

KARINE KELLY CAVALCANTI OLIVEIRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MICROSSATÉLITES PARA
ESTUDOS GENÉTICOS DO PIAU-VERDADEIRO, *Leporinus elongatus*
(VALENCIENNES, 1850), NA BACIA DO SÃO FRANCISCO**

RECIFE,

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MICROSSATÉLITES PARA
ESTUDOS GENÉTICOS DO PIAU-VERDADEIRO, *Leporinus elongatus*
(VALENCIENNES, 1850), NA BACIA DO SÃO FRANCISCO**

Karine Kelly Cavalcanti Oliveira

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

Profa. Dra. MARIA RAQUEL MOURA COIMBRA
Orientadora

Recife,
Agosto/2012

Ficha catalográfica

Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central - UFRPE

O48d

Oliveira, Karine Kelly Cavalcanti

Desenvolvimento e validação de microssatélites para estudos genéticos do piau-verdadeiro, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1850), na bacia do São Francisco / Karine Kelly Cavalcanti Oliveira. -- Recife, 2012.
55 f. : il.

Orientador (a): Maria Raquel Moura Coimbra.

Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Pesca e Aquicultura, Recife, 2012.

Inclui referências e anexos.

1. Aquicultura sustentável 2. Biblioteca enriquecida
3. Microssatélites tetranucleotídicas 4. *Leporinus elongatus*
5. conservação genética 6. repovoamento I. Coimbra,
Maria Raquel Moura, Orientadora II. Título

CDD 639.3

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MICROSSATÉLITES PARA
ESTUDOS GENÉTICOS DO PIAU-VERDADEIRO, *Leporinus elongatus*
(VALENCIENNES, 1850), NA BACIA DO SÃO FRANCISCO**

Karine Kelly Cavalcanti Oliveira

Dissertação julgada adequada para obtenção do título de mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura. Defendida e aprovada em 28/08/2012 pela seguinte Banca Examinadora.

Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra - Orientadora
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Reginaldo de Carvalho - Membro externo
Departamento de Biologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Roberto Eleutério de Souza - Membro externo
Departamento de Biologia
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof. Dr. Paulo Guilherme Vasconcelos de Oliveira - Membro interno
Departamento de Pesca e Aquicultura
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Ricardo e Conceição, pelo amor, carinho e apoio que me deram durante minha vida toda. Aos meus irmãos, Kíria, Ricardinho e Kiara, por sempre me motivar, ajudar e apoiar minhas lutas.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura da Universidade Federal Rural de Pernambuco pela oportunidade de realizar este trabalho.

À Profa. Dra. Maria Raquel Moura Coimbra pela orientação neste estudo, dedicação à pesquisa em genética de peixe e, em particular, pelos anos de convivência, enorme contribuição para a minha formação, apoio e grande incentivo. Um grande exemplo de pesquisadora. Mais uma vez, obrigada por acreditar em mim.

À CHESF pelo financiamento deste trabalho de pesquisa.

À CAPES, pela bolsa concedida, que serviu de apoio para realização do trabalho e aprendizado.

Às minhas inestimáveis amigas que estiveram sempre presentes e marcaram minha vida de forma indelével: Patrícia, Hozana e Maíra. Aqui não poderia faltar Miguel, que me mostrou o quanto precisamos ser obstinados para alcançar cada vitória.

Aos colegas e estagiários do LAGA (Suzianny, Suzanny, Samantha, Mondrian e Marcos) pela dedicação constante à execução das atividades de rotina no laboratório, sem a qual nenhum experimento ou estudo poderia ser concluído com êxito.

À CODEVASF pelo apoio técnico nas coletas.

Aos colegas de curso e aos funcionários do Depaq, com os quais a convivência foi amistosa e agradável.

A todos que contribuíram de alguma forma para realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

Resumo

O piauí-verdadeiro (*Leporinus elongatus*) é um peixe de água doce que habita rios das bacias do Paraná-Paraguai e do São Francisco. Ao longo destas regiões foram construídos imensos barramentos para geração de energia, o que vem prejudicando a migração reprodutiva de muitas espécies. As populações de *L. elongatus* têm diminuído, com maior declínio na região do submédio São Francisco. Muitas empresas hidrelétricas e governamentais realizam repovoamento sem a preocupação com princípios ecológicos, tão pouco genéticos. Estas ações de manejo, em longo prazo, podem provocar uma diminuição na diversidade genética destes estoques, o que pode agravar a adaptação destas populações. Neste trabalho, marcadores de microsatélites de *L. elongatus*, foram construídos através de uma biblioteca genômica enriquecida para motivos tetranucleotídeos (GACA)₄ e (GATA)₇. De um total de 14 marcadores que amplificaram consistentemente, sete foram monomórficos e sete, polimórficos. Todos os marcadores amplificaram com sucesso para o *L. elongatus*, no entanto, para espécies do mesmo gênero, *L. reinhardt* e *L. taeniatus*, apenas o marcador Lelo 12 amplificou para o *L. reinhardt*. Os sete marcadores polimórficos foram avaliados em uma população selvagem de 44 indivíduos capturados no Alto São Francisco (MG). O número de alelos variou de cinco a 29, as heterosigozidades observadas e esperadas variaram de 0,568 a 0,977 e de 0,533 a 0,964, respectivamente. Todos os marcadores estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não apresentaram alelos nulos, entretanto, dois marcadores, Lelo 4 e Lelo 14 estão ligados em um mesmo cromossomo. Esses são os primeiros marcadores de microsatélite desenvolvidos para esta espécie e suas características permitem que sejam usados em estudos de genética populacional, conservação e monitoramento de programas de repovoamento do rio São Francisco.

