicating its usefulness in population genetics studies. We hope that these loci will provide efficient tools for the genetic variation analysis of *P. maculatus* and that, along with studies from other species of the Rio Grande basin; it will contribute to the establishment of future management plans to counteract the effects of the impoundments in this river.

1. Introdução

O aumento populacional e o desenvolvimento industrial têm levado a uma crescente demanda para a produção de energia elétrica. Nas últimas décadas, muitos rios vêm sendo represados em todo mundo para a construção de usinas hidrelétricas.

O Brasil é um país dotado de uma vasta e densa rede hidrográfica, contendo cerca de 15% de toda água doce do planeta. Muitos de seus rios se destacam pela extensão, largura e profundidade. Em decorrência da natureza do relevo, predominam os rios de planalto que apresentam em seu leito rupturas de declive, vales encaixados, entre outras características, que lhes conferem um alto potencial para a geração de energia elétrica. Cerca de 90% da energia consumida no país provém de hidrelétricas, e assim muitos rios brasileiros têm sido transformados numa sucessão de reservatórios, provocando inundações de grandes áreas, alterações no regime hídrico e na área de reprodução da fauna aquática (Martins & Tamada, 2000).

Um dos efeitos do represamento é o bloqueio de rotas migratórias de espécies de peixes que necessitam de se deslocar à montante para desova no período reprodutivo, fenômeno conhecido como piracema. Peixes migratórios necessitam de diferentes ambientes para as principais fases de seu ciclo de vida, como crescimento, maturação sexual e reprodução (Larinier, 2000). A migração desempenha um papel fundamental no sucesso reprodutivo, pois além de ser um estímulo para o desenvolvimento das gônadas, também promove o encontro e uma alta concentração de ambos os sexos em local favorável à fertilização, ao desenvolvimento (alta oxigenação) e com baixa predação (baixa transparência da água). O ciclo biológico dessas espécies também está relacionado aos ciclos hidrológicos dos rios, ou seja, os ciclos de cheias e secas, que também são alterados com o represamento. Acima da barragem a área está permanentemente inundada pelo reservatório e abaixo de barragem as cheias são reduzidas, ou ocorrem em períodos errados, alterando a conectividade entre o rio e áreas de reprodução, além de interferir no estímulo para a desova (Carosfeld *et al.*, 2003).

Assim, espécies de peixes adaptadas a ambientes reofílicos são as mais afetadas com a transformação súbita do ambiente lótico para lêntico, pois as adaptações e estratégias reprodutivas estavam associadas ao primeiro. Além disso, a mudança de condições pode comprometer a abundância das espécies em vários aspectos, como a utilização do espaço físico, a oferta de alimento, a qualidade da água e do substrato (Braga, 2001).

Os efeitos das barragens em espécies de peixes vêm sendo documentados em todo o mundo (Morita & Yamamoto, 2001; Neraas & Spruell, 2001, Heggenes & Roed, 2006). Geralmente, há um declínio da população devido à mudança de um ambiente de rio para um ambiente lacustre e também pelo isolamento dos peixes migratórios dos locais de desova e alimentação. Essa ruptura pode levar a uma extinção local se habitats críticos forem perdidos ou se tornarem inacessíveis (Godinho & Godinho, 1994, Neraas & Spruell, 2001).

Gosset *et al.* (2006) confirmaram os vários efeitos negativos da fragmentação por barragens em uma espécie migratória (*Salmo trutta*). Esses peixes encontravam dificuldades de entrada nos tributários onde se reproduzem devido à baixa descarga de água. Uma vez que conseguiam entrar eram impedidos de continuar o movimento a montante pelas barragens, que apresentaram vários níveis de dificuldade, dependendo do nível de água e da estrutura do obstáculo. Como esperado, a fragmentação do curso d'água influenciou fortemente os padrões de migração. Em longo prazo pode haver isolamento reprodutivo dentre dos cursos d'água, levando a formação de unidades populacionais isoladas. Além disso, é provável que a perda de tempo e energia (a espera a jusante das barragens por um aumento na descarga) possa comprometer o sucesso reprodutivo, assim com a probabilidade de sobrevivência. A restrição imposta pela fragmentação ao comportamento migratório e a seleção de locais de desova pode levar a um decréscimo no valor adaptativo da prole desses peixes (Gosset *et al.* 2006).

1.1. Efeitos genéticos

Além do bloqueio de rotas migratórias a construção de barragens em um rio também pode levar a alteração de populações selvagens de peixes por impedir o fluxo de indivíduos entre populações. A troca de genes entre populações homogeniza as frequências alélicas entre essas populações e determina os efeitos relativos da seleção e da deriva genética (Balloux & Moulin, 2002). Assim, o isolamento de populações pode levar a efeitos como diminuição do número efetivo, que aumenta as chances de deriva e consequentemente a perda de variabilidade genética (Vrijenhoek, 1998).

Além disso, pode haver um aumento de endogamia, que é o acasalamento de indivíduos aparentados, podendo levar a depressão endogâmica. Uma vez que a endogamia reduz o sucesso reprodutivo e a sobrevivência e a perda de diversidade genética reduz a habilidade de populações responderem às mudanças ambientais, muitos autores sugerem que fatores genéticos contribuem para o risco de extinção em espécies ameaçadas (DeSalle, 2005, Frankham, 2003).

Os níveis de heterozigosidade geralmente estão relacionados com parâmetros importantes na sobrevivência das espécies, como a eficiência reprodutiva e resistência a doenças (Matioli, 2001). Spielman *et al.* (2004) comparando os níveis de heterozigosidade de espécies ameaçadas de extinção com a heterozigosidade de espécies semelhantes não ameaçadas concluiu que as primeiras apresentam níveis de heterozigosidade bem inferiores.

Ao contrário do que alguns acreditam, mudanças genéticas e diferenças significativas na resposta fenotípica ocorrem não apenas em uma escala de tempo evolutiva. Mudanças marcantes podem ocorrer em poucas décadas se as populações forem expostas à intensa pressão seletiva ou estiverem muito sujeitas a deriva (Carvalho, 1993).

Dessa forma é necessária à implementação de programas de manejo e conservação em espécies sujeitas a fragmentação por impacto antropogênico, e que só serão realmente eficazes considerando os fatores genéticos

(Frankham, 2003). O manejo de populações fragmentadas ainda é raro, mas é umas das mais importantes questões em genética da conservação (Frankham, 2003). Quando realizadas com cautela, estratégias de aumento de tamanho populacional e de fluxo gênico entre populações, podem reduzir o risco de deriva genética e de depressão endogâmica (Kohn *et al.*, 2006).

Na tentativa de minimizar os efeitos causados por barragens, duas principais estratégias de manejo vêm sendo utilizadas pelas companhias hidrelétricas: os sistemas de transposição de indivíduos através de escadas e os programas de repovoamento.

1.2. Sistemas de transposição e repovoamentos

Para a minimização dos efeitos das represas sobre a ictiofauna, várias medidas têm sido propostas e inseridas na legislação brasileira. A primeira lei a respeito da construção de escadas para peixes no Brasil é a lei nº. 2.250 de 28 de dezembro de 1927. A citada lei estabelecia que “todos quantos, para qualquer fim, represarem as águas dos rios, ribeirões e córregos, são obrigados a construir escadas que permitam a livre subida dos peixes”. A partir de então, várias outras leis a respeito da construção de escadas foram instituídas e modificadas (Juras, 2001).

No estado de Minas Gerais, a legislação ambiental, artigo 1º da lei 12488 de 09/04/1997, torna obrigatória a construção de escadas para peixes de piracema em barragem edificada pelo estado. Segundo o parágrafo único deste artigo, o disposto não se aplica quando em virtude das características do projeto da barragem, a medida for considerada ineficaz ou desnecessária, ouvindo-se então o Conselho Estadual de Política Ambiental – COPAM.

A construção de escadas para peixes ainda é um tema controverso no Brasil, pois existem ainda poucos estudos a respeito de sua real eficácia. A construção generalizada de escadas, sem o conhecimento prévio da ictiofauna presente, aliado a desconsideração de características técnicas importantes (declividade, vazão, posição em relação ao eixo da barragem, etc.) necessárias ao sucesso na transposição dos peixes, mostrou-se equivocada, devido a

constatação de que muitas espécies não conseguem utilizá-las (Juras, 2001). A construção de mecanismos de transposição de peixes é também extremamente dispendiosa e a construção indiscriminada, apenas para atender a dispositivos legais vem declinando, em vista de observações que, em muitos casos não haveria real necessidade. Por exemplo, em locais onde antes já havia barreiras efetivas para a migração, como corredeiras (Carolsfeld *et al.*, 2003).

Obras de transposição devem ser implantadas quando os estudos indicarem sua pertinência, considerando a existência de peixes de piracema a jusante, bem como as condições dos trechos a montante e a possibilidade efetiva da reprodução e do desenvolvimento inicial dos indivíduos jovens (Juras, 2001). Diferentes espécies reagem aos obstáculos de forma diferente, sendo que algumas conseguem subir as escadas, enquanto outras estabelecem populações distintas nos fragmentos disponíveis do rio depois da construção das barragens (Carolsfeld *et al.*, 2003).

Neraas & Spruell (2001), determinaram o efeito da fragmentação de habitat na estrutura genética de trutas (*Salvelinus confluentus*), causadas por usinas hidrelétricas no rio Fork (EUA), através da análise de microssatélites. Foi constatado que os indivíduos que se aglomeravam na base de uma barragem pertenciam às populações à montante da represa. Isso indica que esses indivíduos foram impedidos pela represa de realizar a migração, constatando a necessidade de mecanismos de transposição.

Taylor *et al.* (2003), também demonstraram através de microssatélites, que populações de outra espécie de truta (*Oncorhynchus clarki lewisi*) de diferentes locais de uma bacia no Canadá eram compostas de unidades demográficas distintas. Isso se deve ao fato de que a maioria da variação molecular foi observada entre populações e devido também a alta frequência de alelos restritos a algumas populações. Além disso, a significativa divergência entre populações acima e abaixo de barreiras é consistente com o isolamento físico e independência demográfica, o que ressalta que procedimentos de manejo devem levar em conta populações isoladas.

Assim, sistemas de manejo devem levar em conta as taxas históricas de fluxo gênico entre as populações. Quando análises genéticas revelam que não

há divergência substancial entre populações e evidências geográficas indicam fragmentação recente, as translocações devem ser implementadas como forma de manutenção de tamanho populacional e evitar deriva e endogamia. Ao contrário, quando as populações são separadas geograficamente e diferem geneticamente, o melhor é manter cada uma em suas respectivas áreas (Vrijenhoek, 1998). Populações selvagens são geralmente adaptadas a condições do local onde vivem e a mistura de indivíduos de composição genética muito diferente pode levar a depressão exogâmica (Amos *et al.*, 2001). Estudos em um grande número de espécies demonstraram o fato de que estruturação populacional pode ocorrer, mesmo dentro de pequenas distâncias, o que tem implicações para a conservação da diversidade genética nesses sistemas (Primmer *et al.*, 2006).

Outra estratégia de manejo considerada uma alternativa aos sistemas de transposição são os repovoamentos de represas através de peixamentos com espécies nativas e que tem sido utilizada exaustivamente nas últimas décadas. Tais peixamentos se processam de duas maneiras: coleta e transposição de peixes adultos acumulados abaixo das barragens na época da migração ou introdução de alevinos oriundos de estações de piscicultura.

Um programa de repovoamento tem que ter como base a preservação da variabilidade genética do ambiente natural, aumentando assim, o sucesso adaptativo da espécie dentro de um ambiente de contínuas alterações. A opção pelo repovoamento, deve, portanto levar em consideração a variação genética existente dentro e entre populações distribuídas na bacia de influência do reservatório. Esta etapa é fundamental para o estabelecimento e a manutenção dos estoques fundadores na estação de reprodução, que deverão representar a distribuição da variabilidade genética da espécie da região. Assim, a compreensão das diferenças genéticas entre as diversas populações nativas, bem como a composição das mesmas em cativeiro é uma etapa fundamental para a manutenção de estoques e possibilita um manejo genético em longo prazo de espécies de peixes em programas de repovoamento (Hiltsdorf & Krieger, 1998)

Além disso, programas de reprodução em cativeiro devem possuir um planejamento genético apropriado para evitar problemas decorrentes da seleção e do cruzamento de poucos indivíduos (*bottlenecks*), que pode ser evitado com a constante introdução de genes de estoques selvagens (Vrijenhoek, 1998). Assim, análises genéticas cuidadosas através de marcadores moleculares podem ser utilizadas para monitorar a diversidade e evitar perdas de alelos raros (Vrijenhoek, 1998).

1.3. A Bacia do Rio Grande

Atualmente 90% da energia consumida no Brasil é proveniente de usinas hidrelétricas, sendo que as barragens do Rio Paraná e de outras bacias menores da região sudeste geram mais de 70% dessa energia. Assim, os principais impactos a peixes migratórios na Bacia do Rio Paraná são resultado da construção de represas. Após a depleção de estoques de grandes peixes migratórios em grandes áreas da Bacia do alto Paraná, especialmente em grandes tributários como Tietê e Paranapanema, muita atenção tem sido voltada para uma possível perda de variabilidade genética. Essa perda pode ser resultante da fragmentação de habitats, perda de locais de desova e especialmente devido à qualidade dos alevinos utilizados em peixamentos (Carosfeld *et al.*, 2003).

A Bacia do Rio Grande está incluída no alto Paraná. Sua área total corresponde a 161000 Km², dos quais 64% estão no estado de Minas Gerais, e os restantes no estado de São Paulo. As nascentes do Rio Grande estão na serra da Mantiqueira, na altitude de 1250 m e o rio percorre a extensão de 1301 km, com desnível de 960 m, até a junção com o rio Paranaíba. Antes de se juntar ao rio Paranaíba para formar o rio Paraná, o rio Grande faz a divisa do estado de São Paulo com o triângulo Mineiro (figura 1). É um típico rio de planalto, sendo que em grande parte corre encaixado entre gargantas profundas, com sucessivas corredeiras e cachoeiras (Paiva *et al.*, 2002).

