

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
ARNO SOARES SEERIG

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HÍBRIDO ENTRE AS
ESPÉCIES *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum***

BELO HORIZONTE

2010

ARNO SOARES SEERIG

**UTILIZAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES NA
IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO HÍBRIDO ENTRE AS
ESPÉCIES *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Zootecnia, sob orientação da Profa. Dra. Denise A. A. de Oliveira.

BELO HORIZONTE
2010

Seerig, Arno Soares,

Dissertação - (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Orientadora :

Bibliografia :

Anexos :

VOCÊ PRECISA PEDIR PRO BIBLIOTECÁRIO DA VET FAZER SUA FICHA CATALOGráfICA. COLOQUEI AQUI APENAS UM ESBOÇO PRA VC COPIAR E COLAR A NOVA POR CIMA.

CDD-

Catálogo da Fonte :

FOLHA COM ASSINATURAS DA BANCA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Ester Soares Seerig e Alexandre Seerig e meus irmãos Vinícius e Tamiris. Obrigado pelo apoio e dedicação.

À professora e orientadora Denise Aparecida Andrade de Oliveira, pela orientação e por acreditar no trabalho.

Ao amigo e também orientador Daniel Cardoso de Carvalho, mais conhecido como 'estagiboy' pela amizade e pelo aprendizado.

Ao amigo e colega de trabalho Thiago Tetsuo Ushizima, pela amizade e apoio durante todo o trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Genética, Cláudia, Eduardo, Danilo, Ronaldo, Bruno, Ângelo, Bruna, Marcelo, Sandra e Juliana.

Aos amigos do LAQUA, Edgar Teixeira, Daniel Crepaldi e Alexandre Benvindo, pela ajuda e fornecimento de amostras.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Ao projeto INCT-CNPq 573899/2008-8 e FAPEMIG APQ 0084/08 pelo apoio financeiro.

À empresa Mar & Terra, pelo fornecimento das amostras e pelo apoio financeiro.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	<i>Pseudoplatystoma. corruscans</i>	15
Figura 2 -	<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	15
Figura 3 -	Híbrido (<i>P.corruscans X P.reticulatum</i>)	16
Figura 4 -	Mapa bacia do Rio São francisco e do Rio Paraguai.....	16

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 -	Número de alelos por loco por espécie.	18
Tabela 2 -	Análise da frequência alélica <i>P. corruscans</i>	19
Tabela 3 -	Análise da frequência alélica <i>P. reticulatum</i>	19
Tabela 4 -	Análise da frequência alélica dos híbridos.....	19
Tabela 5 -	Frequência alélica por população.....	20
Tabela 6 -	Resumo do teste de designação.....	23
Tabela 7 -	Valores do teste designação, considerando <i>log-Likelihoods</i> positivas	25
Gráfico 1 -	Teste de designação entre as pop1(<i>P.corruscans</i>), pop2 (Híbrido) e pop3 (<i>P. reticulatum</i>).....	23
Gráfico 2 -	Teste de designação entre a pop1 (<i>P.corruscans</i>) e pop2 (Híbrido).....	28
Gráfico 3 -	Teste de designação entre a pop1 (<i>P.corruscans</i>) e pop3 (<i>P.reticulatum</i>).....	29
Gráfico 4 -	Teste de designação entre a pop2 (Híbrido) e pop 3 (<i>P.reticulatum</i>)	29

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	11
1. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Panorama da Aquicultura.....	12
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
2.1. Local.....	15
2.2. Descrição da amostra.....	15
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4. CONCLUSÃO	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	30

RESUMO

O surubim *Pseudoplatystoma corruscans* é uma espécie de grande importância ecológica e econômica no Brasil. A pesca destes animais vem se tornando cada vez mais escassa, motivando a criação dos mesmos em cativeiro. Porém a criação é baseada na produção de híbridos provenientes do cruzamento desta espécie com sua congênera *Pseudoplatystoma reticulatum*. Na tentativa de identificação das espécies e dos híbridos, características morfológicas têm sido utilizadas. No entanto, tais caracteres apresentam valor restrito, pois os híbridos possuem aparência intermediária entre as espécies parentais de difícil identificação na descendência e mesmo em produtos processados. Os aspectos biológicos e zootécnicos deste híbrido e seu impacto na fauna nativa e grupos cultivados ainda são desconhecidos, sendo necessário o desenvolvimento de ferramentas moleculares eficazes para a identificação dos mesmos. Deste modo, amostras de nadadeiras foram coletadas de 128 animais sendo, 44 híbridos, 47 *P. corruscans* e 37 *P. reticulatum*. As genotipagens foram realizadas utilizando oito microssatélites descritos por Revaldaves (2005). As análises estatísticas foram feitas no programa GenALEx6. O teste de designação foi eficiente na identificação das espécies puras e distinção do híbrido. Os resultados mostraram que a utilização dessa ferramenta molecular pode ter grande aplicação em estudos genéticos, genética da conservação e em programas de melhoramento genético.

Palavras-chave: DNA, marcadores moleculares, híbrido e surubins.

ABSTRACT

Surubim *Pseudoplatystoma corruscans* is a species of great ecological and economic importance in Brazil. The fishing of these animals is becoming increasingly scarce, driving the breeding of them in captivity. But breeding is based on the production of hybrids from crossing this species with *Pseudoplatystoma reticulatum*. In an attempt to identify the species and hybrids, morphological characteristics have been used. However, such characters have limited value, because the hybrids have an intermediate appearance between the parental species and are difficult to identify the offspring or in processed products. The biological and husbandry of this hybrid and its impact on native fauna and cultivated groups are still unknown, necessitating the development of effective molecular tools for identification. Thus, samples were collected from 128 fin and animals, 44 hybrids, 47 *P. corruscans* and 37 *P. reticulatum*. The genotyping was performed using eight microsatellite markers described by Revaldaves (2005). Statistical analysis was made in the program GenALEx6. The test designation was effective in species identification and distinction of hybrids. The results showed that the use of molecular tools may have great application in genetic studies, conservation genetics and breeding programs.

Key-words: DNA, molecular markers, hybrid and surubins.

INTRODUÇÃO

O Surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) é uma espécie de grande importância ecológica e econômica. A maior parte dos pescadores profissionais da bacia do São Francisco tem como objetivo capturar este animal. Relatos de pescadores e pesquisadores mostram que a pesca desse peixe vem se tornando cada vez mais escassa (GODINHO et al., 1997), motivando a criação do mesmo em cativeiro, para fins de comercialização e repovoamento dos mananciais hídricos.

Entretanto, as matrizes para aquacultura são eminentemente oriundas da natureza e a introdução de estoques provenientes de outras bacias, bem como do híbrido resultante do cruzamento entre *P. corruscans* (Surubim) e *P. reticulatum* (Cachara), pode trazer consequências indesejáveis advindas da introgressão genética sobre os estoques selvagens.

Na tentativa de identificação das espécies e dos híbridos, características morfológicas têm sido utilizadas para diferenciação. No entanto, tais caracteres podem ter valor restrito, pois os híbridos possuem aparência intermediária entre as espécies parentais tornando difícil a identificação na descendência e também em produtos processados.

Considerando a importância crescente da piscicultura na produção nacional, há a necessidade de fornecer subsídios para programas efetivos de melhoramento genético das espécies, a partir da caracterização genética e do isolamento de linhagens puras desses animais, por meio do desenvolvimento de testes moleculares para certificação genética das matrizes a serem utilizadas na produção de alevinos para o repovoamento dos estoques naturais e para produção comercial e, ainda, para certificação genética de produtos derivados, evitando fraudes.