Palavras-chave: biblioteca enriquecida, microsatélites tetranucleotídicas, *Leporinus elongatus*, conservação genética, repovoamento

Abstract

The piau-verdadeiro (*Leporinus elongatus*) is a freshwater fish that inhabits rivers of Paraná-Paraguai and São Francisco basins. Along these regions were built huge dams for power generation, which is hindering the reproductive migration of many species. Populations of *L. elongatus* have decreased, with greater decline in the region of sub-middle São Francisco. Many electric companies and government are restocking perform without worrying about ecological principles, so little genetic. These management actions, in the long run, may lead to a decrease in the genetic diversity of these stocks, which can aggravate the adaptation of these populations. In this study, microsatellite markers of *L. elongatus* were constructed through a genomic library enriched for tetranucleotide motifs (GACA)₄ and (GATA)₇. Of a total of 14 markers that consistently amplified, seven were monomorphic and seven polymorphic. All markers successfully amplified for *L. elongatus*, however, for species of the same genus, *L. reinhardt* and *L. taeniatus*, only the marker Lelo 12 amplified to *L. reinhardt*. The seven polymorphic markers were assessed in a wild population of 44 individuals caught in the Upper São Francisco (MG). The number of alleles varied between five (Lelo 20) to 29 (Lelo 13), the observed and expected heterozygotes ranged from 0.568 to 0.977 and from 0.533 to 0.964, respectively. All the markers studied are in Hardy-Weinberg equilibrium and null alleles were not detected, however, two markers, Lelo 4 and Lelo 14 are connected on the same chromosome. These are the first microsatellite markers developed for this species and its characteristics allow it to be used in studies of population genetics, conservation and monitoring of restocking programs of the São Francisco River.

Key words: Enriched library, tetranucleotide microsatellite, *Leporinus elongatus*, genetic conservation, restocking.

Lista de figuras

	Página
Figura 1- Bacia do rio São Francisco.....	15
Figura 2- Exemplar de <i>Leporinus elongatus</i>	19

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1- Diversidade genética para sete <i>loci</i> de microssátelite em uma população de <i>Leporinus elongatus</i>	42

Sumário

1- Introdução	12
2- Revisão de Literatura	14
2.1- A bacia hidrográfica do São Francisco: rio São Francisco e seus tributários	14
2.2- Barramentos: impactos socioambientais	16
2.3- Ictiofauna da bacia do rio São Francisco	17
2.4- Sobre o <i>Leporinus elongatus</i>	18
2.5- As ações de repovoamento e conservação	20
2.6- Marcadores moleculares: ferramentas para estudos de genética de populações	22
3. Referências Bibliográficas	24
4. Artigo Científico	31
ANEXO	43
4.1- Normas da Revista Molecular Ecology Resources	44

1- Introdução

A família Anostomidae (Characiformes), um importante grupo de peixes de água doce neotropical, é composta por 12 gêneros (GÉRY, 1977). O gênero *Leporinus* é o mais diversificado dentre os anostomídeos, com espécies que se destacam no continente sul-americano como importante recurso pesqueiro para as comunidades ribeirinhas, como *Leporinus macrocephalus*, *Leporinus obtusidens* e *Leporinus elongatus* (MARTINS, 2003), popularmente conhecidas como piaus.

O gênero *Leporinus* é preferencialmente herbívoro, além de apresentar o maior número de espécies dentre os anostomídeos, com 87 espécies válidas (GARAVELLO e BRITSKI, 2003). O *Leporinus elongatus* (VALENCIENNES, 1850), conhecido como piau-verdadeiro, habita as regiões da bacia do Prata e do São Francisco (GARAVELLO e BRITSKI, 2003).

Esta espécie vem sendo bastante recomendada para a piscicultura por apresentar um ganho de peso favorável e boa conversão alimentar, podendo atingir mais de 1,0 kg de peso no período de um ano. Quanto à reprodução são reofílicos, ou seja realizam a piracema, reproduzindo-se na época das cheias nos rios (MOREIRA et al., 2001).

Diversas construções ao longo do rio São Francisco, como as barragens do complexo de Paulo Afonso, Itaparica, Sobradinho e Xingó, impedem que populações de peixes reofílicos efetuem migrações reprodutivas, contribuindo para a diminuição e até mesmo extinção de espécies migratórias. Em águas continentais, programas de repovoamento são frequentemente empregados como ação mitigadora de estoques ameaçados de extinção. Nestas ações é essencial o conhecimento da estrutura genética e da diversidade do recurso em questão, a fim de bem integrar animais oriundos de repovoamento com animais selvagens.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

Estes barramentos também causam o isolamento de populações, que podem alterar a estruturação genética através da redução do fluxo gênico, modificar as frequências alélicas, bem como diminuir a variabilidade genética destas populações (AGOSTINHO et al., 2002).

O conhecimento prévio da distribuição da variabilidade genética dentro e entre populações de uma espécie é uma etapa inicial importante para o desenvolvimento de medidas de conservação (RAMOS, 2007).