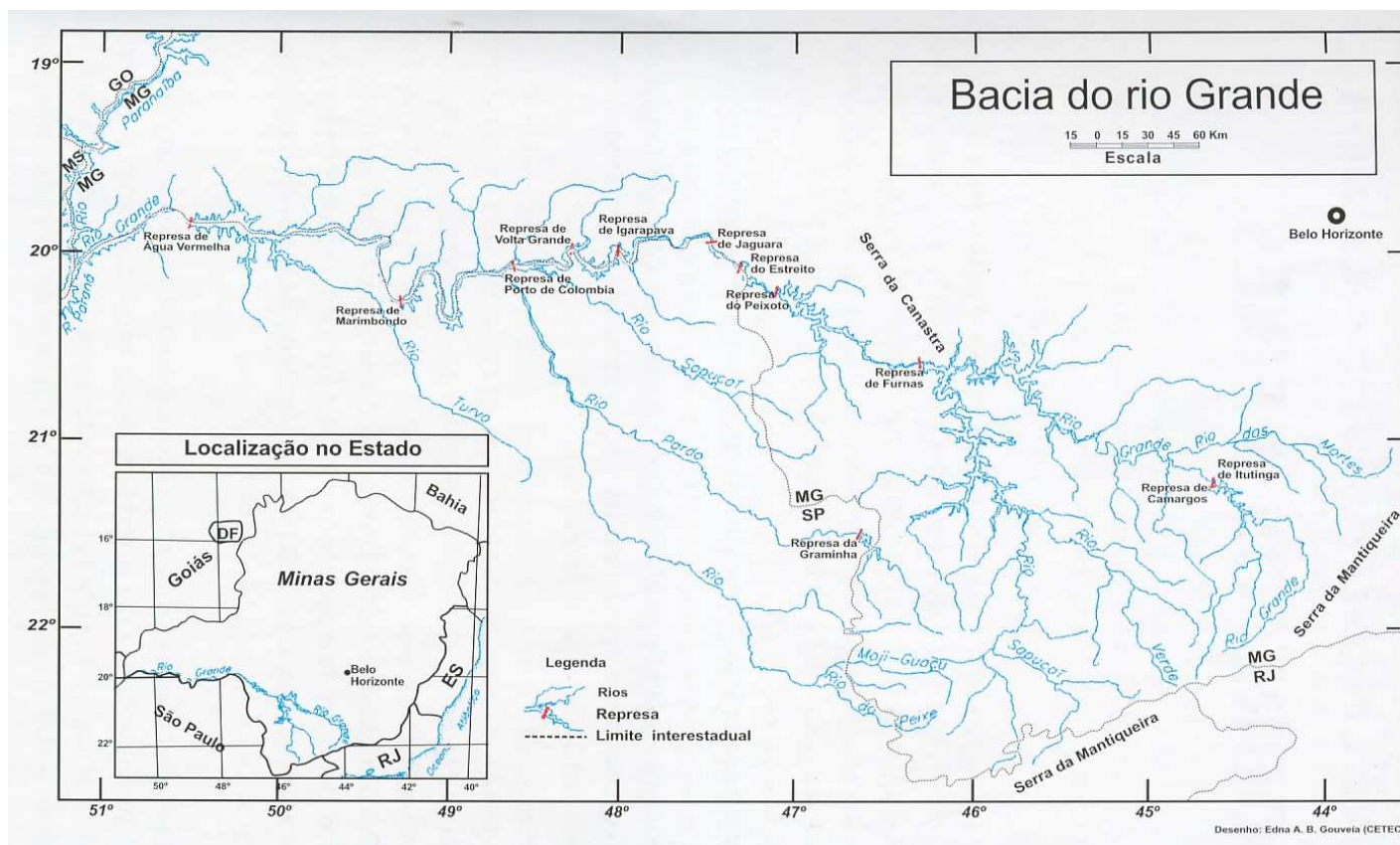


Fig. 1 - Mapa da Bacia do Rio Grande (Fonte: Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande).

A primeira barragem construída no rio Grande foi uma pequena usina em um braço da cachoeira do Marimbondo em 1930 (diferente da atual Usina Marimbondo). A partir dos anos 50, começaram as implantações de Usinas Hidrelétricas de grande porte ao longo de todo o rio (figuras 2 e 3). Atualmente no Rio Grande estão instaladas doze usinas hidrelétricas e uma em processo de licenciamento (tabela 1).

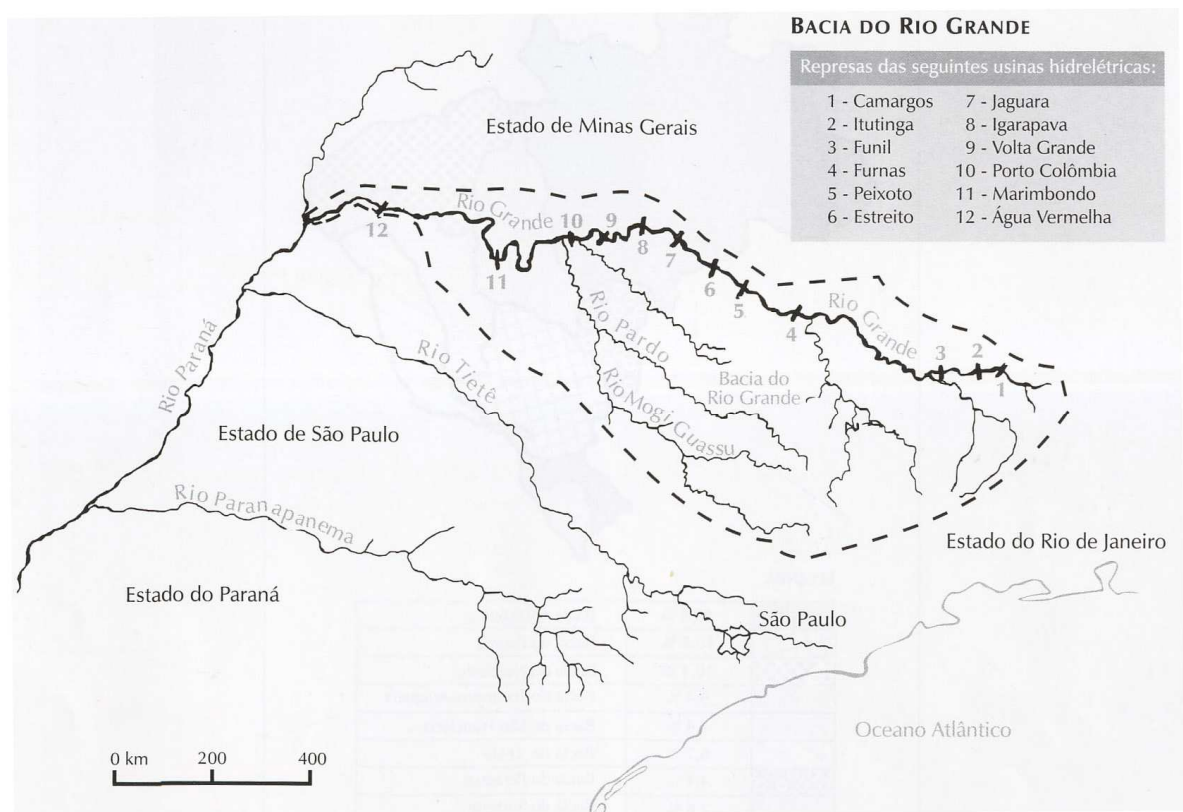


Fig. 2 - Localização das represas no rio Grande (Fonte: Paiva *et al.*, 2002)

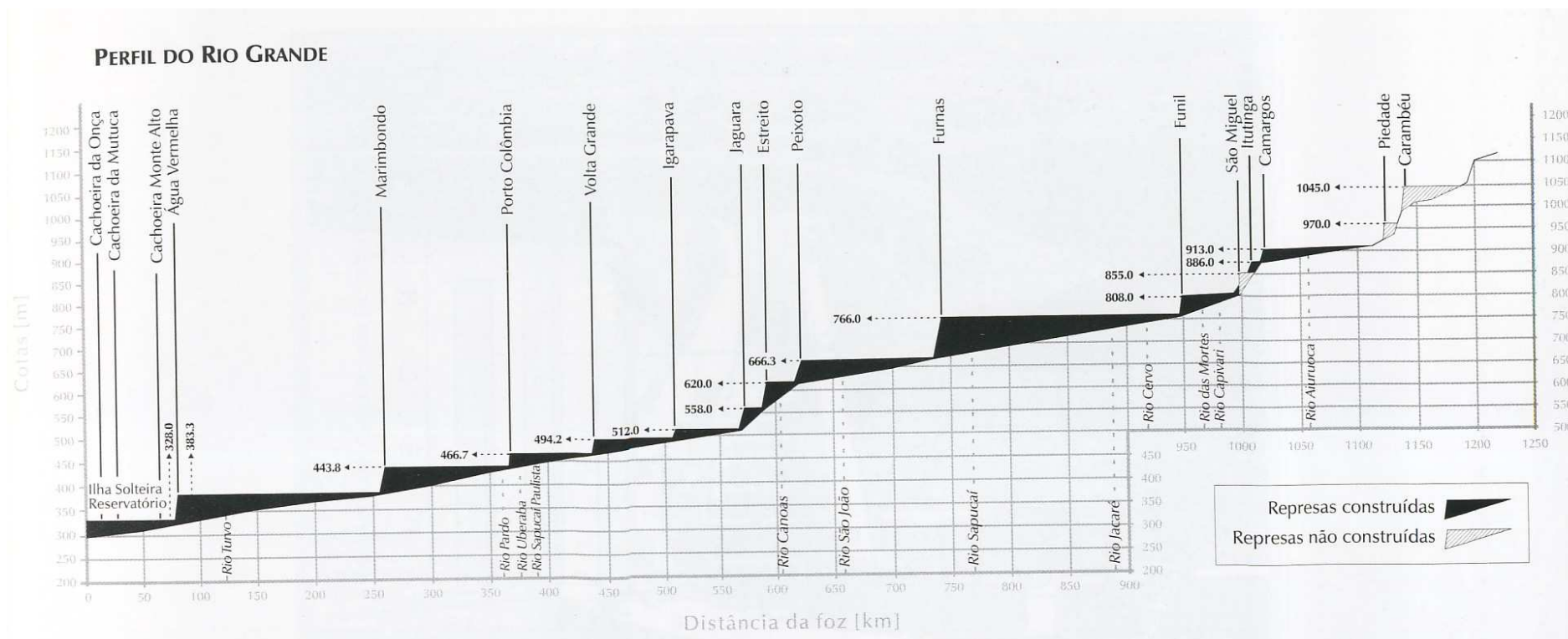


Fig. 3 - Perfil vertical do Rio Grande com suas represas hidrelétricas (Fonte: Paiva *et al.*, 2002)

Usina	Potência (kW)	Volume do reservatório (Mi m³)	Município(s)	Ano de Implementação
PCH Alto rio Grande	27.900	600	Piedade do rio Grande e Santana do Gambaréu – MG	Em fase de licenciamento
Camargos	46.000	792	Itutinga e Nazareno – MG	1958
Itutinga	52.000	11	Itutinga e Nazareno – MG	1955
Funil	180.000	343	Lavras e Perdões – MG	1969
Furnas	1.216.000	22.950	Alpinópolis – MG	1963
Peixoto (Marechal Mascarenhas de Moraes)	478.000	4.040	Ibiraci – MG	1956
Estreito (Luiz Carlos Barreto de Carvalho)	1.050.000	1.423	Rifaina – SP Sacramento – MG	1968
Jaguara	424.000	450	Rifaina – SP Sacramento – MG	1970
Igarapava	210.000	235	Conquista – MG Igarapava – SP	1998
Volta Grande	380.000	2.244	Conceição das Alagoas – MG Miguelópolis – SP	1973
Porto Colômbia	320.000	1.524	Guaíra – SP Planura – MG	1972
Marimbondo	1.440.000	6.150	Fronteira – MG Icém – SP	1975
Água Vermelha (José Ermírio de Moraes)	1.396.200	11.025	Indiaporã – SP Iturama – MG	1978

Tabela 1 - Usinas Hidrelétricas situadas no rio Grande, MG. (Fonte: Paiva *et al.*, 2002).

Em consequência da implantação das represas hidrelétricas, o curso do Rio Grande, atualmente, pode ser dividido nos seguintes trechos: Grande Superior – represas de Carambéu, Piedade, Camargos, Itutinga, São Miguel e Funil, Grande Médio – represas de Furnas, Peixoto, Estreito, Jaguará, Igarapava, Volta grande e Porto Colômbia, Grande Inferior – represas de Marimbondo e Água Vermelha.

A presença maciça de Usinas Hidrelétricas nesse rio alterou suas características originais de corredeiras caudalosas para um ambiente *quasi-lêntico*, transformando a maior parte do rio em uma série de lagos artificiais e em consequência tem havido modificações na composição e na abundância da fauna nativa de peixes (Godinho & Godinho, 1994).

Atualmente, apenas dois mecanismos de transposição de peixes estão ativos no rio Grande, a escada de peixes na Usina de Igarapava (implementada em 2000 - a maior do seu tipo no Brasil) e um elevador de peixes na Usina do Funil (implementado em 2003). A eficiência de ambos, no entanto, ainda está sendo avaliada e seguramente tem diferentes graus de sucesso em transpor diferentes espécies.

Na Bacia do Rio Grande ocorrem cerca de 160 espécies de peixes nativas, distribuídas por 21 famílias. Nas represas ocorrem 97 dessas espécies, compreendendo a 16 famílias. Assim, as represas abrigam 60,2% das espécies e 76,2% das famílias que compõe a ictiofauna do rio Grande (Paiva *et al.*, 2002).

O que se observa no rio Grande é que não existe uma distribuição homogênea de espécies dentro das represas. Assim, vinte e cinco espécies são encontradas em apenas duas represas enquanto três ocorrem em onze represas, havendo uma tendência decrescente de ocorrência de espécies a medida que se aumenta o número de represas (figura 4). Algumas das espécies nativas têm sido também introduzidas nas represas através de programas de peixamentos executados pelas empresas de energia elétrica (Paiva *et al.*, 2002).

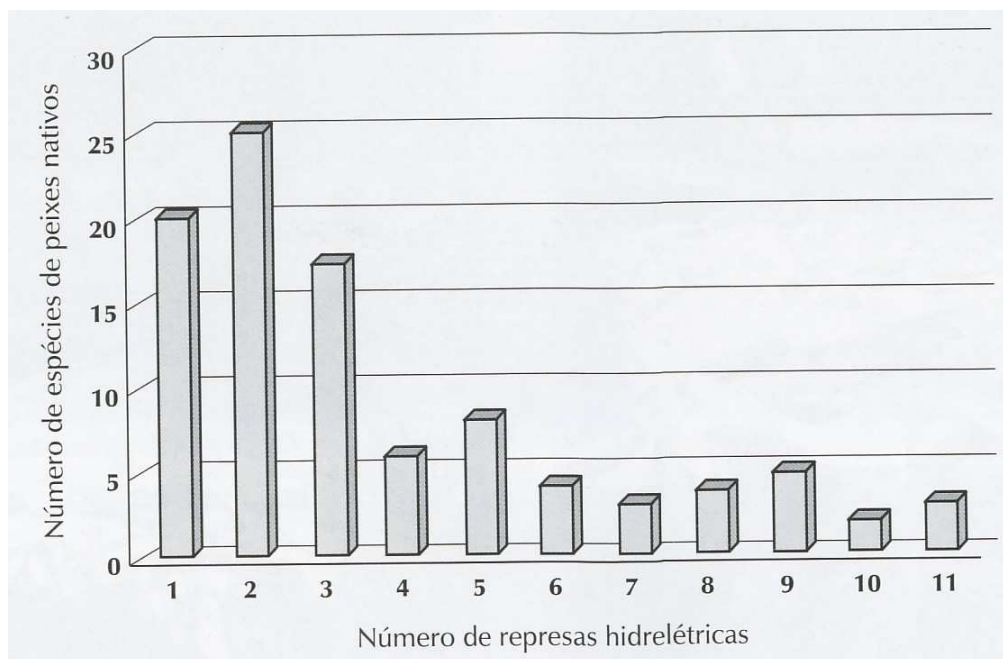


Fig. 4 - Relação entre a ocorrência de espécies de peixes nativos e represas hidrelétricas da bacia do Rio Grande (Fonte: Paiva *et al.*, 2002)

Os peixes nativos da Bacia do Rio Grande identificados até o momento pertencem à subclasse dos teleósteos, sendo dotados de esqueleto ósseo, um opérculo cobrindo as brânquias e de boca situada na extremidade anterior do corpo. A subclasse Teleostei se subdivide na Superordem Ostariophysi e Acanthopterygii. Na superordem Ostariophysi estão duas ordens que compreendem os principais peixes migratórios da bacia: a ordem Characiformes e a ordem Siluriformes. Os representantes da ordem Characiformes são peixes cobertos de escamas e abrangem quase um terço dos peixes de água doce sulamericanos. Os Siluriformes possuem o corpo liso, sem escamas, podendo apresentar placas ósseas ou escudos. Os bagres da subordem Siluroidei podem ser reconhecidos pelos barbilhões localizados de cada lado das maxilas superior e inferior (CEMIG/ CETEC, 2000).