Assim sendo, o presente trabalho visou validar o conjunto de microssatélites proposto para a caracterização genética das espécies *P. corruscans* e *P. reticulatum* e seus híbridos, de modo a fornecer subsídios para o desenvolvimento de testes de certificação genética.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Panorama da Aquicultura

Em 2005, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) já apresentava a produção mundial de pescados na ordem de 158 milhões de toneladas, sendo cerca de 124 milhões de toneladas destinadas ao consumo humano. A pesca extrativa, ainda que representasse quase 60% do total de pescado consumido mundialmente, teve crescimento médio anual de apenas 0,17%, no período de 1995 a 2005, enquanto a aquicultura, nesse mesmo período, cresceu 7,29% ao ano, atingindo a quantia de 63,3 milhões de toneladas (FAO, 2006). Esses dados refletem claramente a estagnação da pesca extrativa e a necessidade cada vez maior de crescimento da aqüicultura para atender à demanda mundial.

Apesar da magnitude desses números, o Brasil só recentemente despertou para a importância desse setor do agronegócio. Em 2005, produziu somente um milhão de toneladas de pescado. Foram 750,3 mil toneladas oriundas da pesca extrativa e 257,7 mil toneladas da aqüicultura, representadas pela piscicultura de águas interiores (179,7 mil toneladas), pela carcinicultura marinha (63,1 mil toneladas) e pela malacocultura (14,9 mil toneladas) (FAO, 2006).

Contudo, a aqüicultura brasileira cresce beneficiada por todas as características naturais, geração e difusão de tecnologia, disponibilidade de insumos e oportunidades de mercado (KUBITZA, 2007). Na última década, essa atividade cresceu em média 23,8% ao ano, enquanto a aqüicultura mundial 10,2%, mostrando o enorme potencial da atividade no país. O Brasil já ocupa posição de destaque na produção de algumas “commodities” da aquicultura mundial. Entre os países latinos americanos, foi o segundo maior produtor de pescado cultivado em 2005, atrás somente do Chile, o maior produtor de tilápias, à frente de Honduras, Colômbia e Equador; e o segundo maior produtor de camarão marinho (FAO, 2007).

O Brasil apresenta um grande potencial para o desenvolvimento da aqüicultura. Formado por 8.400 km de costa marítima e 5.500.000 hectares em reservatórios de águas doces, o país comporta aproximadamente 12% da água doce disponível no planeta (SEAP, 2007). A disponibilidade de recursos hídricos, o clima extremamente favorável, mão-de-obra abundante, crescente demanda por pescado no mercado interno e existência de espécies nativas com potencial para exploração econômica, como tambaqui (*Colossoma macropomum*), pacu (*Piaractus mesopotamicus*), pirarucu (*Arapaima gigas*) e o surubim (*Pseudoplatystoma sp.*).

O gênero *Pseudoplatystoma* compreende os maiores peixes da família Pimelodidae, da ordem dos Siluriformes e podem ser encontrados nas principais bacias hidrográficas sul-americanas, regionalmente são conhecidos como “surubins” (ROMAGOSA et al., 2003). Sua distribuição inclui os maiores rios das bacias hidrográficas da América do Sul: o rio Paraná, o Amazonas, o Orinoco, o São Francisco, entre outros (BURGESS, 1989).

No Brasil, os surubins são peixes de água doce que têm um alto valor comercial, sendo considerados produtos nobres por apresentarem carne saborosa, com baixo teor de gordura e ausência de espinhos intramusculares. Essas características atendem as preferências atuais e futuras do mercado de peixe e fazem da carne do surubim um produto com grandes possibilidades de exportação (KUBITZA, CAMPOS e BRUM, 1998).

Pesquisas com o objetivo de domesticação e conservação do *Pseudoplatystoma sp* começam a produzir resultados satisfatórios (MIRANDA e RIBEIRO, 1997). Já é possível encontrar pesqueiros que comercializam essa espécie em cativeiro (SOUZA, 2007). Esses pesqueiros, bem como estações de piscicultura de órgãos governamentais e privados, têm produzido alevinos dessa espécie comercializando-os tanto para produção como para repovoamento de rios (SATO, FENERICH-VERANI e GODINHO, 2003).

Entretanto, diversos pesquisadores relatam que híbridos dessa espécie com seu congênere *P. reticulatum* (cachara) são vendidos aos produtores como “surubins” e também encontrados na natureza (ALVES et al., 2007). Aspectos biológicos e zootécnicos como reprodução,

crescimento, caracterização genética e nutrição desse híbrido e seu impacto na natureza e grupos cultivados ainda são desconhecidos (SOUZA, 2007).

Segundo VIEIRA e POMPEU (2001) a hibridação entre espécies está entre as cinco principais causas de perda da biodiversidade nos Estados Unidos. Atualmente, no Brasil, não existem estudos para avaliar os efeitos da hibridação no ponto de vista ecológico (ALVES et al., 2007), contudo já existem alguns trabalhos que avaliam o desempenho produtivo desses híbridos em sistemas de produções comerciais.

A hibridação interespecífica buscando principalmente o aumento da produção e a obtenção de linhagens estéreis tem sido utilizada como metodologia de manipulação genética nas pisciculturas brasileiras, principalmente devido à facilidade de manipulação dos gametas. Segundo MAYR (1963), esse fenômeno é definido como a fusão de dois patrimônios genéticos diferentes, cujos produtos podem apresentar caracteres taxonômicos intermediários.

Alguns pesquisadores consideram a hibridação natural como um fenômeno importante para a evolução, podendo produzir genótipos que estabelecem novas linhagens evolutivas (ARNOLD e HODGES, 1995).

No Brasil, o uso da metodologia de hibridação artificial em peixes teve início há mais de 25 anos, envolvendo tilápias e foi realizado pelo Departamento de Obras Contra a Seca (DNOCS), no nordeste (TOLEDO-FILHO et al., 1998). Ainda segundo os mesmos autores, existem problemas práticos a serem solucionados em programas de hibridação artificial relacionados aos produtos genéticos resultantes da hibridação bem sucedida, como avaliação da fertilidade ou esterilidade e aos riscos biológicos potenciais dos híbridos para a integridade genética das espécies parentais selvagens ou cultivadas.

CHEVASSUS (1983) verificou que peixes híbridos podem apresentar desde gônadas alteradas, que resultam em esterilidade, até gônada com maturação sexual completa, em ambos os sexos.

Devido à grande semelhança morfológica dos híbridos com os seus parentais, podem ocorrer em estoques cultivados misturas ocasionais resultando na formação de plantéis de reprodutores contendo indivíduos portadores de esterilidade.

Entretanto, alguns híbridos têm demonstrado bom desempenho nos sistemas produtivos, especialmente em regiões tropicais. Segundo CREPALDI et al. (2003) comparando a linhagem híbrida *P. corruscans* X *P. fasciatum* com a linhagem pura de *P. corruscans* do Rio São Francisco, em um ensaio de 84 dias com três densidades de estocagem para a classe de peso avaliada, os híbridos apresentavam melhor desenvolvimento que os espécimes puros, independente das densidades de estocagem.

Outro problema enfrentado pelos produtores é a concorrência pela comercialização de outros tipos de peixes considerados menos nobres para a produção de filés e produtos processados, erroneamente vendidos como surubins. De acordo com SMITH et al. (2008), a certificação de peixes necessitaria usualmente da aplicação de ferramentas moleculares, uma vez que a maioria das características morfológicas utilizadas na identificação das espécies são removidas durante o processo de filetagem. Ainda segundo os mesmos autores, os primeiros métodos de identificação baseados em eletroforese de proteínas foram conhecidos como métodos oficiais para identificação de filés de peixes. Todavia, as proteínas são estáveis em produtos frescos e congelados, mas são desnaturadas e danificadas por calor ou processo de salga, o que torna tal metodologia inadequada para a identificação de produtos processados.