A estrutura e diversidade genética das populações podem ser investigadas através do polimorfismo do DNA, através do emprego de marcadores moleculares, como os de microssatélite. Tais marcadores apresentam alto polimorfismo, codominância e seletividade neutra.

Até o presente, não há registro de marcadores de microssatélites descritos para o *Leporinus elongatus*, tampouco de um levantamento sobre a diversidade e estrutura genética de populações selvagens na Bacia do São Francisco.

Com base nas informações supracitadas, o presente trabalho realizou o desenvolvimento e validação de marcadores de microssatélites para o *Leporinus elongatus*.

A partir da disponibilidade dos marcadores aqui propostos será possível realizar a análise da diversidade e estruturação genética de populações selvagens, bem como orientar a construção de estoques de fundadores em programas de repovoamento, visando a manutenção da diversidade genética e, assim, proporcionar melhores chances de sobrevivência das populações introduzidas.

2- Revisão de Literatura

2.1- A bacia hidrográfica do São Francisco: rio São Francisco e seus tributários

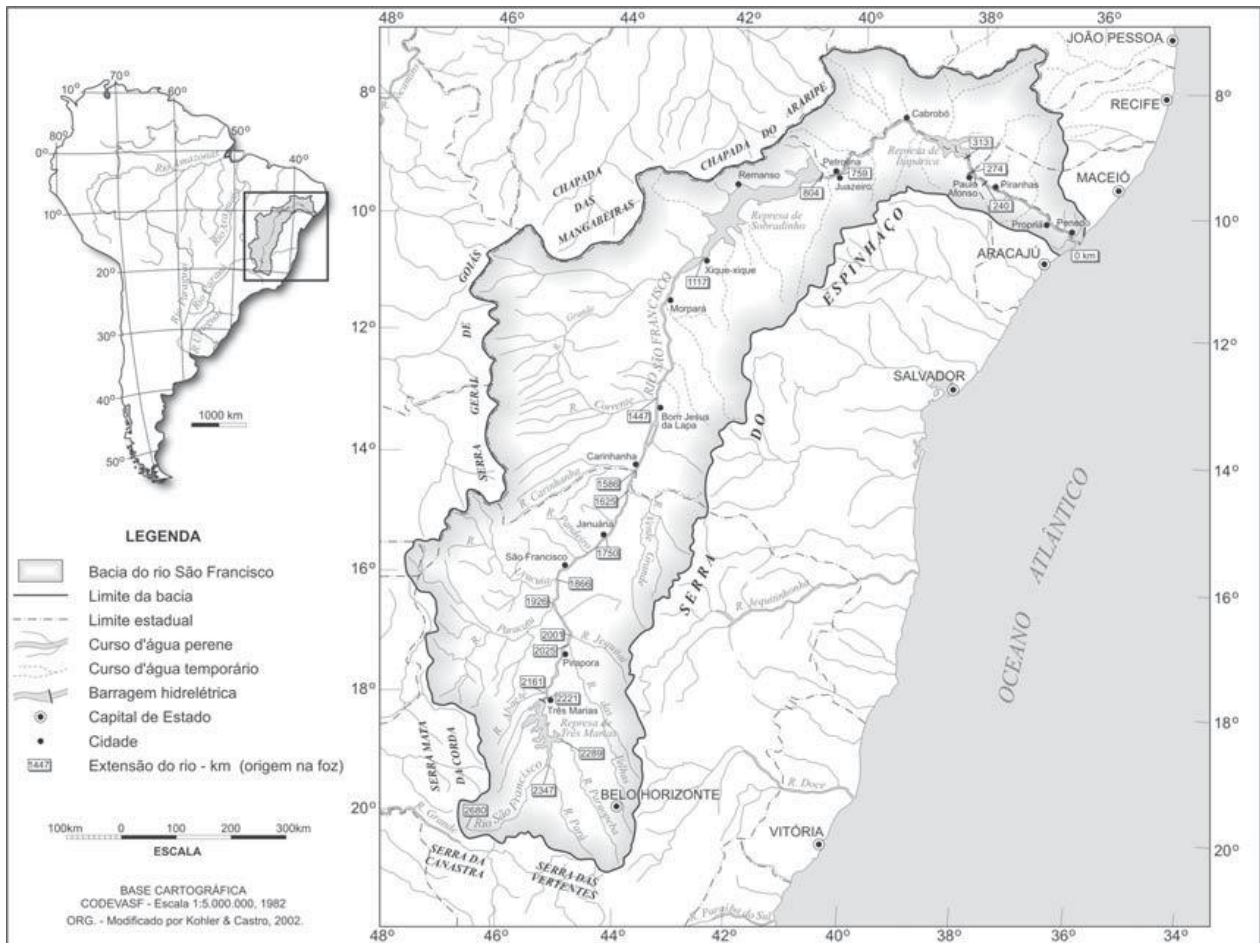
A bacia hidrográfica do rio São Francisco é considerada a terceira maior bacia do Brasil, drenando uma área aproximada de 645.000 km² (Figura 1), correspondendo a cerca de 8% do território nacional, além disso, é a única contida integralmente em território brasileiro (KOHLER, 2003). Esta bacia abrange os três grandes biomas do país, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica, drenando os estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, além do Distrito Federal (GODINHO e GODINHO, 2003). Essa característica geográfica lhe impõe grande importância como “rio da integração nacional”, ligando o sudeste ao nordeste do país.