Os peixes migratórios são os que possuem maior importância comercial, pois por realizarem grandes jornadas, apresentam maior porte. Além de serem importantes na pesca comercial pela carne apreciada, muitas espécies constituem a principal fonte de subsistência para populações ribeirinhas, sendo uma importante fonte de proteína.

1.3.1. A espécie *Pimelodus maculatus* (Lacépède, 1803)

A espécie migratória da Bacia do Rio Grande escolhida para o presente estudo - *Pimelodus maculatus* (figura 5) - pertence à ordem Siluriforme sendo conhecida popularmente como mandi ou mandi amarelo.



Fig. 5 - *Pimelodus maculatus* com cerca de 25 cm de comprimento.

É um peixe de médio porte, podendo atingir 40 cm de comprimento e pesar até 3 kg. Os barbilhões maxilares são longos, alcançando a região do pedúnculo caudal. O dorso é castanho escuro, com 3 a 4 séries longitudinais de manchas negras sobre o flanco. Como a maioria dos peixes de couro, habita o fundo dos ambientes aquáticos. O comprimento médio na primeira maturação sexual varia de 12,5 a 18 cm para machos e 12 a 19 cm para fêmeas. É um peixe onívoro, alimentando-se de larvas bentônicas de insetos, algas, moluscos, peixes e fragmentos de vegetais. Alimenta-se bem no inverno, acumulando gordura, que depois será utilizada na maturação das gônadas, para reprodução no verão. Desova de Novembro a Janeiro, com múltiplos eventos de desova durante esse período, uma característica incomum para espécies migratórias. Possui um dos menores oócitos entre espécies migratórias, o que pode estar relacionado ao sucesso dentro dos reservatórios, pois os ovos devem afundar menos rapidamente (Carolsfeld *et al.*, 2003). É importante na pesca, pois sua carne é muito apreciada.

É uma espécie de ampla distribuição sendo encontrada em várias bacias hidrográficas da América do Sul. Pode ser encontrada em altitudes desde 0m,

no delta platense (Buenos Aires), até cerca de 900 m na Bacia do Rio Paranaíba, um dos formadores do rio Paraná.

Anualmente, chegam a migrar cerca de 1.200 km/ano. Entre 1957 e 1962 foram transplantados mandis marcados, de Cachoeira de Emas, rio Mogi Guassu, para o “lar de alimentação” (médio rio Grande) em junho-julho. E durante os seis anos de estudos dos mandis marcados e transplantados, a partir de novembro, foram recapturados vários deles em Cachoeira de Emas, rio Mogi Guassu, ponto original de captura e de marcação, provando o retorno deles ao “lar de reprodução”, onde nasceram e a necessidade migratória. (Schubart, 1962).

Na Bacia do Rio Grande, ainda é encontrado com frequência, e ainda não está sujeito a programas de peixamento, sendo assim um bom modelo para análise da influência de barragens na estrutura populacional de peixes nessa bacia. Braga (2001) constatou que essa espécie era a segunda mais abundante no reservatório de Volta Grande no Rio Grande, no entanto esta não apresentou atividade reprodutiva na área, sendo esta utilizada somente para alimentação e crescimento.

Estudos realizados com o marcador RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) nos rios Tietê e Paranapanema (Almeida *et al.*, 2003) revelaram situações distintas da espécie nos dois rios. No rio Tietê as análises demonstraram que populações localizadas no alto, médio e baixo Tietê são bastante homogêneas, formando um único grupo. Embora existam nove hidrelétricas implantadas no rio, a presença de eclusas para permitir a navegação possa estar permitindo a migração dos peixes. Já no rio Paranapanema foi encontrada uma diferenciação entre as populações do alto do rio das populações do médio e baixo Paranapanema, havendo assim a presença de uma estruturação populacional. Embora haja seis hidrelétricas no rio, a diferenciação populacional pode estar relacionada também à presença de várias corredeiras existentes previamente, que já constituíam barreira ao fluxo gênico. Nesse caso, o mais apropriado seria a manutenção das diferenças entre as populações, pois pode haver adaptações locais que seriam perdidas caso houvesse tentativa de mistura entre essas populações.

Apesar de ser uma espécie importante na Bacia do Rio Grande e em outras bacias do país, outros estudos genéticos populacionais são escassos, presumidamente pela indisponibilidade de marcadores moleculares específicos para essa espécie.

1.4. Marcadores moleculares e microssatélites

Em grande parte, a relevância da genética da conservação recai sobre a premissa de que a variação de marcadores neutros reflete os níveis de variação genética adaptativa e deletéria (Kohn *et al.*, 2006). Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

O advento da biologia molecular permitiu que um vasto repertório de marcadores moleculares fossem desenvolvidos e aplicados a um grande número de questões biológicas, desde mapeamento à genética de populações, reconstruções filogenéticas, testes de paternidade e aplicações na área forense. Dentro da genética da conservação, esses marcadores tem sido úteis na resolução de problemas taxonômicos em espécies ameaçadas, no planejamento e monitoramento de programas de reprodução em cativeiro, no entendimento de sistemas de acasalamento, na detecção da estrutura geográfica da variabilidade genética, no manejo de fluxo gênico e no entendimento de fatores que contribuem para o *fitness* (Vrijenhoek, 1998).

Desde a década de 60 marcadores morfológicos e protéicos têm sido usados no estudo da variabilidade populacional em peixes. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, diversos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial. Dessa forma, os marcadores moleculares têm se transformado em ferramentas importantes no estudo e avaliação genética de populações de peixes selvagens e em cativeiro (Hiltsdorf & Krieger, 1998).

A escolha do marcador depende do objetivo do estudo e é importante que marcadores adequados sejam utilizados para que as análises sejam bem sucedidas. Assim, de acordo com o nível de diversidade a ser estudado é necessário um determinado nível de variabilidade do marcador. Geralmente são necessários níveis altos de variabilidade para estudos intra-populacionais como análise de parentesco, sistemas reprodutivos e história demográfica (Chenuil, 2006).

A partir da última década os microssatélites se tornaram um dos marcadores moleculares mais utilizados em análise populacional (Schlötterer, 2000). Também conhecidos como SSRs (*simple sequence repeats*) ou STRs (*simple tandem repeats*) são repetições em tandem de motivos de 2 a 6 pb, sendo encontrados em todos genomas procariotos e eucariotos analisados até o presente momento (Zane *et al.*, 2002). O mecanismo mutacional é conhecido como “*DNA replication slippage*”, e consiste no desalinhamento das duas fitas de DNA durante a replicação, levando a formação de alças nas fitas, o que pode gerar um aumento ou diminuição do número de repetições (Ellegren, 2004). Suas taxas de mutação são da ordem de 10^{-5} a 10^{-2} , duas a quatro vezes maiores do que o conhecido para as isoenzimas (Estoup *et al.*, 1998).

Assim, a maior vantagem desse marcador em relação a outros tipos de marcadores é o alto grau de polimorfismo, pois os *loci* são geralmente caracterizados por uma alta heterozigosidade (Ellegren, 2004, Schlötterer, 2000, Zane *et al.*, 2002). Em regiões codificantes a maioria das mutações é eliminada por seleção enquanto em regiões não codificantes, praticamente todas as mutações irão contribuir para o polimorfismo, a não ser que o *locus* esteja próximo a uma região codificante (Chenuil, 2006). Assim, comparado com marcadores isoenzimáticos, em que muitas espécies e populações não exibem mais de dois ou três alelos, os microssatélites podem apresentar mais do que dez alelos em um *locus* (Goldstein & Pollock, 1997).

Devido à alta sensibilidade da reação de PCR, os microssatélites também têm sido os marcadores mais utilizados na área forense e em estudos de amostragem não invasiva (Petit *et al.*, 2005). A extração enzimática para marcadores enzimáticos requer tecidos frescos ou congelados. Ao contrario, a extração de DNA, seguida por PCR, permite uma amostragem em campo fácil

e não muito invasiva para organismos relativamente grandes e também análise de organismos pequenos, pois uma quantidade pequena de tecido conservado em etanol pode ser utilizada (Chenuil, 2006).

Numa comparação entre microssatélites e isoenzimas realizadas por Estoup *et al.* (1998) em populações de *Salmo trutta*, os microssatélites detectaram diferenças genéticas não registradas pelas isoenzimas. A correlação entre distancia geográfica e genética foram significantes no caso dos microssatélites e não significantes no caso de isoenzimas. Isso sugere que marcadores genéticos mais polimórficos como os microssatélites são mais indicados para detectar isolamento por distância entre populações relacionadas.

Uma grande vantagem dos microssatélites em relação a outros tipos de marcadores como RAPD e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) é que os microssatélites são co-dominantes, ou seja, é possível identificar os dois alelos de um *locus*. Além disso, outra desvantagem do RAPD é a dificuldade de repetição dos resultados em alguns casos.

Quando comparado a marcadores mais recentes com os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), foi constatado que duas ou três vezes mais SNPs do que *loci* microssatélites são necessários para obter resultados comparáveis para o mapeamento ou identificação de indivíduos. Além disso, uma vez isolados, microssatélites acima de um determinado número de repetições são geralmente polimórficos. Já o isolamento de SNPs requer a identificação de sítios polimórficos em um conjunto de várias seqüências (Schlötterer, 2006).

Enquanto o DNA mitocondrial tem sido mais eficiente em estudos genealógicos e evolutivos de populações, os microssatélites têm se revelado melhores para análise de dinâmica e estrutura genética-populacional. Para uso em análises intraespecíficas, os microssatélites têm superado tanto marcadores mitocondriais como outros que eram aplicados correntemente. Entre 1758 artigos e *primers notes* publicados entre os anos 1992 a 2001 na revista *Molecular Ecology*, 42,5% estão indexados com marcadores microssatélites (Hansen *et al.*, 2001).

Assim, esses marcadores vêm sendo utilizados para as mais diversas finalidades como; resolução de problemas taxonômicos (Roques *et al.*, 1999), entendimento de sistemas de acasalamento (Jones & Avise, 1997, Taylor *et al.*, 2003) e determinação de estrutura populacional (Small *et al.*, 1998, Primmer *et al.*, 2006). Dessa forma, um grande número de ferramentas estatísticas vêm sendo desenvolvidas particularmente para a análise de microssatélites, e que podem detectar *bottlenecks*, estimar taxas de migração, como revelar o grau de parentesco entre indivíduos (Hansen *et al.*, 2001). Além disso, o desenvolvimento dos microssatélites também foi de grande relevância para a construção de mapas genéticos em um grande número de espécies (Petit *et al.*, 2005). Na área forense, tem sido proposto sua utilização para a identificação de animais comercializados ilegalmente e também para um rápido acesso a estudos de biodiversidade (DeSalle & Amato, 2004).

Esse tipo de marcador também pode ser útil para designar indivíduos como sendo de uma determinada população através de “*assignment tests*” (Hansen *et al.*, 2001, Heggenes & Roed, 2006), assim como avaliar sua composição e o grau de miscigenação com indivíduos não nativos ou provenientes de estoques (Bravington & Ward, 2004), detectando introgressão e hibridização (Taylor *et al.*, 2003). Nos “*assignment tests*” para cada indivíduo analisado é calculada a probabilidade de pertencer a cada uma das populações possíveis. O indivíduo é incluído na população da qual seu genótipo é mais provável de ser originado (Hansen *et al.*, 2001). Assim, num contexto de conservação, esses testes podem ser utilizados para avaliar o efeito de peixes de cativeiro em populações selvagens e determinar o quanto populações são nativas ou descendentes de estoques ou de imigrantes. Hansen *et al.* (2000), determinaram através de “*assignments tests*”, a origem de indivíduos em populações de trutas, e a ocorrência de hibridização entre peixes nativos e oriundos de estoques.

Além disso, marcadores microssatélites tem sido utilizados principalmente para análise da diversidade existente dentro e entre populações de uma determinada área (Taylor *et al.*, 2003, Primmer *et al.*, 2006), o que é extremamente importante para a definição de estratégias de manejo e conservação de espécies sujeitas a fragmentação.

Atualmente a principal limitação existente para o uso deste marcador é o seu isolamento, que demanda esforço técnico e tempo. O fato dos microssatélites serem encontrados principalmente em regiões não codificantes, onde as taxas de mutação são maiores que a de regiões codificantes impede o desenvolvimento de “*primers* universais” como pode ser feito com DNA mitocondrial (Zane *et al.*, 2002). Embora alguns estudos demonstrem a conservação de regiões flangeadoras para microssatélites entre espécies divergentes há milhões de anos (Rico *et al.*, 1996), o melhor é utilizar, quando possível, *loci* específicos para a espécie a ser estudada. Um alto grau de polimorfismo para um determinado *locus* em uma determinada espécie, muitas vezes não significa um alto polimorfismo desse *locus* em espécies relacionadas e principalmente em espécies mais distantes evolutivamente (Zane *et al.*, 2002).

O isolamento de regiões microssatélites para peixes migratórios de regiões afetadas por barragens terá importância fundamental para avaliação do impacto das barragens na estrutura genética das populações, orientando estratégias de manejo e conservação, assim como a necessidade de sistemas de transposição. Esses marcadores também serão úteis em programas de repovoamento, pois é de extrema importância o conhecimento da estrutura genética onde serão introduzidos os novos indivíduos, bem como da composição genética dos indivíduos utilizados para o repovoamento.

Além disso, o isolamento de regiões microssatélites para uma determinada espécie, permite como foi exposto acima, uma série de possibilidades de estudos para a espécie, podendo ser aplicados a vários outros contextos na conservação da espécie.

2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho foi o isolamento e caracterização de regiões microssatélites do peixe *Pimelodus maculatus*.

2.1. Objetivos específicos

1. Construir uma biblioteca genômica do peixe *Pimelodus maculatus*
2. Realizar a triagem de clones com microssatélites através de sondas radioativas
3. Realizar o seqüenciamento de clones positivos encontrados na varredura da biblioteca genômica de *Pimelodus maculatus*
4. Desenhar *primers* para a amplificação das regiões microssatélites
5. Padronizar a PCR para os *loci* microssatélites
6. Testar os *loci* microssatélites em indivíduos coletados no Rio Grande, avaliando sua utilidade para análises populacionais.