Marcadores moleculares podem ser utilizados em estudos de populações de peixes e em aquicultura para identificação de híbridos e espécies puras, para estabelecer relações filogenéticas, estimar o tamanho efetivo de populações, identificar populações chave para conservação de recursos genéticos, determinar geneticamente o impacto da introdução de populações e peixes cultivados em uma determinada área, definir estratégias de melhoramento e construção de mapas genéticos (FERGUSON et al., 1995) e ainda para certificação de produtos processados (SMITH et al., 2008).

A variedade genética permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001). Qualquer material biológico contendo DNA pode ser utilizado em testes moleculares. São apropriados, por exemplo, pele, nadadeiras, músculos, vísceras e sangue.

Marcadores microssatélites, têm sido utilizados como ferramentas importantes em estudos de linhagens comerciais e na análise da estrutura populacional de peixes, proporcionando informações seguras sobre os níveis de variedade e similaridade genética entre diferentes populações (TOLEDO-FILHO et al., 1992) e espécies próximas.

Os microssatélites possuem características que os tornam excelentes marcadores moleculares. São abundantes no genoma nuclear, altamente polimórficos, exibindo altos níveis de alelismo e também de heterozigozidade, são co-dominantes e apresentam herança mendeliana. Além disso, a metodologia empregada para detecção de variação é baseada na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), de modo que quantidades mínimas de DNA são suficientes para as análises (WRIGHT e BENTZEN, 1994).

Esses marcadores estão sendo utilizados com muito sucesso em vários estudos sobre estrutura genética de populações, padrões de fluxo gênico, análise de parentesco, mapeamento genômico, estudos de conservação, análises forenses, e para direcionamento de acasalamentos em programas de melhoramento genético, a fim de manter a diversidade genética dos plantéis de reprodutores ao longo das gerações.

São regiões de DNA denominadas microssatélites ou STR (*Sequence Tanden Repeat*) repetições de nucleotídeos de 2-6 pares de base em *tanden* (em sequência), possuindo comprimento ou número de repetições variáveis (TAUTZ, 1989). São regiões extremamente polimórficas, ou seja, essas sequências podem diferir no número de repetições entre indivíduos.

A taxa de mutações dos microssatélites é de 10^{-6} a 10^{-2} pares de bases por geração. O mecanismo proposto para explicar essa elevada taxa de mutação é conhecido como DNA *replication slippage*, onde durante a replicação do DNA ocorre o realinhamento das fitas, que pode não ser reconhecido pelo sistema de reparo do DNA. Assim, a síntese continua e o número de repetições é alterado (SCHLOTTERER, 2000).

Já as regiões flanqueadoras possuem uma taxa de mutação bem menor, permitindo a realização de PCR utilizando-se *primers* específicos para as bordas dos microssatélites, sendo possível a análise do polimorfismo existente nas regiões repetitivas.

A maior limitação para utilização de microssatélites é o uso de *primers* específicos para as espécies estudadas. Porém, iniciadores (*primers*) de espécies relacionadas, irão frequentemente funcionar para ambas as espécies (CARVALHO, 2002).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Animal da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

2.2. Descrição da amostra

As amostras de tecido (nadadeiras) foram coletadas de 128 animais sendo, 44 híbridos, 47 *P. corruscans* e 37 *P. reticulatum*. Das amostras de *P. corruscans* (figura 1), 24 foram provenientes da Bacia do Rio São Francisco, nas proximidades da cidade de São Francisco e 23 provenientes da Bacia do Rio Paraguai, do Rio Aquidauana, próximo à cidade de Aquidauana.

Figura 1: *Pseudoplatystoma corruscans*



Fonte: flickr.com/photos, acesso 25/06/09

As amostras de *P. reticulatum* (n=12) foram provenientes do Rio Aquidauana, na Bacia do Rio Paraguai e 25 eram F1 provenientes de piscicultura (figura 2).

Figura 2: *Pseudoplatystoma reticulatum*



Fonte: planetcatfish.com, acesso 25/06/09

As amostras de *P. corruscans* e *P. reticulatum* provenientes da bacia do Rio Paraguai e as amostras de híbridos (figura 3), foram cedidas pela empresa Mar & Terra, na cidade de Itaporã, no estado do Mato Grosso do Sul. Os peixes foram identificados pelo técnico responsável da empresa.

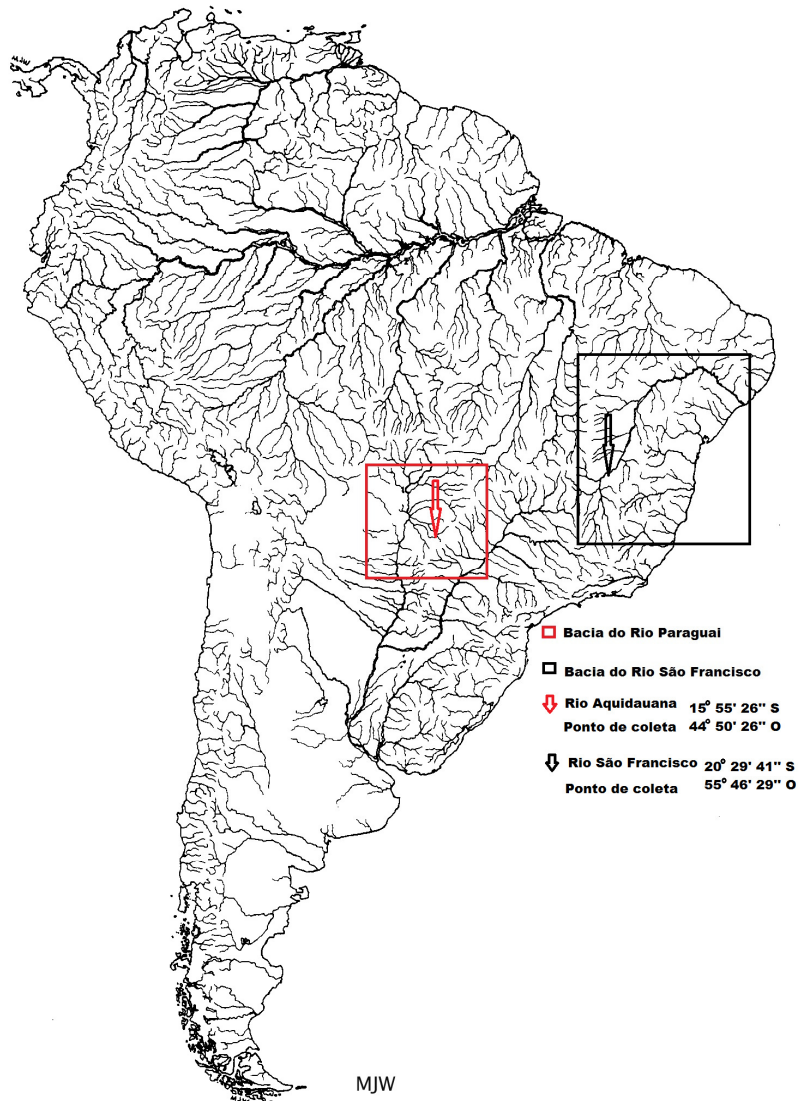
Figura 3: Híbrido (*P. corruscans* X *P. reticulatum*)



Fonte: arquivo pessoal

Os pontos de coleta dos peixes podem ser observados no mapa da figura 4.