De acordo com Paiva (1982), a bacia do São Francisco compreende quatro regiões geográficas: “alto” que se estende da nascente até Pirapora-MG (630 km); “médio” que é o maior trecho entre Pirapora e Remanso (1090 km); “submédio” que segue de Remanso até Paulo Afonso (686 km) e “baixo” São Francisco, área mais curta, compreendida entre as cachoeiras de Paulo Afonso e a foz (274 km).

O rio São Francisco é o principal rio desta bacia e, um dos mais longos rios da América do Sul, nasce na região da serra da Canastra e tem sua foz no oceano Atlântico entre os Estados de Alagoas e Sergipe, com extensão total de 2.700 km (GODINHO e GODINHO, 2003). Há diversos tributários que deságuam no rio, sendo os mais importantes os rios do alto e médio São Francisco, tais como o Paraopeba (MG), das Velhas (MG), Paracatu (MG), Urucuia (MG), Corrente (BA) e Grande (BA), todos perenes (GODINHO e GODINHO, 2003). Já os tributários situados no semiárido são intermitentes, ou seja, secam nos períodos em que o regime de chuvas é baixo e produzem grandes torrentes na época de alta pluviosidade ANA (Agência Nacional de Águas), 2010.

Como principal atividade econômica desta bacia, tem-se a produção de energia e a agricultura irrigada, seguidos pela mineração, carvoaria, siderurgia e pesca, segundo estudo técnico realizado pela ANA (ANA/GEF/PNUMA/OEA et al., 2004). Nesse estudo, também foi verificado que, além da intensa atividade econômica, as descargas de efluentes industriais e domésticos, bem como, um acelerado processo de assoreamento (devastação da mata ciliar nesta bacia), comprometem esse ecossistema.

Segundo Alves e Pompeu (2001) a área do alto São Francisco é a região mais contaminada, as águas nesta região são bastante poluídas pela atividade mineradora, além de ser a porção mais povoada da bacia.



Os rios Paraopeba e das Velhas são os principais rios, que sofrem com esta degradação, pois estão localizados na região de maior desenvolvimento econômico e, também de maior densidade populacional, ainda que, os efeitos desta poluição sejam percebidos ao longo de todo o rio (ALVES e POMPEU, 2001). Um estudo feito na região de Minas Gerais, onde está localizado o rio Paraopeba, apontou que esta área é de “alta importância biológica”, pois foi observada a ocorrência do pirá (*Conorhynchus conirostris*), peixe símbolo da bacia e que está extinto no baixo São Francisco a mais de 15 anos (ANA/GEF/PNUMA/OEA et al., 2003).

Dada sua importância ecológica, os afluentes são primordiais pois funcionam como berçários naturais para as espécies de peixes de água doce, inclusive as migratórias, como ficam evidentes em trabalhos feitos nas bacias do Orinoco (MACHADO-ALLISON, 1994), da Amazônia (BAYLEY, 1988), do Paraná (CORDIVIOLE DE YUAN, 1992; AGOSTINHO e ZALEWSKI, 1995) e também do São Francisco (SATO et al., 1987). Neste último trabalho, os autores destacaram que o trecho rico em lagoas marginais, livre de grandes barragens hidrelétricas está compreendido entre Pirapora (MG) e Petrolina (PE), sendo um ambiente importante para o recrutamento de peixes.

2.2- Barramentos: impactos socioambientais

Muitos estudos mostram que no mundo a maior parte dos grandes rios está fragmentada pelos barramentos, e esta ruptura modifica os padrões de migração entre as populações de peixes, pois converte os rios de fluxo livre para imensos reservatórios (JAGER et al., 2001; NILSSON et al., 2005). Em 2008 o sistema de barragens proporcionou ao Brasil o terceiro lugar mundial em produção de hidroenergia (KEY WORLD ENERGY STATISTICS, 2010). As hidrelétricas são conhecidas como fonte de energia limpa e renovável. Apesar deste conceito, essa atividade é

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

apontada como uma das principais causas de diminuição dos peixes migradores (de piracema) ao longo dos rios, em diversas partes do mundo (SWALES, 1994; HELFMAN et al., 2009). No rio São Francisco existem sete grandes hidroelétricas (Três Marias, Sobradinho, Itaparica, Moxotó, complexo de Paulo Afonso e Xingó), que provocaram profundas modificações no ecossistema, afetando a migração reprodutiva dos peixes, mas também a dinâmica das comunidades ribeirinhas (AGOSTINHO, 1992).

Outra problemática em destaque é a diminuição de áreas fertilizadas pelas enchentes, isto ficou evidente na região do submédio e baixo São Francisco, onde anualmente as terras próximas às margens dos rios eram inundadas pelas águas das grandes chuvas, comprometendo uma atividade econômica local importante, a agricultura de vazante (COELHO, 2005). Além disto, essas construções proporcionaram uma redução na correnteza das águas, provocando deposição gradual de sedimentos e consequentemente assoreamento, erosão marginal e diminuição gradativa da capacidade de armazenamento do reservatório, o que provocou a extinção de diversas lagoas marginais, que serviam de criatórios de peixes, diminuindo assim a biodiversidade aquática (ANA/GEF/PNUMA/OEA et al., 2004).