3. Metodologia

3.1. Construção da biblioteca genômica

3.1.1. Extração de DNA genômico

A extração de DNA genômico foi adaptada de Sambrook *et al.* (1989). Triturou-se aproximadamente 2 g de tecido muscular de um espécime de *Pimelodus maculatus* coletado no Rio Grande com a ajuda de gelo seco. Adicionou-se 10 ml de solução TEN9 (50 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 200 mM NaCl), 500 µl de SDS 20% e 500 µl de proteinase K (10 mg/ml). O material foi incubado a 37°C por cerca de 24 hs. Em seguida adicionou-se um volume de fenol pH entre 7,5 e 8, misturou-se manualmente por 40 min e centrifugou-se por 10 min a 3000 rpm. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e adicionou-se um volume de fenol – clorofórmio 24:1, misturou-se novamente por 40 min e centrifugou-se por 10 min a 3000 rpm. A fase aquosa foi transferida novamente para um novo tubo e o DNA foi precipitado com 1/5 de volume de acetato de amônio 10 M e um volume de isopraonol. O DNA obtido foi lavado com etanol 70% e deixado secar a temperatura ambiente. Após seco foi ressuspendido em 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA) e armazenado a -20°C.

3.1.2. Corte com enzima de restrição

Aproximadamente 10 µg do DNA genômico foram submetidos a um corte com a enzima de restrição Sau3AI (XGATC) de acordo com as instruções do fabricante (PROMEGA). Após a reação foi aplicado uma alíquota do DNA genômico extraído e uma alíquota correspondente do DNA genômico cortado com enzima de restrição em gel de agarose 0,8% para confirmação do corte. O gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/ ml por cerca de 30 minutos e visualizado na luz UV.

3.1.3. Purificação em coluna de *Sepharose S400*

O material cortado com a enzima de restrição foi aplicado em uma coluna de *Sepharose S400* (*Amersham Pharmacia*) para eliminação de fragmentos menores que 400pb. Esta etapa é importante, pois fragmentos maiores aumentam as chances de se obter regiões flanqueadoras de *primers* após o seqüenciamento. Inicialmente a coluna foi lavada com tampão de ligação da enzima T4 DNA ligase (66 mM Tris-HCl, 0,1 mM spermidina, 6,6 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 150 mM NaCl) para se obter um melhor rendimento na etapa de ligação ao vetor de clonagem. Após a lavagem a coluna foi centrifugada por 2 min a 2000 rpm para retirar o excesso de tampão de ligação. Em seguida o DNA genômico cortado foi adicionado no topo da coluna e centrifugou-se novamente por 2 min a 2000 rpm. 10 µl do material passado pela coluna foram aplicados em gel de agarose 1 % para confirmação da eliminação dos fragmentos menores que 400 pb.

3.1.4. Corte e defosforilação do vetor de clonagem

O vetor de clonagem utilizado para montagem da biblioteca - pUC18- foi previamente cortado com a enzima de restrição Bam HI (GXGATCC) e defosforilado em suas extremidades usando a enzima CIAP (*Calf Intestinal Alkaline Fosfatase*) ou Fosfatase Alcalina (PROMEGA) para evitar a ligação de suas extremidades. As reações foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante.

3.1.5. Ligação ao vetor de clonagem

Aproximadamente 100 ng do vetor pUC18 cortado e defosforilado foram ligados a 100 ng do DNA genômico purificado, utilizando a enzima T4 DNA Ligase (PROMEGA), seguindo as instruções do fabricante. A figura 6 ilustra o vetor utilizado, destacando o gene de resistência a ampicilina, o sítio múltiplo de clonagem dentro do gene *lacZ*.

3.1.7. Transformação

Cerca de 50 ng do produto da ligação entre o plasmídeo e o DNA genômico cortado foi incubado com 50 µl das células eletrocompetentes (*Escherichia coli* TOP 10) por 1 min no gelo. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada e em seguida submetida a um choque de 2 kVa no eletroporador *Micropulser* (BioRad). Após o choque adicionou-se 1 ml de meio 2XYT (5 g NaCl, 16 g bactotripton, 10 g de extrato de levedura, água destilada q.s.p. 1L, pH 7,5) e o material foi incubado a 37°C por 1 hora. Após a incubação, o material foi distribuído em placas de meio LB ágar (5 g de NaCl; 10 g de peptona; 5 g de extrato de levedura, 20 g de ágar, água destilada q.s.p. 1L; pH 7,5) com ampicilina (100 µg/ml). As placas foram incubadas a 37°C por aproximadamente 18 hs.

3.1.8. Seleção pelo sistema IPTG/ X-gal

Também foram adicionados às placas utilizadas para o crescimento das colônias transformantes 30 µl de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactopiranosídeo) a 50 mg/ml e 4 µl de IPTG (Isopropil-beta-D-Tiogalactopiranosídeo) a 0,6 mM.

O IPTG induz a produção da enzima β -galactosidase pelo gene *lacZ* nos clones sem inserto. Essa enzima cliva o substrato X-gal resultando na liberação de galactose e um produto insolúvel de coloração azul. Os clones com inserto não produzem enzima, pois o DNA exógeno é inserido no meio do gene *lacZ* e as colônias permanecem brancas.

3.1.9. Confirmação da presença e do tamanho dos insertos nas colônias brancas

Antes da coleta em massa dos clones (colônias) para a construção da biblioteca, algumas colônias brancas foram coletadas aleatoriamente das placas e foi realizada PCR com os *primers* M13 (F: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3' e R: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3') do vetor pUC 18 para confirmação da presença e averiguação do tamanho médio dos insertos. O volume final da reação foi de 25 µl, com as seguintes quantidades de reagentes por reação: 25 a 50 ng de DNA molde, tampão de PCR IB (*Phoneutria*) 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), 100 µM de dNTPs, 5 pMoles de cada *primer*, 1U de Taq polimerase (*Phoneutria*). As reações foram realizadas no termociclador PTC-100 (*MJResearch*) com os seguintes passos: 94°C (3 min), 94°C (30s), 58°C (30s), 72°C (30s), seguido por 25 ciclos de 94°C (30s), 54 °C (30s), 72°C (30s) e finalmente 72°C (5 min). 10 µl de cada reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% por cerca de 1 hora a 80mA. Logo após o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) e visualizado em luz UV.

3.1.10. Coleta dos clones

Após a realização de várias transformações para a produção de uma biblioteca representativa, as colônias brancas foram coletadas em microtubos de 1,5 ml contendo 1ml de meio 2XYT com ampicilina (100 µg/ml). A coleta foi realizada da seguinte forma: 1042 tubos contendo 1 clone, 639 tubos com 2 clones cada e 2894 tubos com 3 clones cada, gerando um total de 11002 clones coletados. Esse procedimento de coleta de mais de um clone (colônia) por tubo foi realizado com a finalidade de minimizar o número de *preps* a serem realizadas. Assim, as amostras contendo mais de um clone que apresentassem sinal positivo na hibridização teriam que ser novamente transformadas para separação dos clones antes do seqüenciamento.

3.1.11. Extração de plasmídeo por lise alcalina (*prep*)

Após a coleta nos microtubos os clones foram incubados a 37°C por 18 hs para crescimento das colônias. Logo após, os tubos foram centrifugados a 8000 rpm por 5 min e o meio de cultura descartado. O pellet foi ressuspensionado com 10 µl de solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0). Em seguida foi adicionado 10 µl de solução II (NaOH 0.2N, SDS 1%) e logo após mais 10 µl de solução III (acetato de potássio 3M, 11,5% ácido acético glacial). O material foi mantido em gelo por 5 minutos e centrifugado a 13000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 2 volumes de etanol 100%. Centrifugou-se novamente a 13000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. O precipitado foi lavado com 100 µl de etanol 70% e deixado secar a temperatura ambiente (Sambrook *et al.*, 1989).

3.2. Triagem com sonda radioativa

3.2.1. Aplicação dos clones em membranas de *nylon*

Após a extração plasmidial, o material de cada microtubo foi ressuspensionado em 20 µl de TE com 0,06% de Azul de Bromofenol e foi aplicado 0,2 µl desse material em membranas de *nylon* (BioRad) de 11 x 14 cm. As amostras de cada microtubo foram dispostas em *spots* na membrana de acordo com a figura 7, com a ajuda de moldes confeccionados em lâmina de PVC. O DNA aplicado foi fixado na membrana através do uso de aparelho *Crosslinker* que emite radiação ultravioleta de alta intensidade. As linhas da membrana foram nomeadas de A a Z e as colunas numeradas de 1 a 35, correspondendo a um total de 910 *spots*. Assim, foi aplicado em cada membrana um total de 910 amostras, cada uma correspondente ao material de um microtubo. Para facilitar a organização, nessa etapa cada amostra foi designada como sendo um clone, mesmo que contivesse dois ou três clones por tubo.

O clone correspondente a cada amostra aplicada foi nomeado pelo número da membrana, seguido da letra indicativa da posição da linha ocupada, seguido pelo número da coluna ocupada pelo *spot* onde foi aplicado (e.g. 3E15 para o clone na terceira membrana, na fileira “E” e na coluna 15).

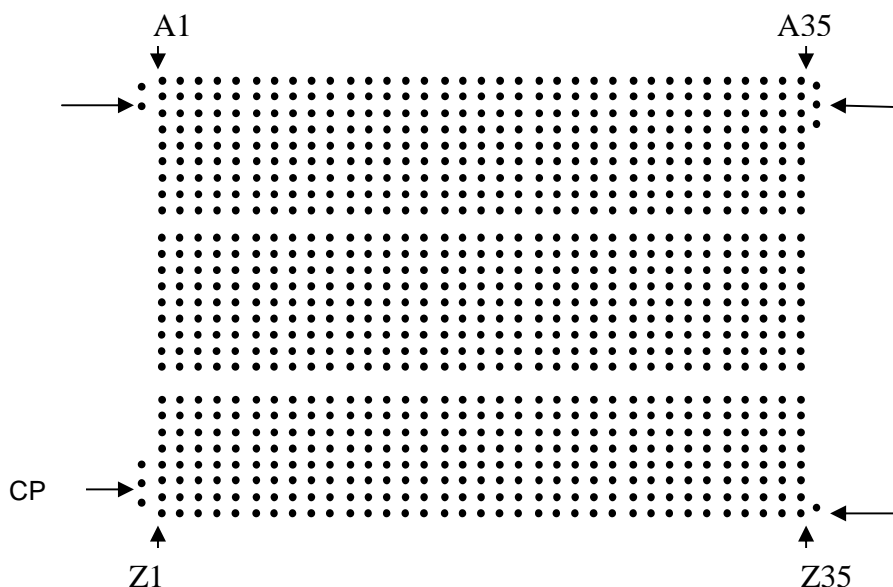


Fig. 7 - Esquema da aplicação dos clones nas membranas de nylon. Cada *spot* corresponde ao local da aplicação de um clone. As setas pequenas indicam como foram dispostos os clones. As setas grandes indicam pontos laterais marcados a caneta que serviram de orientação para análise das membranas. Nos 3 pontos indicados pela seta CP foram aplicados controles positivos.

3.2.2. Confeção das sondas radioativas

Para a confecção das sondas foram encomendados oligonucleotídeos com os seguintes tipos de motivos microssatélites: GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT e TA, com 16 pb cada um. Alguns desses motivos foram escolhidos com base na literatura e outros foram escolhidos aleatoriamente de forma a cobrir o máximo de possibilidades de diferentes de repetições. Os oligonucleotídeos foram então marcados em sua extremidade 5' com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (10 mCi/mL - GE Healthcare). A marcação radioativa das sondas foi feita com o kit “5' End Labelling kit” (GE Healthcare), segundo instruções do fabricante.

3.2.3. Hibridização com as sondas radioativas e exposição ao filme de raio-x

A reação de hibridização dos oligonucleotídeos marcados radioativamente com os plasmídeos da DNA da biblioteca genômica aplicados na membrana de *nylon* foi precedida por uma pré-hibridização, onde se realizou o bloqueio da membrana utilizando-se a solução BLOTTO (leite em pó desnatado 5%) e SSC 6X (NaCl 0,9 M, Citrato de Sódio 0,09 M). A pré-hibridização foi realizada a 50°C durante 14hs. Em seguida as membranas foram lavadas com SSC 6X e SDS 0,1% por duas vezes. A hibridização foi feita a 45°C também por 14hs com uma concentração de 5 ng de cada sonda/ ml de solução. Após esse período foram realizadas lavagens de controle de estringência, utilizando-se concentrações, cada vez mais fracas de sal (SSC 5x, 3x, 2x) e aumentando-se a temperatura (50°C, 55°C e 60°C). Adaptado de Sambrook *et al.* (1989).

Depois de cada lavagem, que durava 30 min, as membranas foram expostas a filmes radiográficos de 35 x 43 cm (*Kodak T-Mat G/RA*) dentro de cassetes apropriados, por dois períodos de exposição diferentes (4 hs e 24 hs) a -80°C.

3.2.4. Revelação das autoradiografias

As autoradiografias foram reveladas em câmara escura, onde o filme era retirado do cassete e colocado primeiramente em 1 litro de solução fixadora (*Kodak*) por 60 s e em seguida em 1 litro de solução reveladora (*Kodak*) por cerca de 30 s. As soluções foram previamente diluídas segundo instruções do fabricante. Logo após a revelação, o filme foi lavado em água corrente e seco a temperatura ambiente.

3.2.5. Análise das autoradiografias

As autoradiografias foram sobrepostas aos moldes utilizados para a aplicação dos clones nas membranas e para a identificação dos clones que apresentaram sinais positivos (hibridizaram com as sondas de microssatélites utilizadas). As diferentes estringências e tempos de exposição serviram para controlar com maior segurança a atribuição de sinais positivos. Os clones com sinal positivo foram novamente aplicados em duplicata em membranas de *nylon* e submetidos a um novo ensaio de hibridização para confirmação dos resultados.

3.3. Preparação para o seqüenciamento

3.3.1. Nova transformação dos clones positivos

Os clones positivos escolhidos para o seqüenciamento foram submetidos a uma nova transformação com o objetivo de se obter maior quantidade de material para o seqüenciamento. As transformações foram realizadas com *Escherichia coli* TOP 10 quimiocompetentes. Em um microtubo de 1,5 ml adicionou-se 10 µl de 5X KCM (0.5 M KCl, 0,15 M CaCl₂ e 0.25 M MgCl₂), 38 µl de água deionizada estéril, 2 µl do clone a ser transformado e 50 µl das células quimiocompetentes. O material foi incubado no gelo por 20 min e a 37°C por 5 min. Em seguida adicionou-se 1 ml de meio 2XYT, incubando-se a 37°C por 60 min. O material foi plaqueado em meio LB ágar com ampicilina (100 µg/ml) e deixado a 37°C por 16hrs ([/www.stanford.edu/group/bakerlab/Cells.htm](http://www.stanford.edu/group/bakerlab/Cells.htm)).