Figura 4: Bacias do Rio São Francisco e do Rio Paraguai



Fonte: www.sfrancisco.bio.br/ modificado.

As amostras foram preservadas em etanol 95%. A extração de DNA foi realizada segundo a técnica de fenol-clorofórmio (SAMBROOK, FRITISCH e MANIATIS, 1989) a partir de 1 cm² de nadadeiras.

As ampliações foram realizadas segundo o método descrito por SCHUELKE (2000), no qual o produto de PCR é marcado com fluorescência por meio da inclusão de um terceiro *primer* fluorescente (M13). Os primers utilizados foram descritos por REVALDAVES et al., 2005. As reações foram realizadas em um volume final de 10 µl contendo 1X Flexi Buffer GoTaq (Promega), 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.2 U GoTaq Flexi polimerase (Promega), BSA (0.1%), 0.01µM *primer* direto, 0.05 µM *primer* reverso e 0.05 µM *primer* M13 fluorescente.

O programa de amplificação foi constituído por seis etapas: primeira etapa de 94°C por 3 min, segunda etapa de 94°C por 20 seg, 63 °C por 45 seg, 71 °C por 1 min, 94 °C por 20 seg e 61 °C por 45 seg, terceira etapa de 94 °C por 20 seg, 59 °C por 45 seg, 71 °C por 1 min, 94 °C por 20 seg, 57 °C por 45 seg e 71 °C por 1 min, quarta etapa de 94°C por 20 seg, 55°C por 45 seg e 71°C por 1 min (quarta etapa é repetida 36 vezes), quinta etapa 71°C por 4 min e sexta etapa de 15°C.

Os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese no aparelho ABI 310 (Applied Biosystems), os perfis foram classificados manualmente e os resultados dos microssatélites foram analisados no programa GenALEx6, programa de análises genéticas desenvolvido para ser utilizado no Programa Excel[®].

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os microssatélites analisados apresentaram elevado polimorfismo. O locus Pcor 10 apresentou 16 alelos na espécie *P. corruscans*. O locus Pcor 6 foi monomórfico, ou seja, apresentou somente um alelo para as espécies parentais e para os híbridos, resultado semelhante ao encontrado por REVALDAVES (2005), para *P. corruscans* e *P. fasciatum*.

No geral, a riqueza alélica foi satisfatória, sendo detectados 64 alelos para *P. corruscans*, 45 alelos para o *P. reticulatum* e 51 alelos para os híbridos (Tabela 1).

O maior número de alelos encontrados para a espécie *P. corruscans* pode ter como explicação o fato de todos os indivíduos testados serem selvagens e provenientes de duas bacias diferentes (São Francisco e Paraguai). Já para a espécie *P. reticulatum* foram utilizados somente 12 indivíduos selvagens da mesma bacia e os demais provenientes da piscicultura, provavelmente originados do acasalamento de poucos reprodutores. Os híbridos, apesar de também serem provenientes de acasalamentos de poucos reprodutores, apresentaram uma boa quantidade de alelos, uma vez que são resultantes do cruzamento de duas linhagens puras.

Tabela 1: Número de alelos por locus por grupo de animais.
Tabela gerada pelo programa GenALEx6.

	<i>P. corruscans</i>	<i>P. reticulatum</i>	Híbrido
Pcor1	4	7	7
Pcor2	11	10	11
Pcor5	12	7	10
Pcor6	1	1	1
Pcor7	4	6	6
Pcor8	6	5	5
Pcor10	16	6	2
Pcor21	10	3	9
Total	64	45	51

A heterosigozidade esperada (H_e) variou de 0,408 (Pcor 10-Híbrido) a 0,870 (Pcor 10-*P. corruscans*) e a heterosigozidade observada (H_o) variou de 0,359 (Pcor 7- *P. corruscans*) a 1,000 para (Pcor 21-Híbrido), (tabelas 2 e 4). A maioria dos loci estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg na espécie *P. reticulatum*. Entretanto, um maior número de loci em desequilíbrio foi detectado no híbrido e no surubim.

O índice de endogamia F_{is} , quando positivo, indica excesso de heterozigotos. No caso da espécie *P. reticulatum*, esse índice encontra-se próximo de zero (F_{is} médio = 0,04), indicando que o nível de heterozigose e homozigose estão dentro do esperado, e, assim, em equilíbrio de Hardy-Weinberg (tabela 3). Como esperado, o índice de endogamia F_{is} sugere a existência de um excesso de heterozigotos nos híbridos (F_{is} médio= -0,227), o que já era esperado como resultado do cruzamento de duas linhagens puras.

Já no caso do *P. corruscans* foi detectado déficit de heterozigotos (F_{is} médio= 0,117). O provável motivo do excesso de loci em desequilíbrio de Hardy-Weinberg pode ser explicado pelo efeito Wahlund, já que foram analisadas amostras de surubim de duas populações, provenientes de duas bacias hidrográficas distintas e sem conexão. Em genética populacional, o efeito Wahlund refere-se à redução da heterozigozidade em uma população causada pela estruturação sub-populacional, devido a barreiras geográficas que limitam o fluxo gênico, seguido de deriva genética nessas sub-populações.

Tabela 2: Análise da frequência de alelos para marcadores microssatélites nas espécies *P. corruscans*. Tabela gerada pelo programa GenALEx6.

Locus								
	Pcor1	Pcor2	Pcor5	Pcor6	Pcor7	Pcor8	Pcor10	Pcor21
N	39	30	39	39	39	38	34	39
Na	4	11	13	1	4	6	17	10
Ho	0,436	0,367	0,692	0	0,359	0,368	0,706	0,744
He	0,598	0,855	0,817	0	0,527	0,654	0,879	0,843
Fis	0,271	0,571	0,152	#N/D	0,319	0,437	0,197	0,117
HWE	NS(0,100)	***(0,000)	**(0,010)		***(0,000)	*(0,010)	***(0,000)	***(0,000)

N, número de espécimes; Na, número de alelos; Ho, homossigozidade observada; He, heterossigozidade esperada; Fis, índice de endogamia. No Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), NS, não significativo, *, significativo (P<0.05); **, significativo (P<0.01); ***, significativo (P<0.001).

Tabela 3: Análise da frequência de alelos para marcadores microssatélites na espécie *P. reticulatum*. Tabela gerada pelo programa GenALEx6.

Locus								
	Pcor1	Pcor2	Pcor5	Pcor6	Pcor7	Pcor8	Pcor10	Pcor21
N	37	37	37	37	35	34	37	35
Na	7	10	8	1	6	6	6	3
Ho	0,595	0,405	0,946	0	0,829	0,765	0,703	0,486
He	0,521	0,787	0,801	0	0,703	0,638	0,576	0,506
Fis	-0,141	0,485	-0,181	#N/D	-0,178	-0,198	-0,221	0,04
HWE	NS(0,059)	***(0,000)	*(0,035)		NS(0,058)	NS(0,826)	***(0,000)	NS(0,832)

N, número de espécimes; Na, número de alelos; Ho, homossigozidade observada; He, heterossigozidade esperada; Fis, índice de endogamia. No Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), NS, não significativo, *, significativo (P<0.05); **, significativo (P<0.01); ***, significativo (P<0.001).

Tabela 4: Análise da frequência de alelos para marcadores microssatélites nos Híbridos. Tabela gerada pelo programa GenALEx6.