2.3- Ictiofauna da bacia do rio São Francisco

Na bacia do São Francisco, existem pelo menos 158 espécies de água doce, em sua maioria pertencente aos Characiformes e Siluriformes (SATO e GODINHO, 1999). Segundo Sato et al. (2003) cerca de 8% destas espécies sobem o rio para reproduzir e, destes mais da metade são migradores de longa distância, todos importantes para a pesca comercial como: curimatã-pacu (*Prochilodus argenteus*), curimatã-pioa (*Prochilodus costatus*), dourado (*Salminus franciscanus*),

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

matrinxã (*Brycon orthotaenia*), piau-verdadeiro (*Leporinus elongatus*), pirá (*Conorhynchus conirostris*) e surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*).

No São Francisco, a migração reprodutiva é anual, normalmente ocorrendo entre os meses de outubro e janeiro, período da estação chuvosa e, portanto, maior aporte de água e temperaturas mais elevadas, importantes para estimular a desova (SATO e GODINHO, 2003). Estes autores, também verificaram que estes peixes deslocam-se até o canal principal do rio e seguem para os afluentes, que são os locais de desova.

De acordo com Sato e Godinho (1999) nas últimas décadas, além das espécies nativas do São Francisco, têm-se também observado a presença de espécies exóticas com populações estabelecidas na bacia nas últimas décadas, como tucunaré (*Cichla* spp.), corvina (*Plagioscion squamosissimus*), carpa (*Cyprinus carpio*), bagre-africano (*Clarias gariepinus*), tambaqui, (*Colossoma macropomum*), tilápia (*Oreochromis* sp).

Essa ictiofauna encontra-se bastante ameaçada em várias regiões, principalmente no trecho à jusante da barragem de Sobradinho até o Oceano Atlântico, onde espécies reofílicas foram condenadas à extinção em um período inferior a 30 anos, de acordo com relatos das associações de pescadores da região. À montante da barragem de Três Marias e nos tributários do Paraopeba e das Velhas, a escassez se deve a poluições industrial e doméstica, ao garimpo (diamante e ouro), à pesca predatória e à destruição de várzeas e lagoas marginais pelos projetos agrícolas (MENEZES, 1996; SATO e GODINHO, 1999).

2.4- Sobre o *Leporinus elongatus*

O gênero *Leporinus* é o mais diversificado dentre os anostomídeos, com espécies que se destacam no continente sul-americano como importante recurso pesqueiro para as comunidades

OLIVEIRA, K.K.C., Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...

ribeirinhas, como o *L. macrocephalus* e o *L. elongatus* (MARTINS, 2003). O *Leporinus elongatus* (Figura 2) é um dos maiores peixes dentre os anostomídeos, podendo atingir 7,5 kg de peso corporal (GARAVELLO, 1979; GODOY, 1975). É nativo das bacias do Paraná-Paraguai (bacia do Prata) e do São Francisco (SATO e GODINHO, 2003), sendo conhecida como “piapara” na bacia do Prata e como “piau-verdadeiro” no São Francisco. É uma espécie preferencialmente herbívoro-insetívora, mas pode alimentar-se de pequenos crustáceos e plâncton (FONTENELE e VASCONCELOS, 1977), recentemente, foi classificada como onívora (DURÃES et al., 2001).



Figura 2- Exemplar de *Leporinus elongatus*. Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com Sato et al., 2003, o *L. elongatus* é o maior migrador dentre os três gêneros de anostomídeos, que estão presentes no São Francisco. O piau-verdadeiro apresenta migrações reprodutivas, entre os meses de dezembro e janeiro, momento em que as águas apresentam condições físico-químicas adequadas para a desova (GODOY, 1975; VAZZOLER, 1996).

O *L. elongatus* possui grande aceitação no mercado, tanto na pesca comercial como esportiva por apresentar excelente qualidade da carne e comportamento agressivo quando os adultos são capturados em anzol e, ainda, é apreciado por colecionadores de peixes ornamentais (juvenis). Na aquicultura o piau-verdadeiro apresenta características zootécnicas promissoras, como facilidade de reprodução em cativeiro, tolerância ao manejo e fácil aceitação de ração (REYNALTE-TATAJE, et al., 2001). Devido às diversas alterações no ambiente aquático, os estoques de *L. elongatus* vêm diminuindo na região do rio São Francisco (ANA/GEF/PNUMA/OEA et al., 2004).

2.5- As ações de repovoamento e conservação

A fragmentação dos rios que interrompem as migrações e delimita as áreas de reprodução, comprometem seriamente as populações de peixes. Esta situação desperta a necessidade de se investir em programas de propagação artificial que recuperem estes recursos (GODINHO et al., 1997).

O repovoamento é uma das estratégias mais empregadas para diminuir os impactos dos barramentos, esse tipo de manejo consiste em montar um estoque de reprodutores a partir de populações selvagens, realizar a reprodução em cativeiro e, por fim, reintroduzir os peixes nas represas e rios (AGOSTINHO et al., 2007). No entanto, esta prática de estocagem ou peixamento há anos vem sendo adotada por agências federais, estaduais, municipais e, eventualmente,

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

privadas, como uma tentativa de reestruturar populações deplecionadas ou para aumentar o rendimento da pesca (soltura de curimatã-pacu, por exemplo). Todavia, a ausência de regulamentação para repovoamento em águas continentais faz com que estas práticas tenham pouco efeito ou efeitos adversos sobre a ictiofauna. Salvo algumas iniciativas, é comum a utilização de uns poucos reprodutores nas desovas, muitas vezes de origens desconhecidas, além de ser frequente o exercício da seleção artificial em que matrizes com características zootécnicas mais adequadas são privilegiadas. Esse tipo de manejo compromete não só a diversidade genética, mas também elimina adaptações locais, com consequências desastrosas.