Após esse período os clones foram coletados das placas, inoculados em 10 ml de LB caldo em tubos falcon de 50 ml e incubados a 37°C a 150 rpm por 16hrs. A extração do DNA plasmidial foi realizada pelo protocolo de lise alcalina segundo Sambrook *et al.* (1989).

3.3.2. Purificação dos plasmídeos

Previamente ao seqüenciamento, o DNA plasmidial extraído foi purificado em colunas com resina *Sephacryl S1000* (Amersham Pharmacia). Adicionou-se 200 µl de *Sephacryl S1000* a cada coluna e centrifugou-se a 8000 rpm durante 1 min para a retirada do tampão da resina. Logo após o DNA plasmidial extraído (50 µl) foi aplicado no topo da coluna e centrifugou-se novamente a 8000 rpm por 1 min. O DNA purificado foi armazenado a -20°C.

3.3.3. PCR dos clones positivos retransformados e purificados

Após a purificação dos plasmídeos foi realizada uma PCR de todos os clones positivos retransformados para se averiguar o tamanho do inserto de cada um. O conhecimento do tamanho dos insertos é importante para sabermos após o seqüenciamento se o clone foi completamente seqüenciado. As reações foram realizadas em um volume final de 25 µl, com as seguintes quantidades de reagentes por reação: 50 ng de DNA molde, tampão de PCR IB (*Phoneutria*) 1X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100, 1,5 mM MgCl₂), 100 µM de dNTPs, 5 pmoles de *primer* M13 *foward* (-20) e *reverse*, 1U de *Taq* polimerase (*Phoneutria*). As reações foram realizadas no termociclador PTC-100 (*MJResearch*) com os seguintes passos: 94°C (3 min), 94°C (30s), 58°C (30s), 72°C (30s), seguido por 25 ciclos de 94 °C (30s), 54°C (30s), 72°C (30s) e finalmente 72° (5 min). 10 µl de cada reação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1% por cerca de 1 hora, a 80mA. Logo após o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ ml) e visualizado em luz UV. As imagens dos géis corados com brometo de etídio foram capturadas com câmera fotográfica digital através do programa *Doc-It System* (UVP).

3.4. Seqüenciamento

3.4.1. Seqüenciamento dos clones positivos retransformados e purificados

O seqüenciamento dos clones positivos retransformados foi realizado utilizando-se *ET Kits* (*DYEnamic ET Terminator Dye* - GE Healthcare). Cada reação foi preparada com cerca de 150 ng de DNA plasmidial, 5 pmoles de *primer* M13 (-20) ou M13 *reverse*, 4 µl de *ET Kit* e água deionizada estéril para volume final de 10 µl. As reações foram realizadas em placas de 96 poços no termociclador *Mastercycle Eppendorf* com o seguinte programa: 30 ciclos de 95°C (20s), 55°C (15s), 60°C (80s).

Após a reação de PCR, o DNA amplificado foi precipitado adicionando-se 1 µl de acetato de amônio e 30 µl de etanol absoluto a cada um dos poços. As placas foram então submetidas ao vortex e incubadas por 20 min a temperatura ambiente e protegidas da luminosidade. Após a incubação, a placa foi centrifugada por 45 min a 4000 rpm e o sobrenadante foi descartado. A cada um dos poços foram adicionados 150 µl de etanol 70%, sendo o sobrenadante descartado após a centrifugação da placa por 10 min a 4000 rpm. Após 20 min de repouso para total evaporação do álcool o pellet obtido foi ressuspendido em 10 µl de *loading buffer* (GE Healthcare) e submetidos a eletroforese no seqüenciador automático de 96 capilares *MegaBace* (Amersham).

As seqüências foram verificadas para a qualidade da leitura por meio do programa PHRED.

3.4.2. Consenso de seqüências

Os clones mais promissores em relação ao conteúdo de microssatélites foram submetidos a mais de um seqüenciamento com os *primers* M13 *foward* e *reverse* para uma maior segurança em relação à qualidade das seqüências. Em seguida, esses clones foram analisados com os programas PHRAP e CONSED, que alinham todas as seqüências disponíveis de cada clone gerando

um *contig* (seqüência final) com a qualidade de cada base e também retiram as partes da seqüência correspondentes ao vetor de clonagem.

3.5. Desenho dos *primers*

As melhores seqüências com microssatélites obtidas após o consenso foram utilizadas para o desenho de *primers* para PCR com auxílio do programa PRIMER3 (Rozen & Skaletsky, 1998). Esse programa analisa as regiões flanqueadoras do microssatélite, localizando os melhores pares de *primers* para a reação de PCR.

3.6. Padronização da PCR

As reações de PCR foram padronizadas alterando-se as quantidades de *primer* e de Taq polimerase, em um volume final de 25 µl. O DNA molde utilizado para padronizar as reações foi o DNA do indivíduo utilizado na clonagem dos microssatélites. A tabela abaixo resume as quantidades usadas na padronização da PCR.

Reagentes	Quantidade
Água bidestilada	q.s.p 25 µl
Tampão IVB (<i>Phoneutria</i>) 5X	5,0 µl
dNTPs 1mM	2,5 µl
Primers <i>foward</i> e <i>reverse</i> (20pmol /µl) cada	0,5 ou 0,25 µl de cada
Taq polimerase (<i>Phoneutria</i>) 5U/ µl	0,1 ou 0,05 µl
DNA molde (~30ng/ µl)	1 µl

Tabela 2 - Quantidades de reagentes utilizados na padronização da PCR

Também foram testados diferentes temperaturas de anelamento dos *primers* e diferentes números de ciclos de PCR. As reações foram realizadas no termociclador *Mastercycle Eppendorf*. O programa padrão utilizado foi seguinte:

- 1) 94°C (2 min)
- 2) 94°(30s)
- 3) Temperatura de anelamento
- 4) 72°C (30s)
- 5) Número de ciclos
- 6) 72°C (4 min)
- 7) 4°C

No passo 3, foram testados as temperaturas de 54°C, 56°C, 58°C, 60°C e 62°C. No passo 5, foram testados 24, 29 ou 34 ciclo s para os passos de 2 a 4.

3.7. Coleta de indivíduos e extração de DNA de nadadeiras

O DNA de 48 indivíduos coletados na represa de Igarapava (Rio Grande) foi extraído de um pedaço de 1cm² de nadadeira através do método Chelex - Proteinase K (Nelson *et al.*,1998). Os animais foram coletados por meio de redes de espera e tarrafas de diferentes tamanhos de malha e devolvidos ao rio após a retirada de um pedaço da nadadeira caudal. No laboratório, o pedaço de nadadeira de cada indivíduo foi colocado em um microtubo de 0,5 ml, onde se acrescentou 200 µl de tampão de extração (5% de resina Chelex 100 e 0,1% de Tween-20). Em seguida foram adicionados 2 µl de Proteinase K (10 mg/ml) e incubou-se a 60°C por 15 minutos e então, a 95°C por 5 minutos. O material foi então armazenado a -20°C .

3.8. Eletroforese em gel de poliacrilamida

Após a realização da PCR para 48 indivíduos em cada *locus* com reação padronizada, 1 µl de tampão de amostra 10X (0,25% de azul de bromofenol, 1,5% de glicerol e 0,25% de xileno cianol) juntamente com 9 µl de cada produto de PCR dos indivíduos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 10 % (25 ml de acrilamida 40%, 0,7 ml de persulfato de amônio 10%, 70 µl de TEMED, TAE 2X q.s.p 100 ml). A eletroforese foi realizada utilizando um sistema vertical, tamponada com TAE 2X, com uma corrente de 150 V, por cerca de 16 a 18 hrs dependendo do *locus*.

Os géis foram corados da seguinte forma: primeiramente adicionou-se 300 ml de solução I (10% de etanol, ácido acético 0,5%) deixando 15 min, logo em seguida retirou-se a solução I e acrescentou-se 300 ml da solução II (nitrato de prata 0,15%) novamente por 15 min. Retirou-se a solução II, o gel foi lavado com água destilada e então se adicionou 300 ml de solução III (hidróxido de sódio 3% , formaldeído 0,1%) até a revelação.

Soluções:

Acrilamida 40% (19:1): 38g de acrilamida, 2g de Bis-acrilamida, água destilada q.s.p 100ml.

TAE - Tampão Tris-Acetato-EDTA (solução estoque 50x): 242 g de Tris, 57,1 ml de ácido acético glacial e 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0, água destilada q.s.p 1 litro.

3.9. Genotipagem

Os alelos foram identificados com base em seus pesos moleculares que foram calculados a partir do padrão de peso molecular de 25 pb (*Invitrogen*) e de um indivíduo controle aplicado em cada gel, utilizando-se o programa LabImage (www.labimage.net).

3.10. Cálculo das frequências alélicas, H_e e H_o e desvios do EHW

As frequências alélicas, heterozigosidades esperadas (H_e) e observadas (H_o) e desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para os *loci* analisados foram calculados utilizando o programa GENEPOP v.3.4 (Raymond & Rousset, 1995) disponível no site <http://genepop.curtin.edu.au/>.

4. Resultados

4.1. Construção da biblioteca genômica

4.1.1. Extração e corte do DNA genômico com enzima de restrição e purificação em coluna de *Sepharose*

A extração de DNA resultou em um DNA genômico de alto peso molecular, que foi cortado satisfatoriamente pela enzima de restrição como mostra à figura 8a. A purificação do DNA genômico também eliminou praticamente todos os fragmentos menores que 400pb (figura 8b)

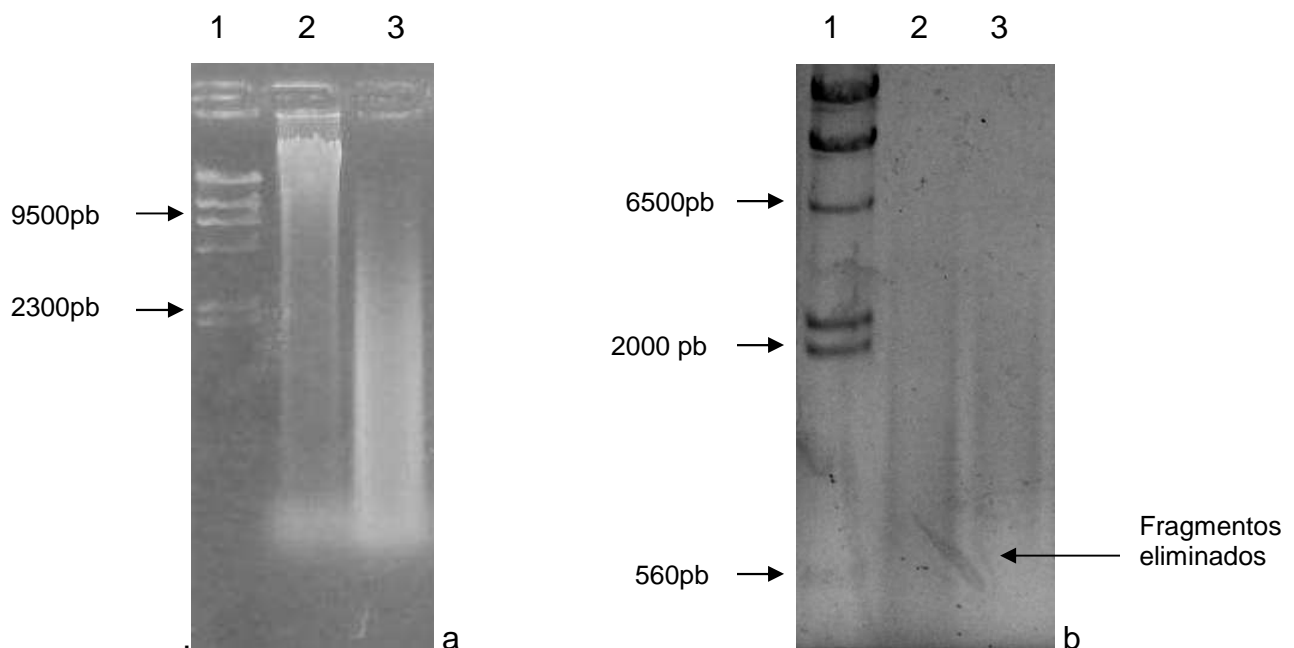


Fig. 8- a) Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio. Canaletas: 1- padrão de peso molecular (λ Hind III). 2- DNA genômico de *Pimelodus maculatus* extraído por fenol- clorofórmio 3-DNA genômico de *Pimelodus maculatus* cortado com a enzima Sau3AI. b) gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaletas: 1- padrão de peso molecular (λ Hind III) 2-DNA genômico de *Pimelodus maculatus* cortado com a enzima Sau3AI 3-DNA genômico de *Pimelodus maculatus* cortado com a enzima Sau3AI purificado em coluna de Sepharose S400. Essa imagem teve as cores invertidas para melhor visualização.

4.1.2. Defosforilação do vetor de clonagem e ligação ao DNA cortado purificado

A defosforilação do vetor aumentou a eficiência de ligação com o DNA cortado purificado como mostra a figura 9, pois reduziu as ligações entre as extremidades do próprio vetor.

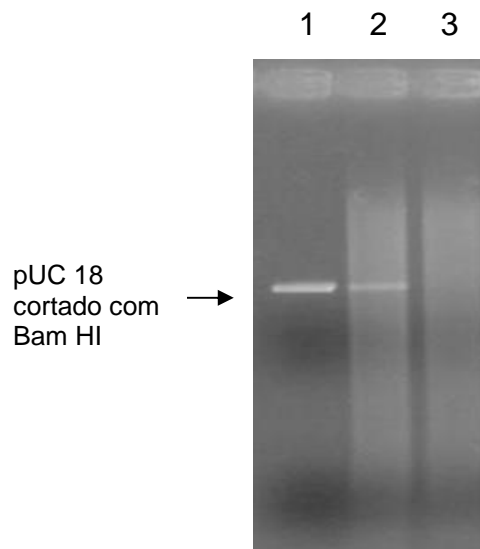


Fig. 9 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaletas: 1- puC 18 cortado com Bam HI 2-pUC18 cortado defosforilado ligado ao DNA genômico cortado e purificado de *P. maculatus*. 3- pUC18 cortado não-defosforilado ligado ao DNA genômico cortado e purificado de *P. maculatus*

4.1.3. Transformação e seleção pelo sistema IPTG - X-gal

As transformações tiveram um rendimento de aproximadamente 50%, que corresponde ao número de colônias brancas observado nas placas (figura 10). As colônias brancas presumidamente contêm insertos do DNA genômico de *P. maculatus*.