Locus								
	Pcor1	Pcor2	Pcor5	Pcor6	Pcor7	Pcor8	Pcor10	Pcor21
N	43	44	43	44	42	44	42	39
Na	7	11	10	1	7	5	2	9
Ho	0,907	0,682	0,651	0	0,881	0,364	0	1
He	0,776	0,817	0,842	0	0,625	0,419	0,408	0,815
Fis	-0,169	0,166	0,226	#N/D	-0,41	0,132	1	-0,227
HWE	***(0,000)	***(0,000)	***(0,000)		NS(0,205)	***(0,000)	***(0,000)	***(0,000)

N, número de espécimes; Na, número de alelos; Ho, homossigozidade observada; He, heterossigozidade esperada; Fis, índice de endogamia. No Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), NS, não significativo, *, significativo (P<0.05); **, significativo (P<0.01); ***, significativo (P<0.001).

Na tabela 5 pode ser visualizada a presença de alelos privativos, para o Pcor1, os alelos 115 (0,021), 125 (0,085) foram exclusivos do *P. corruscans*, os alelos 127 (0,012) e 137 (0,070), foram exclusivos para os híbridos e os alelos 139 (0,014), 141(0,014) e 143 (0,014) foram exclusivos para o *P. reticulatum*.

Para o *primer* Pcor2, o alelo 231 (0,017) foi exclusivo do *P. corruscans* e o alelo 235 (0,027) foi exclusivo do *P. reticulatum*.

Para o *primer* Pcor5, os alelos, 171(0,106), 177 (0,021), 179 (0,011) e 181(0,011), foram exclusivos do *P. corruscans*, 175 (0,014) foi exclusivo dos híbridos e o 162(0,014) foi exclusivo do *P. reticulatum*.

Para o *primer* Pcor 7, o alelos 227 (0,64), 233(0,225), 235 (0,022) e 255 (0,043) foram exclusivos do *P. corruscans*, o alelo 279 (0,012) foi exclusivo dos híbridos e o alelo 269(0,029) foi exclusivo do *P. reticulatum*.

Para o *primer* Pcor8, os alelos exclusivos para o *P. corruscans* foram, 181(0,011), 183(0,022), 193(0,011) , para os híbridos foi o alelo 199 (0,034) e para o *P. reticulatum* o alelo, 195 (0,015).

Para o *primer* Pcor10, os alelos exclusivos do *P. corruscans* foram, 181 (0,048), 191(0,083), 205 (0,036), 207 (0,083), 213 (0,012), 215 (0,012), 217 (0,60), 219 (0,024), 227 (0,036), 241 (0,024), 247 (0,024) e 251 (0,024), e para os híbridos o alelo 197 (0,027).

Para o *primer* Pcor 21, foram exclusivos os alelos 129 (0,032), 143 (0,043), 147 (0,021), 153 (0,021) para o *P. corruscans* e o alelo 145 (0,154) para os híbridos.

Para checar se os resultados da genotipagem com os microssatélites seria capaz de distinguir o híbrido das espécies puras, foi utilizado o teste de designação do programa Genalex, segundo PAETKAU et al., (2004). Os resultados indicaram, pelo teste de designação, que a técnica molecular utilizada foi eficiente na detecção de todos os híbridos e também das espécies puras.

Tabela 5: Frequência alélica por população

Locus	Alelo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido	<i>P. reticulatum</i>
Pcor1	115	0,021	0,000	0,000
	121	0,532	0,360	0,230
	123	0,362	0,186	0,000
	125	0,085	0,000	0,000
	127	0,000	0,012	0,000
	129	0,000	0,093	0,649
	133	0,000	0,198	0,068
	135	0,000	0,081	0,014
	137	0,000	0,070	0,000
	139	0,000	0,000	0,014
	141	0,000	0,000	0,014
	143	0,000	0,000	0,014
Pcor2	203	0,000	0,011	0,014
	207	0,050	0,125	0,351
	209	0,217	0,330	0,000
	211	0,000	0,170	0,135
	213	0,083	0,000	0,041
	215	0,083	0,011	0,000

Tabela 5: Frequência alélica por população (continuação)

Locus	Alelo	<i>P. corruscans</i>	Híbrido	<i>P. reticulatun</i>
Pcor2	217	0,250	0,045	0,027
	219	0,050	0,034	0,203
	221	0,050	0,023	0,162
	223	0,083	0,136	0,014
	225	0,050	0,068	0,000
	227	0,067	0,045	0,027
	231	0,017	0,000	0,000
	235	0,000	0,000	0,027
Pcor5	155	0,011	0,012	0,014
	157	0,053	0,116	0,000
	159	0,011	0,070	0,014
	161	0,021	0,105	0,122
	163	0,043	0,035	0,230
	165	0,011	0,035	0,230
	167	0,298	0,116	0,257
	169	0,308	0,198	0,135
	171	0,106	0,000	0,000
	173	0,096	0,267	0,000
	175	0,000	0,047	0,000
	177	0,021	0,000	0,000
	179	0,011	0,000	0,000
181	0,011	0,000	0,000	
Pcor6	174	1,000	1,000	1,000
Pcor7	227	0,064	0,000	0,000
	231	0,606	0,560	0,000
	233	0,255	0,000	0,000
	235	0,032	0,000	0,000
	255	0,043	0,000	0,000
	267	0,000	0,107	0,457
	269	0,000	0,000	0,029
	271	0,000	0,084	0,200
	273	0,000	0,214	0,071
	275	0,000	0,024	0,043
	277	0,000	0,000	0,200
279	0,000	0,012	0,000	
Pcor8	181	0,011	0,000	0,000
	183	0,022	0,000	0,000
	185	0,011	0,068	0,191
	187	0,391	0,750	0,544
	189	0,228	0,000	0,044

Tabela 5: Frequência alélica por população (continuação)

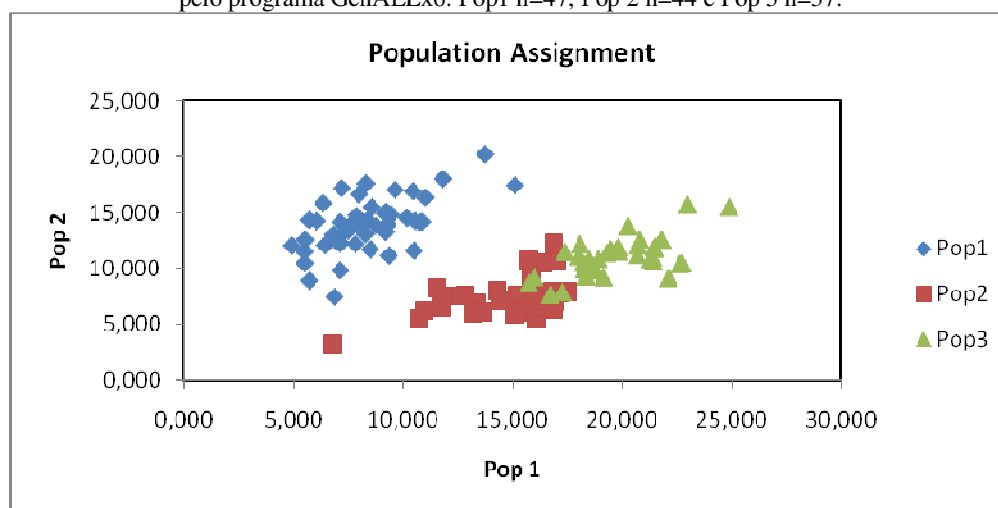
Locus	Alelo	<i>P.corruscans</i>	Híbrido	<i>P.reticulatun</i>
Pcor8	191	0,326	0,102	0,000
	193	0,011	0,000	0,000
	195	0,000	0,000	0,015
	197	0,000	0,045	0,206
	199	0,000	0,034	0,000
Pcor10	175	0,000	0,714	0,473
	181	0,048	0,000	0,000
	183	0,060	0,000	0,027
	185	0,000	0,286	0,446
	191	0,083	0,000	0,000
	193	0,226	0,000	0,014
	197	0,000	0,000	0,027
	203	0,226	0,000	0,014
	205	0,036	0,000	0,000
	207	0,083	0,000	0,000
	213	0,012	0,000	0,000
	215	0,012	0,000	0,000
	217	0,060	0,000	0,000
	219	0,024	0,000	0,000
	227	0,036	0,000	0,000
	239	0,024	0,000	0,000
	241	0,024	0,000	0,000
	247	0,024	0,000	0,000
	251	0,024	0,000	0,000
	Pcor21	123	0,000	0,333
125		0,096	0,167	0,429
129		0,032	0,000	0,000
131		0,266	0,064	0,000
133		0,213	0,090	0,000
135		0,096	0,038	0,000
137		0,128	0,026	0,000
139		0,085	0,064	0,000
141		0,000	0,064	0,014
143		0,043	0,000	0,000
145		0,000	0,154	0,000
147		0,021	0,000	0,000
153		0,021	0,000	0,000