Em uma escala mundial, tentativas de repovoamento que não aderiram a princípios ecológicos e genéticos produziram poucos benefícios; em alguns casos, contribuíram para o declínio de populações selvagens de salmão (MILLER e KAPUSCINSKI, 2003), que está entre as espécies mais repovoadas artificialmente. Estes autores advertem, ainda, que sem a aderência a estes princípios, a integração pretendida entre os animais do cativeiro e do ambiente selvagem pode ter consequências desastrosas. À conservação genética deve ser dada prioridade máxima porque a sustentabilidade, em longo prazo, depende da capacidade da espécie evoluir em ambiente selvagem, o que por sua vez depende da manutenção da sua diversidade genética (REISENBICHLER e McINTYRE, 1977). Ao contrário do que se pensa a liberação sem preocupação, mesmo de espécies nativas, que foram cultivadas em cativeiro, também pode promover degeneração genética (VIEIRA e POMPEU, 2001).

As empresas hidrelétricas brasileiras vêm desenvolvendo ações de repovoamento há mais de 35 anos, em cumprimento a um imperativo legal e como condicionante de operação de seus empreendimentos, mas sem uma orientação quanto a critérios genéticos e ecológicos. Nos últimos anos, a construção de uma Instrução Normativa de regulamentação foi inicialmente

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

proposta pelo IBAMA, mas sua responsabilidade foi transferida ao Ministério da Pesca e Aquicultura. Os textos iniciais exaltavam a preocupação com a manutenção da diversidade genética de cada espécie. Em breve, as empresas hidrelétricas terão de apresentar suas ações de repovoamento devidamente adequadas à Instrução Normativa, que apesar de não ter sido ainda concluída, já apresenta como requisito básico o levantamento da diversidade e estrutura genética das populações selvagens, deixando claro que programas de repovoamento deve ser objeto de intenso controle.

2.6- Marcadores moleculares: ferramentas para estudos de genética de populações

Genética de populações é o ramo da genética que estuda não só a variabilidade genética das populações, mas também de que forma estas populações se estruturam. Para medir a variabilidade genética utilizam-se marcadores moleculares, que são pequenas regiões do DNA apresentando polimorfismo entre indivíduos de uma mesma espécie (LIU, 1998). Os marcadores permitem identificar alelos, que são formas diferentes de um mesmo gene. Assim, parâmetros genéticos como frequências alélicas, heterozigosidades esperada e observada, desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que medem a diversidade genética (ZUCCHI, 2002).

Diversas aplicações são possíveis com o uso de marcadores tais como a avaliação da variabilidade genética em cruzamentos endogâmicos, transmissão parental, caracterização de espécies e linhagens, hibridização e construção de mapas de ligação para a identificação de *loci* de herança quantitativa (QTLs) (WANG et al., 2011).

Dentre os marcadores moleculares, destacam-se os de microssatélite que possuem todas as características desejáveis para estudos de genética de populações, incluindo o alto polimorfismo, co-dominância e seletividade neutra (POWELL et al., 1996). Microssatélites são repetições

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

simples de pequenas unidades no genoma, de dois a seis pares de bases, chamados motivos, organizados em série (CHISTIAKOV et al., 2006). O polimorfismo de microssatélites é baseado na diferença de tamanho de cada bloco de repetição em série de um locus específico. A região repetitiva pode ser amplificada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando *primers* complementares às regiões flanqueadoras, o que requer quantidades mínimas de DNA para as reações. Dentre as suas variadas aplicações, eles podem ser utilizados em estudos que abordam análises de estrutura genético-populacional (ROURKE e GILLIGAN, 2010; SANCHES et al., 2012).

Um estudo conduzido por Gomes et al. (2008) utilizou marcadores do tipo *Random Amplified Polymorphism DNA* (RAPD) para avaliar a estrutura genética de três estoques de *L. elongatus*, incluindo animais de um programa de repovoamento do rio Paraná. Esta técnica, contudo, é muito criticada porque apresenta baixa reprodutibilidade e por frequentemente gerar bandas potencialmente falsas (PEREZ et al., 1998, RABOUAM et al., 1999).

Morelli et al. (2010) desenvolveram oito marcadores de microssatélites para o *Leporinus macrocephalus* e, todos mostraram-se polimórficos para o *Leporinus elongatus*. No entanto, tais marcadores são de repetições dinucleotídicas, o que pode tornar difícil a genotipagem em géis de poliacrilamida.

Até o momento, não há marcadores de microssatélites desenvolvidos para *Leporinus elongatus* na literatura e, portanto, o conhecimento da variabilidade e estrutura genética dos estoques selvagens nas bacias brasileiras é limitado.

A partir da disponibilidade destes marcadores, será possível desenvolver os estudos necessários de genética populacional da espécie na bacia do São Francisco, que é um requisito aos programas de repovoamento. Em longo prazo, o conjunto de marcadores obtidos servirá para

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

monitorar os efeitos do repovoamento e realizar os ajustes necessários. Tais marcadores constituirão um legado permanente para a espécie e poderão ser utilizados por várias agências competentes como referência para a gestão de seus programas de repovoamento.