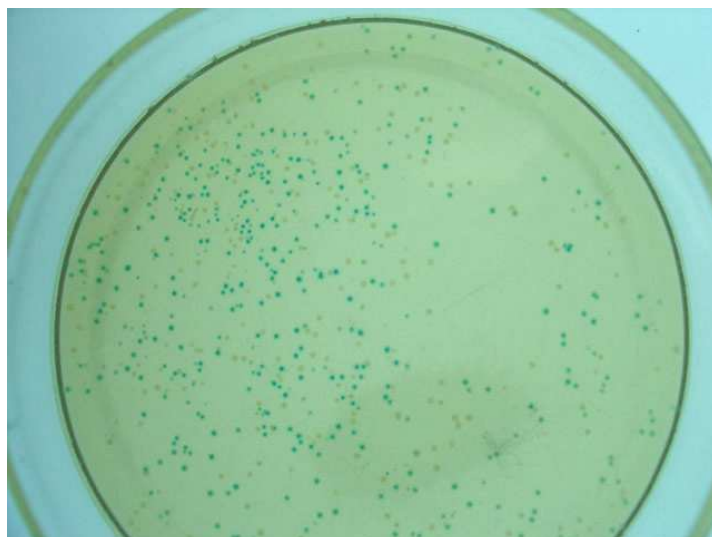


Fig. 10 - Placa de Petri com meio de cultura LB-ágar com ampicilina e sistema de seleção de clones IPTG/X-gal, mostrando colônias resultantes da transformação.

4.1.4. Confirmação da presença e tamanho dos insertos

Praticamente todas as colônias brancas amplificaram na reação de PCR com o *primer* M13, confirmando a presença de inserto de tamanhos variáveis e com maioria maior que 400pb, comprovando novamente a eficiência da purificação do DNA na coluna (figura 11).

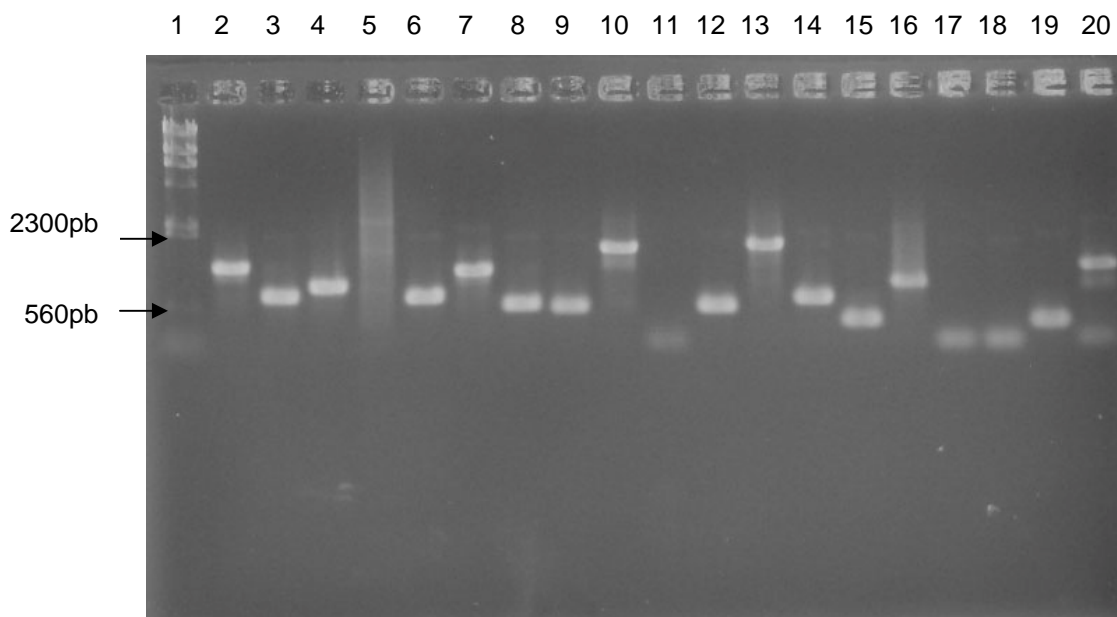


Fig. 11 - Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaletas 1-padrão de peso molecular (λ Hind III). 2 a 20 - PCR de colônias brancas coletadas aleatoriamente. A canaleta 5 corresponde a um clone sem inserto.

4.2. Hibridização com sondas radioativas

Como foram coletadas mais de uma colônia (clone) por tubo para a maioria da biblioteca genômica, a quantidade de clones positivos não pode ser determinada precisamente, mas é de no mínimo 522 (4,7%) clones positivos, já que tubos com mais de uma colônia podem conter mais de um clone com sinal positivo. A tabela 3 mostra o número de *spots* aplicados nas membranas e a porcentagem de sinais positivos por classe de número de clones (colônias)/tubo.

	1 clone/tubo	2 clones/tubo	3 clones/tubo	Total
<i>Spots</i> na membrana	1.042	639	2894	4575
Total de clones	1.042	1.278	8682	11002
<i>Spots</i> com sinal positivo	118	47	357	522
% de sinais positivos	11,3	3,6	4,1	4,7

Tabela 3 - Resultado da triagem com sondas radioativas na biblioteca de *P. maculatus*

As figuras 12, 13 e 14 mostram o resultado da hibridização com as sondas radioativas sob diferentes graus de estringência na membrana 1 onde foram aplicados somente clones individuais. Como esperado, à medida que se aumenta o grau de estringência a quantidade de clones positivos diminui. A figura 15 mostra o resultado do segundo ensaio de hibridização para confirmação dos clones positivos. Nesse segundo ensaio os clones foram aplicados em duplicata e como fica evidenciado na figura, a maioria se tratava realmente de clones positivos.

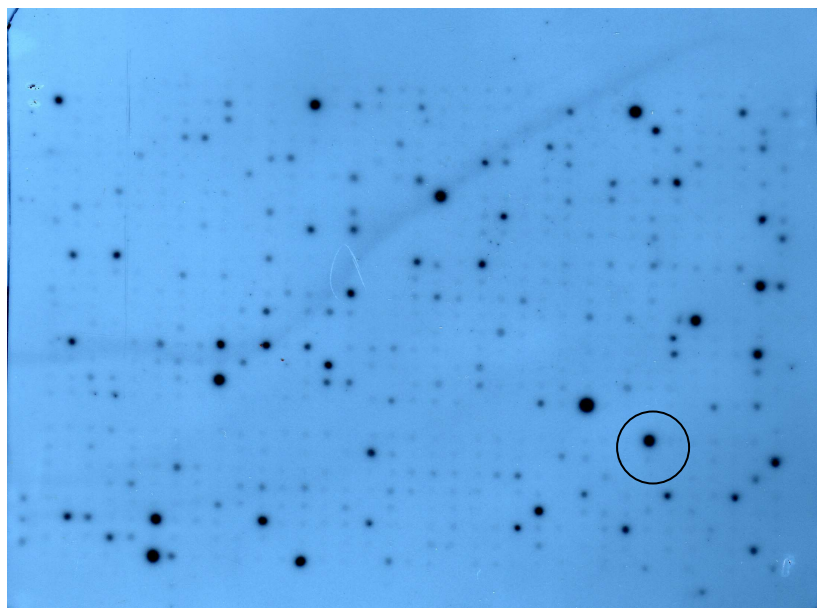


Fig. 12 - Autoradiografia da membrana 1 lavada com SSC 5X a 50°C, exposta ao filme por 24hrs. O clone 1S29 foi destacado com um círculo como exemplo de clone positivo.

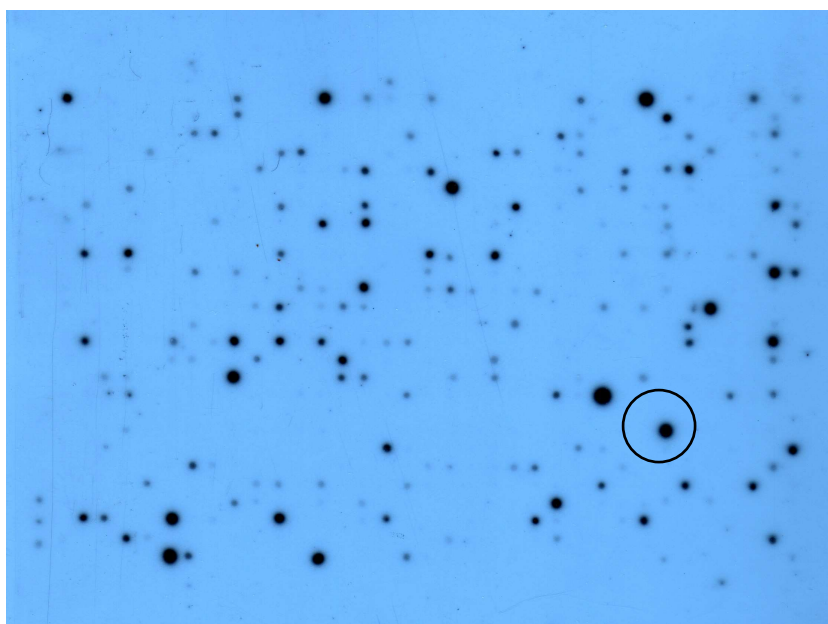


Fig. 13 - Autoradiografia da membrana 1 lavada com SSC 3X a 55°C, exposta ao filme por 24hrs. Clone circulado - 1S29

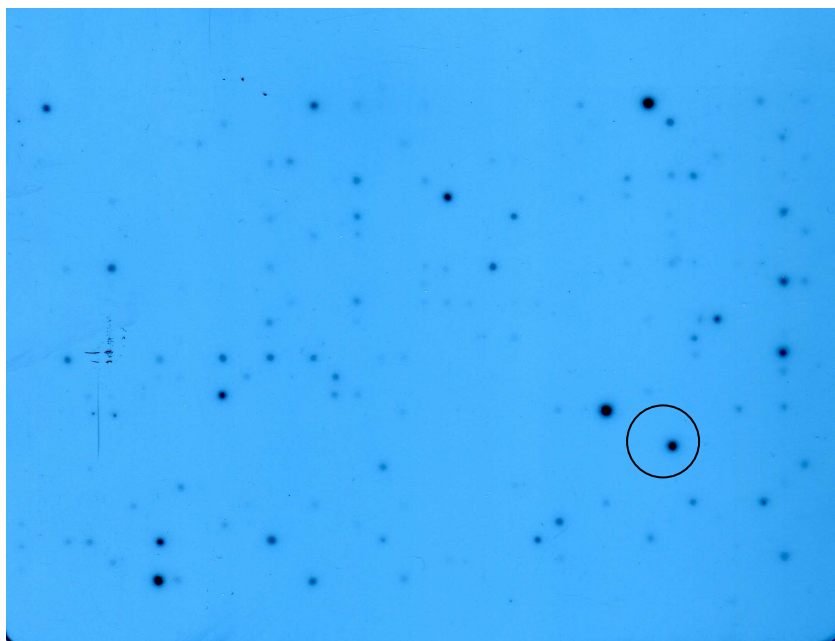


Fig. 14 - Autoradiografia da membrana 1 lavada com SSC 2X a 60°C, exposta ao filme por 24hrs. Clone circulado - 1S29

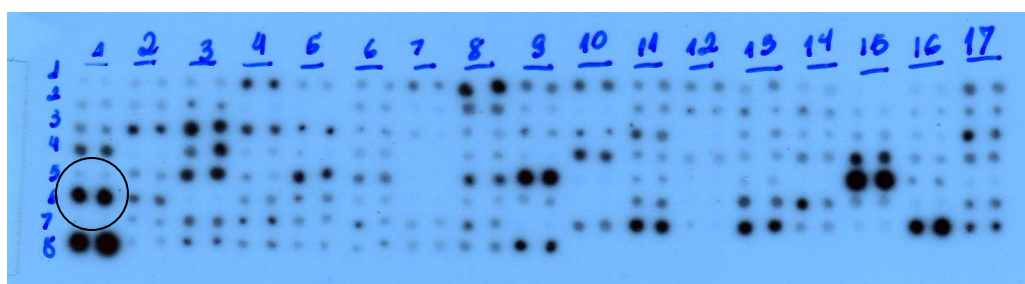


Fig. 15 - Autoradiografia de membrana de confirmação de clones positivos lavada com SSC 3X a 55°C, exposta ao filme por 24hrs. Clone circulado - 1S29

4.3. Seqüenciamento dos clones com sinal positivo

Devido a grande quantidade de clones positivos encontrados, foram seqüenciados apenas os 118 clones com sinal positivo coletados individualmente e destes 82 (69%) continham pelo menos um tipo de seqüência microssatélite. A maioria destas consistia em repetições de dinucleotídeos como motivo GT/CA. Onze clones (12%) apresentaram repetições de trinucleotídeos e oito clones (10%) apresentaram repetições de tetranucleotídeos. Normalmente as seqüências com tri e tetranucleotídeos eram compostas de repetições curtas, geralmente menos que 10 repetições. A tabela 4 resume os resultados do seqüenciamento dos clones positivos.

Motivo	Nº de clones
GT/CA	48
CT/GA	19
TA/AT	5
GTA	2
GAA	2
GTG	1
CTT	2
TAA	4
CCTT	1
GTAG	2
CAGA	2
TATC	3

Tabela 4 - Motivos microssatélites encontrados e quantidade de clones correspondentes. Como alguns clones continham mais de um motivo há um número maior que o total de clones analisados.

Do total de seqüências obtido, grande parte era de repetições imperfeitas (interrompidas) e/ou continham mais de uma repetição. Foi realizado o consenso das seqüências de 55 clones e destas 43 resultaram em *contigs*.

4.4. Desenho dos *primers*

Das seqüências submetidas a consenso que resultaram em *contigs*, 15 foram escolhidas para o desenho de *primers* para PCR. Essas seqüências, além de apresentarem uma boa qualidade de seqüenciamento, continham motivos microssatélites com um número razoável de repetições. Quanto maior o número de repetições maior a taxa de mutação e presumidamente maior o polimorfismo em um *locus* (Schölotterer, 2006, Petit *et al.*, 2005). Além disso, também foi analisado se as regiões flangeadoras eram favoráveis para a confecção dos *primers*.

Embora regiões com tri e tetranucleotídeos sejam preferencialmente escolhidas pela maior facilidade de análise, não obtivemos seqüências desse tipo com número de repetições razoável, ou regiões flangeadoras adequadas, de forma que foram selecionadas apenas 3 seqüências com repetições de trinucleotídeos para desenho de *primers*.

Os clones escolhidos para o desenho dos *primers*, juntamente com o tipo de repetição, as seqüências de cada *primer* e o tamanho do produto de PCR estão na tabela 5.