A tabela 6 mostra de maneira resumida que todas as amostras foram designadas para as populações corretas, mostrando 100% de eficiência para os indivíduos testados. Também é possível visualizar no gráfico 1 que os híbridos estão em posição intermediária entre as espécies parietais. Os valores de verossimilhança podem ser visualizados na tabela 7 (ANEXO).

Tabela 6: Resumo do teste de designação.
Gerado pelo programa GenALEx6.

População	População própria	Outra população
<i>P. corruscans</i>	47	
Híbrido	44	
<i>P. reticulatum</i>	37	
Total	128	0
Porcentagem	100%	0%

Gráfico 1: Teste de designação entre a Pop1(*P. corruscans*), Pop2 (Híbrido) e Pop3 (*P. reticulatum*). Gerado pelo programa GenALEx6. Pop1 n=47, Pop 2 n=44 e Pop 3 n=37.



Os resultados mostraram que a utilização dessa ferramenta molecular pode ter grande aplicação em estudos genéticos, genética da conservação e em programas de melhoramento genético.

4. CONCLUSÃO

A técnica molecular é eficiente na caracterização genética de populações, permitindo a identificação precisa de espécies puras e de híbridos.

ANEXO

Tabela 7: Valores do teste designação, considerando *log-Likelihoods* positivas, o menor valor indica a maior verossimilhança.

Amostra	Pop	Pop1	Pop2	Pop3	Designação	
1	pintado	10,153	14,577	23,950	1	Pop1
4	pintado	8,019	13,800	18,753	1	Pop1
5	pintado	8,260	13,114	18,449	1	Pop1
7	pintado	9,175	13,308	21,477	1	Pop1
8	pintado	5,715	8,942	16,546	1	Pop1
10	pintado	7,481	13,435	18,091	1	Pop1
11	pintado	15,077	17,482	20,850	1	Pop1
12	pintado	10,773	14,141	19,820	1	Pop1
13	pintado	11,792	18,060	21,131	1	Pop1
14	pintado	13,705	20,267	23,021	1	Pop1
15	pintado	10,505	14,302	21,669	1	Pop1
16	pintado	10,846	14,226	22,786	1	Pop1
18	pintado	10,990	16,395	19,631	1	Pop1
19	pintado	9,262	13,948	20,063	1	Pop1
20	pintado	7,804	12,215	18,353	1	Pop1
103	pintado SF	7,114	12,276	19,113	1	Pop1
104	pintado SF	5,491	10,502	18,004	1	Pop1
105	pintado SF	9,432	14,843	17,550	1	Pop1
106	pintado SF	7,967	16,668	16,812	1	Pop1
107	pintado SF	5,480	11,559	18,267	1	Pop1
108	pintado SF	7,180	17,220	16,592	1	Pop1
109	pintado SF	7,112	12,332	15,901	1	Pop1
110	pintado SF	6,781	13,066	17,481	1	Pop1
111	pintado SF	5,696	14,374	17,595	1	Pop1
112	pintado SF	8,352	14,339	16,896	1	Pop1
113	pintado SF	8,554	15,526	17,531	1	Pop1
114	pintado SF	4,898	12,073	15,754	1	Pop1
115	pintado SF	6,425	12,127	19,057	1	Pop1
116	pintado SF	5,512	12,590	19,994	1	Pop1
117	pintado SF	6,332	15,865	16,820	1	Pop1
118	pintado SF	6,942	12,402	18,648	1	Pop1
119	pintado SF	6,045	14,282	15,126	1	Pop1
120	pintado SF	8,283	17,632	21,104	1	Pop1
121	pintado SF	7,607	13,992	20,235	1	Pop1
122	pintado SF	7,848	14,789	23,463	1	Pop1
123	pintado SF	7,114	14,171	21,971	1	Pop1
124	pintado SF	10,427	16,948	16,741	1	Pop1
126	pintado SF	8,744	13,875	21,173	1	Pop1
127	pintado SF	9,612	17,072	23,577	1	Pop1
22	pintado	9,202	15,114	18,202	1	Pop1

Tabela 7: Valores do teste designação, considerando *log-Likelihoods* positivas, o menor valor indica a maior verossimilhança (Continuação).

Amostra	Pop	Pop1	Pop2	Pop3	Designação	
24	pintado	7,110	9,855	17,978	1	Pop1
27	pintado	6,854	7,495	15,794	1	Pop1
30	pintado	9,170	14,956	24,166	1	Pop1
33	pintado	8,485	11,738	18,740	1	Pop1
34	pintado	10,477	11,622	22,267	1	Pop1
45	pintado	9,339	11,180	19,271	1	Pop1
48	pintado	7,348	13,421	19,151	1	Pop1
h1	híbrido	15,980	6,052	15,475	2	Pop2
h2	híbrido	15,124	5,791	15,322	2	Pop2
h3	híbrido	17,484	7,879	16,027	2	Pop2
h4	híbrido	16,831	7,601	17,313	2	Pop2
h5	híbrido	16,889	6,311	14,344	2	Pop2
h6	híbrido	16,902	12,214	16,649	2	Pop2
h8	híbrido	16,578	7,283	15,514	2	Pop2
h9	híbrido	16,113	7,810	13,089	2	Pop2
h10	híbrido	16,491	6,390	14,776	2	Pop2
h11	híbrido	15,618	6,175	15,361	2	Pop2
h12	híbrido	15,103	7,201	15,589	2	Pop2
h13	híbrido	16,105	5,490	15,208	2	Pop2
h14	híbrido	16,323	6,536	14,816	2	Pop2
h15	híbrido	10,743	5,557	14,517	2	Pop2
h16	híbrido	15,618	6,940	15,905	2	Pop2
h17	híbrido	16,916	6,872	15,174	2	Pop2
h18	híbrido	16,060	6,612	15,021	2	Pop2
h19	híbrido	16,243	7,159	15,474	2	Pop2
h20	híbrido	16,578	7,283	15,514	2	Pop2
h21	híbrido	16,846	7,905	9,459	2	Pop2
h22	híbrido	15,996	7,269	14,127	2	Pop2
h23	híbrido	14,850	7,224	13,802	2	Pop2
h24	híbrido	17,147	7,826	11,010	2	Pop2
h25	híbrido	15,225	7,654	11,325	2	Pop2
h26	híbrido	13,368	6,807	15,763	2	Pop2
h27	híbrido	12,844	7,608	15,975	2	Pop2
h28	híbrido	12,659	7,544	11,573	2	Pop2
h29	híbrido	11,758	6,516	11,080	2	Pop2
h30	híbrido	6,804	3,163	5,215	2	Pop2
h31	híbrido	15,996	7,269	14,127	2	Pop2
h32	híbrido	17,068	10,569	11,497	2	Pop2
h33	híbrido	14,326	8,025	14,014	2	Pop2

Tabela 7: Valores do teste designação, considerando *log-Likelihoods* positivos, o menor valor indica a maior verossimilhança (Continuação).