3. Referências Bibliográficas

AGOSTINHO, A. A. **Conservação e Manejo de Recursos Aquáticos: Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios.** In: AGOSTINHO, A. A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. (Eds.). Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil: Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia. Maringá: EDUEM, p. 106 – 121, 1992.

AGOSTINHO, A. A. e ZALEWSKI, M. The dependence of fish community structure and dynamics on floodplain and riparian ecotone zone in in Parana River, Brazil. **Hydrobiologia**, n. 303 (1-3), p. 141-148. 1995.

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

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L.; FERNANDES RODRIGUEZ, D.; SUZUKI, H. Efficiency of fish ladders for neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, v.18, p.299-306, 2002.

AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A. E. A. M.; THOMAZ, S. M. The high River Paraná Basin: limnological and ichthyological aspects. In: **Limnology in Brazil**, ed. Tundisi, J.G.; Bicudo, C. E. M.; Matsumura-Tundisi, T. ABC/SBL, Rio de Janeiro, São Paulo. p. 59-103. 1995.

ALVES, C. B. M. e POMPEU, P. S. **Peixes do Rio das Velhas: Passado e Presente.** SEGRAC, Belo Horizonte, 194 p. 2001.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Relatório de Avaliação Social do Programa. **Programa Interáguas**. 50p. 2010.

ANA/GEF/PNUMA/OEA. **Projeto de Gerenciamento Integrado das Atividades Desenvolvidas em terra na Bacia do São Francisco**. Estudo Técnico de Apoio ao PBHSF – Nº 02. Subprojeto 4.5C– Plano Decenal de Recursos Hídricos da Bacia. Hidrográfica do Rio São Francisco-PBHSF (2004-2013). 217p. 2004.

ANA/GEF/PNUMA/OEA. **Projeto de Gerenciamento Integrado das Atividades Desenvolvidas em terra na Bacia do São Francisco**. Subprojeto 1.3 – Recomposição da Ictiofauna Reofílica do Baixo São Francisco. 74p. 2003.

BAYLEY, P. B. Factors affecting growth rates of young tropical fishes: seasonality and density-dependence. **Environ. Biol. Fish**, n. 21, p. 127-142. 1988.

CHISTIAKOV, D. A; HELLEMANS, B.; VOLCKAERT, F. A. M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture** 255: 1-29, 2006.

COELHO, M. A. **Os descaminhos do São Francisco**. São Paulo, Paz e Terra, p. 124-125. 2005.

CORDIVIOLA DE YUAN, E. Fish populations of lentic environments of the Paraná River. **Hydrobiologia**, n. 237, p. 159-173. 1992.

DURÃES, R.; POMPEU, P. S.; GODINHO, A. L. Alimentação de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do Brasil. **Iheringia**, Sér. Zool., Porto Alegre, 90,183-191. (2001)

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

FONTENELE, O.; VASCONCELOS, E .A. Considerações sobre a adaptação do piau-verdadeiro, *Leporinus elongatus* CUV. e Val., 1864 (Anostomidae), em lagoas do nordeste brasileiro. **Boletim Técnico do DNOCS** v.35, 61-92, 1977.

GARAVELLO e BRITSKI. Family Anostomidae (Headstanders). *In*: Reis RE, Kullander SO e Ferraris Jr. CJ (eds.) **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. EDIPUCRS, Porto Alegre, p. 71-84. 2003.

GARAVELLO, J. C. Revisão taxonômica do gênero *Leporinus* Spix, 1829 (ostariophysi, Anostomidae). **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo, São Paulo, 451 p. 1979.

GÉRY, J. **Characoids of the World**. THF Publications, New York. 1977.

GODINHO A. L. e GODINHO H. P. Breve visão do São Francisco. *In*: Godinho H.P.; Godinho A.L. (ed.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, p.15–25. 2003.

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

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**. Subordem Characoidei: Bacia do Rio Mogi Guassu. Franciscana, Piracicaba, v. IV, p. 631-846, 1975.

GOMES, P. C.; RIBEIRO, R. P.; BARERO, N. L.; POVH, J. A.; VARGAS, L.; SIROL, R. N. Diversidade genética de três estoques de piapara (*Leporinus elongatus*), utilizando RAPD. **Acta Scientiarum Animal Sciences**, Maringá, v. 30, n. 2, p. 241-247, 2008.

HELFMAN, G. S.; COLLETTE, B. B.; FACEY, D. E.; BOWEN, B. W. **The diversity of fishes**. 2nd ed. Wiley-Blackwell, New Jersey, p. 737. 2009.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

JAGER, H. I; CHANDLER, J. A; LEPLA, K. B; WINKLE, W. V. A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. **Environmental Biology of Fishes**, n. 60, p. 347–361. 2001.

KEY WORLD ENERGY STATISTICS. Disponível em: http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2010/key_stats_2010.pdf. Acesso em: 15/08/11. 2010.

KOHLER, H. C. Aspectos geoecológicos da bacia hidrográfica do São Francisco. In: H.P. Godinho & S.L. Godinho (eds.). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Pontifica Universidade Católica de Minas, Belo Horizonte, 458 pp. 2003.

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

MACHADO-ALLISON, A. Factors affecting fish communities in the flooded plains of Venezuela. **Acta Biol. Venez.** n. 15, p. 59-75. 1994.

MARTINS, C.; Wasko, A. P.; Oliveira, C.; Foresti F. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 26, n. 1, p. 33-38, 2003.