<i>Locus</i> (nº do clone)	Tipo de repetição	<i>Primers</i>	Tamanho do produto
1B1	(CA) ₂₇ (TA) ₂ TT(TA) ₂₅	F: 5' CCTGGAGCATTGAGGTGAG 3' R: 5' AACACTAGGGGCAGAGAGCA 3'	248 pb
1E21	(GT) ₆ GA(GT) ₅ (GA) ₁₆	F: 5' CAGGTTTTCTGGCACCTCAT 3' R: 5' TCACCTGAGACGGAGAGACA 3'	217 pb
1F15	(GT) ₃₈ (GA) ₆	F: 5' TACAGCAACCCACAGAGGTG 3' R: 5'GATGAGACGAAACGACATGG 3'	244 pb
1J4	(GT) ₃₁	F: 5' TGGTCTCTTTCCTTCCGTGA 3' R: 5' TAGGGGTGGGTAAATGTGG 3'	179 pb
1K7	(TAA) ₁₂	F: 5' CTTTTCTGGAGGGACTGACTG 3' R: 5' GCAAAAGTCTTAGGCACCCTAT3'	264 pb
1K34	(TTA) ₄ T(TTA) ₁₁	F: 5' GCAGCATTTACAGGCATTCA 3' R: 5' TGGCTGTGTGTGTACGTTCTT 3'	316 pb
1N30	(GT) ₂₁	F: 5' CCTGTCTTCCTAACCCACCA 3' R: 5' CAATCTCCACCCAAAACCTCC 3'	221 pb
1O2	(GT) ₂₃	F: 5' AAGACCGGTTCCCTAACCCAC 3' R: 5' TCGATGCGAGATATGGACTC 3'	179 pb
1O9	(GT) ₄₈ (GA) ₇ CA(GA) ₂₈	F: 5' GTCTGGTTTCTCCGCATTTG 3' R: 5' TCAGCTTGAGAGGCACACAG 3'	264 pb
1O13	(GT) ₂₇	F: 5' ATTCTCTGGCATTGGTTTGG 3' R: 5'TATCGCACTCTCCGACCAG 3'	168 pb
1S29	(CA) ₂₇	F: 5' TGAGGCTTTCTGGAGGAGAC 3' R: 5' CCTCAGCCTTGGTTGTGATT 3'	154 pb
1T35	(TAA) ₃ CAATAA(CAA) ₆ (TAA) ₆	F: 5' GCCTGGTGCTATCACAAACAT 3' R: 5' ACTGATTGTCCTGTCTCCTTC 3'	173 pb
1V13	(GT) ₂₇	F: 5' ACGCGATTCAAGACTGTGAG 3' R: 5' CTGACGAAAAGGGCTCTCTG 3'	206 pb
1V26	(GT) ₁₅ (GA) ₁₇	F: 5' TGCCATGTTTGCTCTACCTG 3' R: 5' CCCCCAGTAGAAATGAGCTG 3'	216 pb
1X3	(GT) ₂₁	F: 5'CGACTTGACCAAATCCTGCT 3' R: 5'GGCGAATCGTAAACATCGTC 3'	184 pb

Tabela 5 - Lista dos clones utilizados para desenho dos *primers*

>1B1 - 770pb

>1E21-496pb

>1F15-654pb

>1J4-696pb

57

AGTTTTACTGAGTGTCTTTTCTGGAGGGACTGACTGTCACACTTACTACTTCCTTTATTAAGTTTTTCCT
TAAATCTTGTTTAAATAGGTTGTTTTTTTTTACTGACAAACATTTTTTCTGTAACA**TAAATAATAATAATAA**
TAAATTATTATTATTATTATTATTATTATAATTTTGGAAATCTAAAATGATTTGTACTGACTCAATAATGTA
GAAGTCATAAAATAAATGTCTATAACAAAAGTTGTACTAAACACAATATAGGGTGCCTAAGACTTTTGC
CAGTACTGTGTGTGTA
TA

[illegible][illegible][illegible]

[illegible][illegible][illegible]

GCTCGGTATGAAGGCTGGGCAATCAATACTTCGCAAAGCCAGTATGGAAAAATGAGAGGTATAAATAGTAA
AGCCAACCAGGAAGTAAATGCAGCCACACCCTGTGAGGAGAGAGGTGAAAGGTTAGAAGGCGGGGCTAGA
GGAGCGAGACAAAGGAGTGGGCGTGGCCTGCCGGTTTCTAACACTGAGAAGTTTAAAGTATTTTATATTG
AAATAAAATGGCTAAAAACACACAATACAATCACCATTAAAGTGGCTAATCAAAAAATGGACGGCAGGCA
TAACCTAGCTTACTAACAGTGAACTAGCTAGCCCATAGATGGTGTGTGTTTTATAGAGACAAAATGGAA
GTGAAATACAGGCCAGAATATCAGGAATGTCAATGTTTACCTCAGAATTGTTTATAAAAGTCTAATAAAA
GTTTATTTTGACTTTATTAAAGGTAATTTTGACCAGCAATGTACACATTGATTCTAATAGCCAGTCTGTG
ATTTATAAAAAACATTTGAATAATAATAAAAAACACACAATATAGTCATTGTTTAAATGGCCAAAGCTGTGT
GAACACTGTTTGCTCGGCAACCAGAAAACCGCGCACTCATAACCTAGCTTACTAACAAATTGAACTAGCTA
GCACGTGCCGGCATGCATTTTATTGTGAGCATTTTCTAGATGTTTTTAATTCTTGAACGCTCAATCTGTG
CTAAAAATAATATAAAACAAACGAATCACTAGAACTAGCTTACTATAAACGAATCCTTGTGTCAGACGTATT
GCACATTTTATTAGCCATTTAATTAATAAAAACTACGAAAACAGGCAGGAAATAAATTTTTTTAGAAATG
TCAGTAAATGCTTGACTAAAATTAGAATGTAATTACAAATAAAAAATGTAATGTTAATGGATGCTCATGG

>1V13- 439pb

>1V26 - 927pb

$>1 \times 3 - 831 \text{ pb}$

4.5. Padronização da PCR

Dos quinze pares de *primers* testados, foram escolhidos seis *loci* cuja padronização da PCR foi mais satisfatória (tabela 6) até o momento para a análise de polimorfismo. Apenas os *primers* para dois *loci* (102 e 1K7) produziram um número exagerado de bandas inespecíficas e foram descartados. Os sete *loci* restantes ainda necessitarão de mais etapas de padronização para que sejam utilizados em análises populacionais.

Lócus	Quantidade de <i>primer</i>	Quantidade de Taq	Temp. de anelamento	Número de ciclos da PCR
1E21	10 pmoles	0,25 U	60°C	30
1J4	10 pmoles	0,5 U	58°C	30
1O13	10 pmoles	0,5 U	56 °C	35
1T35	5 pmoles	0,25U	60 °C	30
1V26	10 pmoles	0,25U	60°C	30
1X3	5 pmoles	0,25U	60°C	30

Tabela 6 - Lista dos *loci* com amplificação satisfatória e condições de PCR utilizadas.

As figuras 16, 17 e 18 ilustram o teste de 3 desses *loci* em indivíduos coletados na represa de Igarapava (Rio Grande).

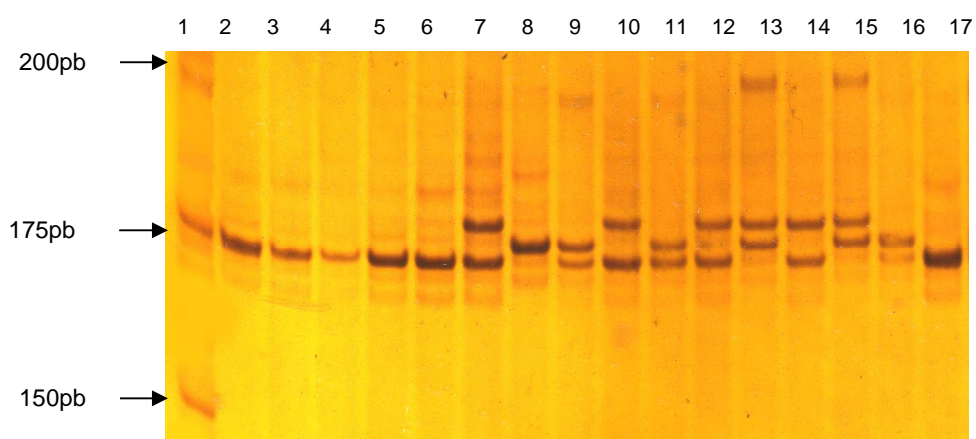


Fig. 16 - Gel de acrilamida 10% corado com nitrato de prata com amplificação do locus 1T35. Canaletas: 1 - padrão de peso molecular de 25 pb. 2 a 17 - indivíduos da represa de Igarapava.

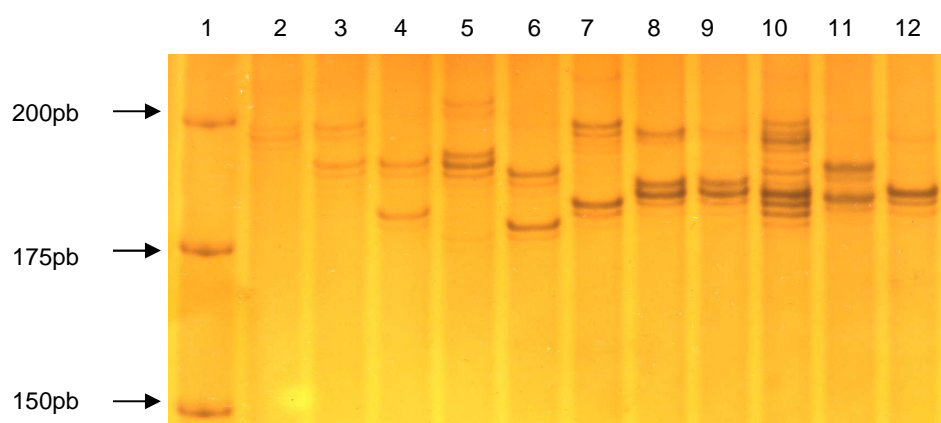


Fig. 17 - Gel de acrilamida 10% corado com nitrato de prata com amplificação do locus 1X3. Canaletas: 1 - padrão de peso molecular de 25 pb. 2 a 12 - indivíduos da represa de Igarapava.

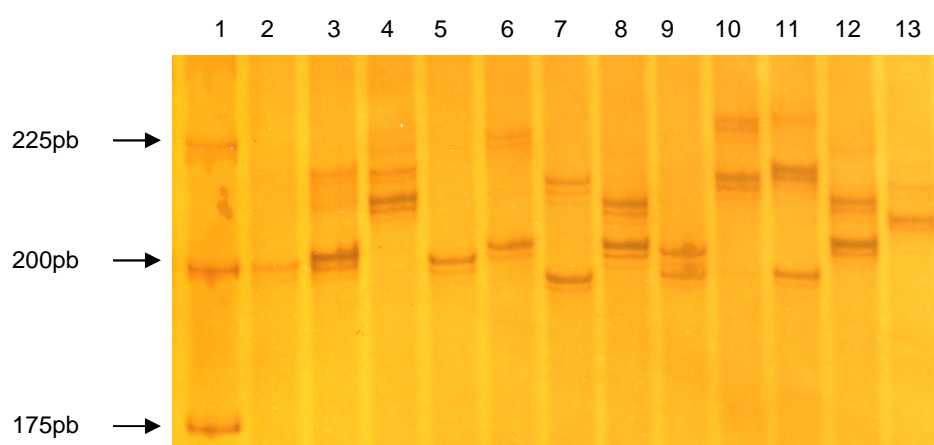


Fig. 18 - Gel de acrilamida 10% corado com nitrato de prata com amplificação do locus 1V26. Canaletas: 1 - padrão de peso molecular de 25 pb. 2 a 18 - indivíduos da represa de Igarapava.

4.6. Cálculo das freqüências alélicas, H_e e H_o e desvios do EHW

A partir da análise dos géis de acrilamida foram calculados para cada um dos seis *loci* selecionados, o tamanho dos alelos em pb, as freqüências alélicas, a H_o (heterozigosidade observada) e H_e (heterozigosidade esperada), assim como possíveis desvios do EHW (Equilíbrio de Hard-Weinberg). As tabelas 7 e 8 resumem o resultado das análises pelos programas LabImage e Genepop v.3.4. Como alguns indivíduos não amplificaram em alguns *loci*, o número de indivíduos analisados foi diferente para cada *locus*.

Locus	n	Nº de alelos	Variação de tamanho (pb)	H_o	H_e	Desvio do EHW
1E21	42	11	196 - 242	0,78	0,78	NS
1J4	42	14	152 - 188	0,88	0,95	NS
1O13	40	12	134 - 200	0,89	0,91	NS
1V26	45	10	198 - 236	0,71	0,89	P < 0,01
1T35	48	3	173 - 182	0,50	0,53	NS
1X3	46	7	178 - 204	0,78	0,82	NS

Tabela 7 - Resultado da análise pelos programas LabImage e Genepop. n: número de indivíduos analisados em cada *locus*. NS: não significante

Locus	Alelos													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1T35	0,573	0,260	0,160	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1X3	0,096	0,181	0,277	0,213	0,064	0,128	0,043	-	-	-	-	-	-	-
1V26	0,100	0,200	0,111	0,144	0,078	0,111	0,089	0,067	0,033	0,067	-	-	-	-
1E21	0,036	0,190	0,393	0,131	0,048	0,071	0,018	0,024	0,060	0,012	0,018	-	-	-
1O13	0,083	0,056	0,014	0,069	0,069	0,097	0,181	0,097	0,153	0,056	0,111	0,014		
1J4	0,048	0,012	0,036	0,107	0,060	0,095	0,262	0,083	0,131	0,060	0,036	0,024	0,016	0,032

Tabela 8 - Freqüências alélicas de cada *locus* calculadas pelo programa Genepop.

5. Discussão

Neste trabalho foi construída uma biblioteca genômica do peixe *Pimelodus maculatus* com posterior triagem com sondas radioativas para o isolamento de regiões microssatélites. Apesar de essa metodologia ser considerada como tradicional e bastante trabalhosa, já que nos últimos anos vem sendo substituída por construção de bibliotecas enriquecidas (Zane *et al.*, 2002), esse trabalho prova que seus resultados são bastante compensadores. A principal vantagem da metodologia tradicional é a utilização de bibliotecas primárias, onde não há etapas de amplificação de clones, diminuindo assim, as chances de obtenção de seqüências repetidas ao final do trabalho.

A porcentagem de clones positivos obtidos na biblioteca (4,7%) é semelhante ao descrito na literatura para o grupo dos peixes (Zane *et al.*, 2002). Esse número pode ser ainda maior, considerando que alguns clones correspondiam a mais de uma colônia. A estratégia de coleta de mais de uma colônia por tubo se mostrou desnecessária nesse caso, pois devido a grande quantidade de clones positivos, decidimos trabalhar apenas com os clones coletados individualmente. Assim, para a construção de novas bibliotecas o mais adequado seja reduzir o número total de clones a serem gerados e coletá-los todos de forma individual.

Pela grande quantidade de clones com regiões microssatélites encontrados, esse trabalho também reforça dados de que o grupo dos peixes é um dos grupos taxonômicos com maior freqüência de seqüências do tipo (Goldstein & Schlötterer, 1999, Zane *et al.* 2002). As diferenças de freqüência de seqüências microssatélites encontradas em diferentes grupos taxonômicos ainda não está bem esclarecida, mas a principal teoria é de que a eficiência do sistema de reparo para diferentes espécies influenciaria diretamente a ocorrência de seqüências desse tipo (Goldstein *et al.*, 1999).