Amostra	Pop	Pop1	Pop2	Pop3	Designação	
h34	híbrido	11,578	8,232	12,975	2	Pop2
h35	híbrido	14,442	7,107	12,052	2	Pop2
h36	híbrido	17,147	7,826	11,010	2	Pop2
h37	híbrido	18,422	10,102	11,537	2	Pop2
h38	híbrido	16,369	10,444	12,372	2	Pop2
h39	híbrido	15,774	10,694	12,637	2	Pop2
h40	híbrido	15,883	9,084	12,166	2	Pop2
h41	híbrido	13,625	6,046	12,174	2	Pop2
h42	híbrido	11,891	7,530	12,245	2	Pop2
h43	híbrido	10,965	6,217	8,194	2	Pop2
h44	híbrido	13,219	5,972	10,000	2	Pop2
h45	híbrido	13,625	6,046	12,174	2	Pop2
ca1	cachara cat	18,791	9,814	4,598	3	Pop3
ca2	cachara cat	16,005	9,249	4,351	3	Pop3
ca3	cachara cat	17,287	7,863	4,701	3	Pop3
ca4	cachara cat	21,424	10,649	5,447	3	Pop3
ca5	cachara cat	21,452	11,964	5,557	3	Pop3
ca6	cachara cat	19,841	11,901	5,010	3	Pop3
ca7	cachara cat	19,451	11,711	4,983	3	Pop3
ca8	cachara cat	18,702	10,229	5,114	3	Pop3
ca9	cachara cat	20,801	12,633	5,271	3	Pop3
ca10	cachara cat	18,251	9,962	5,423	3	Pop3
ca11	cachara cat	22,606	10,410	4,437	3	Pop3
ca12	cachara cat	19,696	11,617	7,110	3	Pop3
ca13	cachara cat	19,454	11,714	6,732	3	Pop3
ca14	cachara cat	15,761	8,691	4,379	3	Pop3
ca15	cachara cat	16,728	7,665	4,263	3	Pop3
ca16	cachara cat	19,145	9,217	4,504	3	Pop3
ca17	cachara cat	21,287	10,866	4,616	3	Pop3
ca18	cachara cat	21,400	11,037	5,069	3	Pop3
ca19	cachara cat	17,403	11,513	5,373	3	Pop3
ca20	cachara cat	19,312	11,424	5,735	3	Pop3
ca21	cachara cat	18,929	10,873	5,813	3	Pop3
ca22	cachara cat	18,488	10,780	5,709	3	Pop3
ca23	cachara cat	17,994	11,096	5,938	3	Pop3
ca24	cachara cat	20,685	11,237	5,763	3	Pop3

Tabela 7: Valores do teste designação, considerando *log-Likelihoods* positivas, o menor valor indica a maior verossimilhança (Continuação).

Amostra	Pop	Pop1	Pop2	Pop3	Designação	
ca25	cachara cat	20,704	12,091	6,653	3	Pop3
2	cachara sel	20,261	13,815	11,655	3	Pop3
3	cachara sel	22,110	9,148	8,792	3	Pop3
6	cachara sel	21,804	12,626	9,794	3	Pop3
9	cachara sel	22,718	10,505	8,890	3	Pop3
17	cachara sel	22,963	15,754	12,843	3	Pop3
21	cachara sel	18,075	12,211	6,080	3	Pop3
23	cachara sel	18,198	10,550	6,894	3	Pop3
25	cachara sel	21,481	11,836	7,723	3	Pop3
26	cachara sel	24,871	15,532	10,340	3	Pop3
28	cachara sel	18,357	10,427	4,994	3	Pop3
29	cachara sel	19,841	11,524	5,679	3	Pop3
31	cachara sel	18,357	9,299	4,516	3	Pop3

Gráfico 2: Teste de designação entre a pop1 (*P.corruscans*) e pop2 (Híbrido). Gráfico gerado pelo programa GenALEx6. Pop 1 n=47 e Pop 2 n=44.

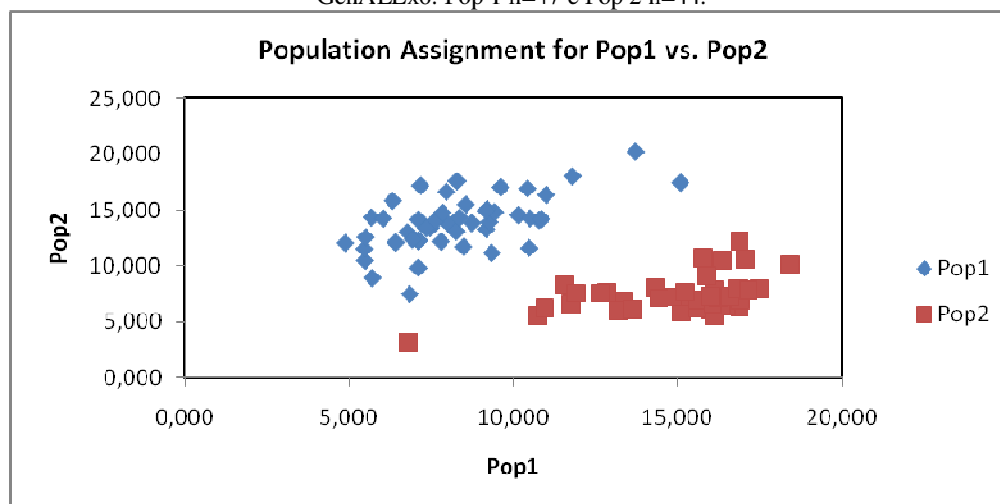


Gráfico 3: Teste de designação entre a Pop1 (*P. corruscans*) e Pop3 (*P. reticulatum*). Gráfico gerado pelo programa GenALEx6. Pop1 n=47 e Pop 2 n=37.