Foram identificadas ao todo, 82 clones com seqüências microssatélites, sendo que a maior parte consistia em repetições de dinucleotídeos. A freqüência do tipo (di, tri ou tetranucleotídeos) e do motivo de repetições varia muito entre os grupos taxonômicos, mas de maneira geral se têm notado que dinucleotídeos são mais abundantes em muitos genomas (Katti *et al.*, 2001), Nesse trabalho apesar de serem utilizadas sondas com vários motivos

diferentes de repetições foram encontradas poucas seqüências com tri ou tetranucleotídeos o que sugere que os dinucleotídeos sejam realmente muito mais abundantes no genoma dessa espécie. Além disso, as maiores repetições consistiam de dinucleotídeos, sendo que dos tri e tetranucleotídeos encontrados nenhum apresentou mais que 20 repetições. Provavelmente, unidades mais curtas de repetições como os dinucleotídeos permitam uma maior taxa de *slippage* por comprimento de DNA, sendo mais instáveis (Katti *et al.*, 2001).

Gueyas *et al.* (2006), isolaram regiões microsatélites de uma espécie de carpa (*Hypophthalmichthys molitrix*), utilizando tanto biblioteca convencional quanto enriquecida. Aproximadamente 1 a 2% dos clones da biblioteca convencional tiveram sinais positivos na hibridização de sondas radioativas com di e trinucleotídeos. Foram seqüenciados 72 clones e destes 64 geraram seqüências analisáveis. Seqüências do tipo GT predominaram (51) sendo o restante do tipo GA. Não foi encontrada nenhuma repetição de trinucleotídeos. Aproximadamente 50% das seqüências eram perfeitas e pares de *primers* puderam ser desenhados para 24 *loci*, com 16 sendo amplificados com sucesso.

Esse, assim como a maioria dos trabalhos envolvendo o isolamento de seqüências microsatélites em diferentes espécies provou que a obtenção de boas seqüências para análise populacional é um trabalho de paciência, onde se parte de uma enorme quantidade de possibilidades, que vão sendo reduzidas à medida que são vencidas as várias etapas do trabalho. Assim, no presente trabalho, de 118 clones seqüenciados, apenas 15 foram escolhidos para serem utilizados, sendo que seis puderam ser analisados até o momento. Normalmente são raros os trabalhos de isolamento de seqüências microsatélites onde se obtém mais de 20 *loci* utilizáveis em análise populacional. Além disso, não há um consenso de quantos *loci* são necessários para uma análise populacional eficiente, mas atualmente a maioria das pesquisas tem envolvido de 5 a 15 *loci* diferentes.

Uma característica importante para a obtenção de *loci* analisáveis é a região flanqueadora da seqüência possuir uma composição de bases que permitam o desenho de *primers* eficientes na amplificação. Esta é outra etapa limitante para escolha das seqüências, pois muitas apesar de possuírem boas

repetições, não possuem seqüências flanqueadoras suficientes ou com boa composição de bases. Esse aspecto foi levado em consideração nesse trabalho, onde tivemos o cuidado de eliminar seqüências menores de 400 pb na construção da biblioteca.

A padronização da amplificação dos *loci* é outra etapa crucial para que seja realizada uma análise correta dos dados. Fatores como temperatura de anelamento, número de ciclos e quantidade de reagentes na PCR devem ser calibrados de forma a permitir a visualização de bandas mais distintas possíveis. Essa etapa de padronização envolve um esforço considerável e demanda certo tempo até que todas as reações estejam corretamente calibradas. Um fenômeno comum na amplificação de microssatélites é o aparecimento de bandas fantasmas menores ("*stutter bands*") que o alelo verdadeiro por uma ou eventualmente duas repetições produzidas pelo "derrapamento" da DNA polimerase (Chenuil, 2006). Esses fragmentos são geralmente menos intensos do que o alelo verdadeiro, mas mesmo assim, a quantidade de DNA polimerase foi reduzida nas amplificações com o objetivo de se reduzir o aparecimento dessas "*stutter bands*".

Outro aspecto importante é a distinção dos alelos de diferentes tamanhos no gel. Atualmente, a maioria dos trabalhos envolvendo microssatélites tem utilizado o seqüenciador automático para esse fim. No entanto a análise no seqüenciador necessita de software específico, do qual não dispomos até o momento. Embora géis desnaturantes sejam comumente utilizados para microssatélites, géis não desnaturantes podem ser mais convenientes para análises que demandem menos precisão, pois DNA dupla fita migra muito mais rapidamente do que DNA fita simples, podendo utilizar aparatos menores, sendo mais fáceis de manipular durante a revelação (Chenuil, 2006). Assim, nesse trabalho optamos por utilizar gel não desnaturante, já que o objetivo principal era apenas testar o polimorfismo dos *loci* dentro de uma população. No entanto, para análises populacionais mais refinadas, identificação individual e de paternidade o ideal é a utilização de sistemas mais precisos.

Para cada *locus* foram realizadas análises de H_o , H_e e desvios do EHW, que são necessários para avaliar se os *loci* são ou não adequados para análise populacional. Assim, altas heterozigosidades esperadas e observadas servem como estimativa de um alto polimorfismo do *locus* na população analisada e são um indicativo de sua adequação para análise populacional. Dos seis *loci* analisados, cinco apresentaram um número grande de alelos e altas heterozigosidades observadas ($> 0,7$), sugerindo sua adequação para análises populacionais. Apenas o *locus* 1V26, apresentou desvio significativo do EHW ($P < 0,01$), que pode ser devido à presença de alelos nulos (que não amplificam na reação) ou de fatores demográficos. O teste desse *locus* em outras populações talvez poderá ajudar a esclarecer o motivo do desvio.

Perspectivas

O trabalho realizado até aqui pode ser considerado apenas a etapa inicial de um estudo que apresenta ainda uma série de possibilidades. A biblioteca genômica construída para a espécie poderá servir não só como fonte para a busca de mais regiões microssatélites, mas para a identificação de outras regiões no genoma da espécie permitindo estudos comparativos e evolutivos.

Ainda existem cerca de 400 clones positivos que contém duas ou três clones (colônias) por tubo, que podem ser separados através de uma nova transformação e seqüenciados para a busca de mais regiões microssatélites. Dos clones seqüenciados, muitos podem ser submetidos a novos seqüenciamentos na tentativa de se obter seqüências mais completas e seguras para o desenho de *primers*. Além disso, há varias seqüências que podem ser utilizadas prontamente para o desenho de novos *primers* e que não foram selecionadas previamente por questões de ordem prática. Das quinze seqüências escolhidas, sete ainda podem ter a padronização da PCR aperfeiçoada e juntamente com as seis que já foram testadas fornecerão um número razoável de *loci* para análises populacionais da espécie.

Essas análises, juntamente com estudos de outras espécies da Bacia do Rio Grande, poderão servir como base para a adoção de estratégias de manejo e conservação que levem em conta a preservação da biodiversidade existente na bacia. Além disso, o isolamento dessas regiões microssatélites abrirá possibilidades para estudos de *Pimelodus maculatus* em vários outros contextos, já que a ocorrência dessa espécie não se limita somente a essa bacia.

6. Conclusões

Com base nos resultados obtidos nesse trabalho, podemos apresentar as seguintes conclusões:

- A metodologia utilizada se mostrou eficiente para o isolamento de regiões microssatélites de *Pimelodus maculatus*.
- A porcentagem de clones positivos encontradas foi de no mínimo 4,7%, compatível com o encontrado para o grupo dos peixes em outros trabalhos.
- A maioria de repetições encontradas foram de dinucleotídeos com motivos GT/CA, indicando uma predominância desse tipo de repetição no genoma dessa espécie.
- Os *loci* analisados até o momento são adequados para futuras análises populacionais.

7. Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, F. S., SODRÉ, L. M. K., CONTEL, E. P. B., 2003. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from Tietê and Paranapanema rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, 26 (3): 301-305.
- AMOS, W., BALMFORD, A., 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*, 87: 257 - 265.
- BALLOUX, F., MOULIN, N. L., 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165.
- BRAGA, F. M. S., 2001. Reprodução de peixes (Osteichthyes) em afluentes do reservatório de Volta Grande, Rio Grande, sudeste do Brasil. *Iheringia, Ser. Zool*, 91: 67-74.
- BRAVINGTON, M. V., WARD, D., 2004. Microsatellite DNA markers: evaluating their potencial for estimating the proportion of hatchery-reared offspring in a stock enhancement programme. *Molecular Ecology*, 13: 1287-1297.
- CAROSFELD, J., HARVEY, B., ROSS, C., BAER, A., 2003. Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. Victoria: World Fisheries Trust.
- CARVALHO, G. R., 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biology*, 43 (Supplement A): 53-73.
- CHENUIL, A., 2006. Choosing the right molecular markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genética*, 127: 101-120.

COMPANHIA ENERGÉTICA DE MINAS GERAIS, 2000. FUNDAÇÃO CENTRO TECNOLÓGICO DE MINAS GERAIS. Guia ilustrado de peixes da Bacia do Rio Grande. Belo Horizonte: CEMIG/ CETEC.

DESALLE, R., AMATO, G., 2004. The expansion of conservation genetics. *Nature Genetics*, 5: 702-712.

DESALLE, R., 2005. Genetics at the brink of extinction. *Heredity*, 94 : 386-387.

ELLEGREN, H., 2004. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews*, 5: 435 - 444.

ESTOUP, A., ROUSSET, F., MICHALAKIS, Y., CORNUET, J. M., ADRIAMANGA, M., GUYOMARD, R., 1998. Comparative analysis of microsatellite and allozyme markers: a case study investigating microgeographic differentiation in brown trout (*Salmo trutta*). *Molecular Ecology*, 7: 339 – 353.

FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D., 1996. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ª ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN.

FRANKHAM, R., 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326: S23 -S29.

GHEYAS, A. A., CAIRNEY, M., GILMOUR, A. E., SATTAR, M. A., DAS, T. K.,McANDREW, B. J., PENMAN, D. J.,TAGGART, J. B. 2006. Characterization of microsatellite loci in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*), and cross-amplification in other cyprinid species. *Molecular Ecology Notes* (2006), 6: 656 - 659.

- GODINHO, H. P., GODINHO, A. L., 1994. Ecology and conservation of fish in southeastern brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. Acta Limnologica Brasiliensa, pp.187-197, vol V. Workshop: Brazilian programme on conservation and management on inland water.
- GOLDSTEIN, D. B., POLLOCK, D. D., 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. Journal of Heredity, 88: 335-342.
- GOLDSTEIN, D. B., SCHLÖTTERER, C., 1999. Microsatellites: Evolution and applications. New York: Oxford.
- GOSSET, C., RIVES, J., LABONNE, J., 2006. Effect of habitat fragmentation on spawning migration of brown trout (*Salmo trutta*). Ecology of Freshwater Fish, 15: 247- 254.
- HANSEN, M. M., KENCHINGTON, E., NIELSEN, E. E., 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers. Fish and Fisheries, 2: 93-112.
- HANSEN, M. M., RUZZANTE, D. E., NIELSEN, E. E., MENSBERG, K. L. D., 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta*). Molecular Ecology, 9: 583-594.
- HEGGENES, J. ROED, K. H., 2006. Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. Ecology of freshwater fish, 15 : 366 -375.
- HILSDORF, A. KRIEGER, J. E., 1998. Biologia molecular na conservação de peixes. Biotecnologia, ciência e desenvolvimento, 1(5): 10 - 12.

- JONES, A. G., AVISE, J. C., 1997. Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a species with male pregnancy and sex- role reversal. *Marine Biology*, 6: 203-213.
- JURAS, I. A. G. M., 2001. Proposição sobre laboratórios de piscicultura em hidrelétricas. Notas técnicas. Brasília: Consultoria Legislativa da Câmara dos Deputados. pp. 5.
- KATTI, M. V., RANJEKAR. P. K, GUPTA. V. S., 2001. Differential Distribution of Simple Sequence Repeats in Eukaryotic Genome Sequences. *Molecular. Biological Evolution*. 18(7):1161–1167.
- LARINIER, M., 2000. Dams and fish migration. World commission on dams. (Contributing paper).
- MARTINS, S. L., TAMADA, K., 2000. Sistemas para a transposição de peixes (Boletim Técnico da Escola Politécnica da USP, Departamento de Engenharia Hidráulica e Sanitária, BT/ PHD/72). São Paulo: EPUSP.
- MATIOLI, S. R., 2001. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos Editora.
- MORITA, K., YAMAMOTO, S., 2001. Effects of habitat fragmentation by damming on the persistence of stream-dwelling charr populations. *Conservation Biology*, 5 (16): 1318-1326.
- NELSON, R. J. BEACHAM, T. D. SMALL, M.P., 1998. Microsatellite analysis of the population structure of Vancouver Island sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stock complex using nondenaturing gel electrophoresis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7 (4); 312-319.

- NERAAS, L. P., SPRUELL, P., 2001. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*, 10: 1153-1164.
- PAIVA, M. P., ANDRADE-TUBINO, M. F., GODOY, M. P., 2002. As represas e os peixes nativos do Rio Grande: Bacia do Paraná, Brasil. Rio de Janeiro: Interciência.
- PETIT, R. M., DEGUILLOUX. M.F., CHAT, J., GRIVET, D., GERÉ, P. G., VENDRAMIN, G. G., 2005. Standardizing for microsatellite length in comparisons of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 14: 885 - 890.
- PRIMMER, C. R, VESELOV, J. ZUBCHENKO, A., POUTUTIKIN, A., BAKHMET, I., KOSKINEN, M. T., 2006. Isolation by distance within a fragmented river system: genetic population structuring of Atlantic salmon, *Salmo salar*, in tributaries of the Varzuga River in northwest Rússia. *Molecular Ecology*, 15: 653-666.
- RAYMOND, M., ROUSSET, F., 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- RICO, C., RICO, I. HEWITT, G., 1996. 470 milion years of conservation of microsatelite loci among fish species. *Proceddings of Royal Society of London B: Biological Sciences*, 263, 549-557.
- ROQUES, S., DUCHESNE, P., BERNATCHEZ, L., 1999. Potencial of microsatellites for individual assignment: the North Atlantic redfish (genus *Sebastes*) species complex as a case of study. *Molecular Ecology*, 8: 1703-1718.

- ROZEN, S., SKALETISKY, H., 1998. *PRIMER 3*. Whitehead Institute for Biomedical Research. http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_<http://www.cgi>.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F., MANIATIS, T., 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, vol. 1, 2, 3. New York: Press Cold Spring Harbor..
- SPIELMAN, D. BROOK, B. W., FRANKHAM, R., 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *PNAS* 101: 15261-15264
- SCHLÖTTERER, C., 2000. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, 109: 365-371.
- SCHLÖTTERER, C., 2004. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics*, 5: 63-69.
- SCHUBART, O., 1962. Lista dos peixes da Bacia do Rio Mogi-Guassu. *Atas Soc. Biol. Rio de Janeiro*, 6 (3): 26-32.
- TAYLOR, E. B. STAMFORD. M. D. BAXTER, J. S., 2003. Population subdivision in westslope cutthroat trout (*Oncorhynchus clarki lewisi*) at the northern periphery of its range: evolutionary inferences and conservation implications. *Molecular Ecology*, 12: 2609- 2622.
- VRIJENHOEK, R. C., 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology* 53 (Supplement A), 394 - 412.
- ZANE, L., BARCELONI, L., PATARNELLO, T., 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular ecology* 11: 1-16.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)