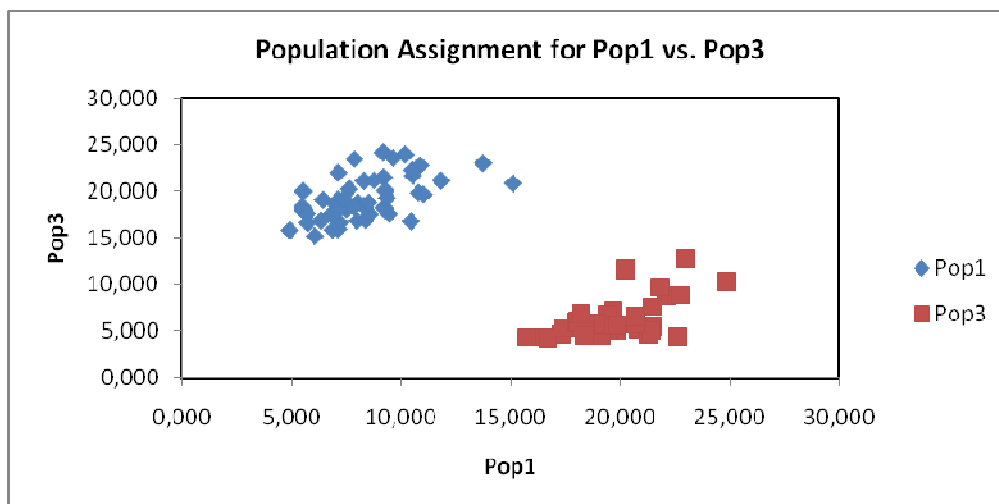
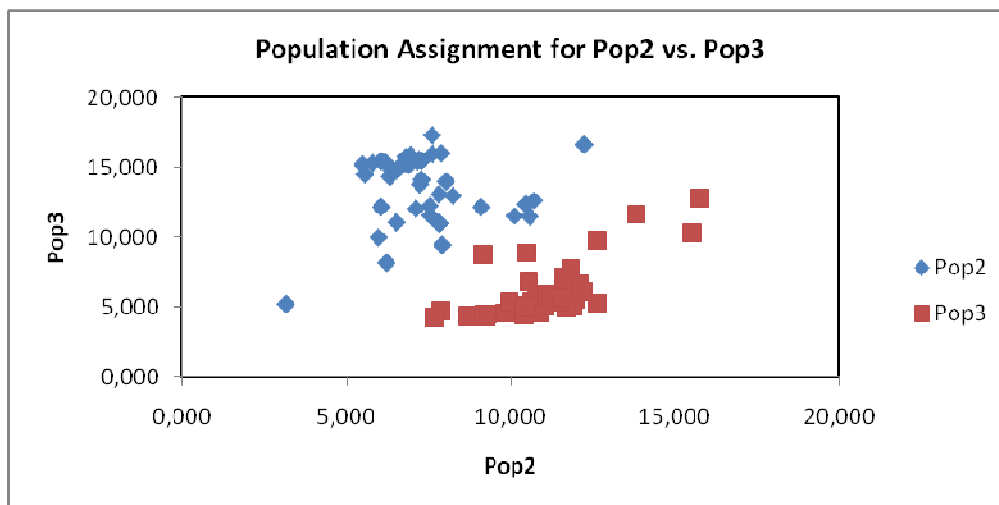


Gráfico 4: Teste de designação entre a Pop2 (Híbrido) e Pop3 (*P. reticulatum*). Gráfico gerado pelo programa GenALEx6. Pop 2 n=44 e Pop 3 n=37.



REFERÊNCIAS

ALVES, Carlos Bernardo M. et al. Impacts of non-native fish species in Minas Gerais, Brazil: present situation and prospects. In: BERT, Theresa M. (Ed.). *Ecological and Genetic Implications of Aquaculture Activities*. Dordrecht: Springer, p. 291-314, 2007.

ARNOLD, Michael L. e HODGES, Scott A. Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? *Trends in Ecology & Evolution*, v. 10 (2): 67-71, 1995.

BURGESS, Warren E. *An atlas of freshwater and marine catfishes: a preliminary survey of the Siluriformes*. Neptune City: T.F.H. Publications, 1989.

CARVALHO, Daniel Cardoso. *Identificação e caracterização de regiões microssatélites de Prochilodus lineatus (Pisces, Characiformes)*. Dissertação (Mestrado em Farmacologia e Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte: UFMG, 2002.

CHEVASSUS, B. Hybridization in fish. *Aquaculture*, v. 33 (1-4): 254-262, 1983.

CREPALDI, Daniel V. et al. Comparação do desempenho de surubim puro, *P. Coruscans* e o híbrido *P. Coruscans x P. Fasciatum* em 3 densidades de estocagem. *Anais do World Aquaculture Society*. Salvador: World Aquaculture Society, 2003.

FERGUSON, A. et al. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. *Journal of Fish Biology*, v. 47 (supl. A): 103-126, 1995.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Global Statistical Collections, 2007. Disponível em: <<http://www.fao.org/fishery/statistics/en>>. Acesso em: 30 ago 2009.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. The state of world fisheries and aquaculture, 2006. Disponível em: <www.fao.org/docrep/009/a0699e/a0699e00.htm>. Acesso em 05 set 2008.

GODINHO, Hugo P. et al. Pesca e biologia do surubim *Pseudoplatystoma coruscans* no rio São Francisco. In: MIRANDA, M.O.T. (Org.). *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA, p.27-42 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19), 1997.

KUBITZA, Fernando; CAMPOS, J. L. e BRUM, J. A. Surubim: produção intensiva no Projeto Pacu Ltda e Agropeixe Ltda. *Panorama da Aqüicultura*, v.49: 25-32, 1998.

KUBITZA, Fernando. O mar está pra peixe... pra peixe cultivado. *Panorama da Aqüicultura*, v.100: 14-23, 2007.

MAYR, E. The breakdown of isolating mechanisms (hybridization). In: MAYR, E. *Animal species and evolution*. Cambridge: Belknap Press, p. 110-135, 1963.

MIRANDA, M. O. T e RIBEIRO L. P. Rendimentos de processamento do Surubim *Pseudoplatystoma corruscans*. In: MIRANDA, M.O.T. (Org.). *Surubim*. Belo Horizonte: IBAMA, p.101-112 (Coleção Meio Ambiente, Série Estudos Pesca, 19), 1997.

PAETKAU, D. et al. Genetic assignment methods for direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, v.13: 55-65, 2004.

REVALDAVES, Eloísa et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, v.5: 463-465, 2005.

ROMAGOSA, E. et al. Biologia reprodutiva de fêmeas de cachara, *Pseudoplatystoma fasciatum* (teleostei, siluriformes, pimelodidae), mantidas em cativeiro. *Boletim do Instituto de Pesca*, v.29 (2): 151-159, 2003.

SCHOLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromossoma*, v.109: 365-371, 2000.

SEAP - SECRETARIA ESPECIAL DE AQUICULTURA E PESCA. Disponível em <http://www.presidencia.gov.br/estrutura_presidencia/seap/>. Acesso em: 05 set 2009.

SOUZA, Alexandre Benvindo. Estudo molecular de *Pseudoplatystoma corruscans* e do híbrido *P. corruscans* X *P. fasciatum*: uma análise com marcadores microssatélites. Relatório de Estágio de Pós-doutorado. CNPq, 2007.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v.17: 6463-6471, 1989.

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. *Programas genéticos de seleção, hibridação e endocruzamento aplicados à piscicultura*. São Paulo: CCS/USP, 1998. (Cadernos de Ictiogenética 4).

TOLEDO-FILHO, S. A. et al. *Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios*. São Paulo: CCS/USP, 1992. (Cadernos de Ictiogenética 1).

SAMBROOK, Joseph; FRITISCH, Edward F. e MANIATIS, Thomas. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N. e GODINHO, H. P. Reprodução induzida de peixes da Bacia do São Francisco. In: GODINHO, H. P. e GODINHO, A. (Org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, p. 274-290, 2003.

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

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. (Ed.) *Biologia molecular e evolução*. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

SMITH, M. A. et al. DNA barcodes reveal cryptic host-specificity within the presumed polyphagous members of a genus of parasitoid flies (Diptera: Tachinidae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, v.103: 3657-3662, 2008.

VIERIA, Fábio e POMPEU, Paulo. Peixamentos, uma alternativa eficiente? *Revista Ciência Hoje*, v.175: 29-33, 2001.

WRIGHT, J. M.; BENTZEN, P. Microsatellites: genetic markers of the future. *Review in Fish Biology and Fisheries*, v.4: 384-388, 1994.