MENEZES, N. A. **Methods for assessing freshwater fish diversity**, p. 289-295. In: C. E. M. BICUDO & N. A. MENEZES (ed.). *Biodiversity in Brazil: a first approach*, São Paulo: CNPq, 326p., 1996.

MILLER, L. M; KAPUSCINSKI, A. R. Genetic guidelines for hatchery supplementation programs. In: HALLERMAN, E.M. **Population genetics: principles and applications for fisheries scientists**. Bethesda: American Fisheries Society, p. 329-355. 2003.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

MOREIRA, H.L.M. et al. **Fundamentos da moderna aquicultura**. Canoas: Ulbra, 2001.

MORELLI K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C. e FORESTI, F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes** 7:32-34, 2007.

NILSSON, C.; REIDY, C. A.; DYNESIUS, M.; REVENGA, C. Fragmentation and flow regulation of the World's large river systems. **Science**, n. 308, p. 405-408. 2005.

PAIVA, M. P. **Grandes represas do Brasil. Brasília: Editerra**. 304p. 1982.

PÉREZ, T.; ALBORNOZ, J.; DOMÍNGUEZ, A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. **Molecular Ecology**, v.7, p. 1347-1357, 1998.

POWELL, W.; MACHRAY, G. C. & PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends of Plant Science**, v. 1, p. 215-222. 1996.

RABOUAM, C.; COMES A. M.; BRETAGNOLLE, V.; HUMBERT, J. F.; PERIQUETS, G.; BIGOT, Y. Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 493-503. 1999.

RAMOS, J .V. B. Estudo da estrutura genética de *Leporinus elongatus* (Pisces, Characiformes) no complexo Canoas - rio Paranapanema. 2007. 38 p. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2007.

REISENBICHLER, R. R.; MCINTYRE, J. **Genetic differences in growth and survival of juvenile hatchery and wild steelhead trout, *Salmo gairdneri***. Journal of the Fisheries Research, Board of Canad, v. 34, p. 123-128, 1977.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

REYNALTE-TATAJE, D.; ZANIBONI-FILHO, E.; MUELBERT, B. **Stages of the embryonic development of the piavuçu *Leporinus macrocephalus* (Garavello & Britski, 1988).** Acta Scientiarum, v. 23, n. 4, p. 823-327, 2001.

ROURKE, M. e GILLIGAN, D. Population genetic structure of freshwater catfish (*Tandanus tandanus*) in the Murray-Darling Basin and coastal catchments of New South Wales: Implications for future re-stocking programs. **Industry & Investment NSW**, Australia, ISSN 1837-2112, n. 123. 2010.

SANCHES, A., et al. Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. **Lat. Am. J. Aquat. Res**, v. 40, p. 177-186. 2012.

SATO Y. e GODINHO, H. P. Migratory fishes of the São Francisco river. In: **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**, Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. (eds.). World Fisheries Trust: Victoria, BC, Canada, p. 195-232. 2003.

SATO, Y. e GODINHO, H. P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWE MCCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo, EDUSP, p. 401-413, 1999.

SATO, Y., et al. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H.P. e GODINHO, A.L. (Eds). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p. 2003.

SATO, Y.; CARDOSO, E. L.; AMORIM, J. C. C. **Peixes das lagoas marginais do rio São Francisco a montante da represa de Três Marias (Minas Gerais)**. CODEVASF, Brasília, 42p. 1987.

SWALES, S. Habitat restoration methods – a synthesis. In: COWX, I.G. Rehabilitation of

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

freshwater fisheries. Oxford. **Fishing News Books**, p. 133-137. 1994.

VAZZOLER, AEAM., **Biologia da reprodução de Peixes Teleósteos: teoria e prática.** Maringá: EDUEM, 169p. 1996

VIEIRA, F. e POMPEU, P. S. Peixamentos: uma alternativa eficiente? *Ciência Hoje*, v. 30, n. 175, p. 28-33, 2001.

WANG, C. M., et al. A high-resolution linkage map for comparative genome analysis and QTL fine mapping in Asian seabass, *Lates calcarifer*. **BMC Genomics**, v. 12, p. 174. 2011.

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

ZUCCHI, M.I. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. **Tese de Doutorado**. ESALQ/USP, Piracicaba/SP, Brasil, 130f. 2002.

4. Artigo Científico

Artigo científico a ser encaminhado ao periódico **Molecular Ecology Resoucers**.

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

MARCADORES DE MICROSSATÉLITES DESENVOLVIDOS PARA O PIAU- VERDADEIRO, *Leporinus elongatus*

Karine K. C. Oliveira¹, Ana P. S. Lima², Maíra A. Lima ¹, Hozana L. Dantas ¹, Maria R. M. Coimbra^{1*}

¹ Laboratório de Genética Aplicada, Departamento de Pesca e Aquicultura, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife, Pernambuco, Brasil.

² Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, Recife, Pernambuco, Brazil.

*Autor para correspondência: Maria Raquel Moura Coimbra, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Dois Irmãos, Recife (PE), 52171-900, Brazil. Telefone: 0055xx81 33206522.

E-mail: mrmcoimbra@hotmail.com

Palavras-chave: Biblioteca enriquecida, microssatélites tetranucleotídicas, *Leporinus elongatus*, conservação genética.

Resumo

O piau-verdadeiro (*Leporinus elongatus*) é um peixe de água doce que habita rios das bacias do Prata e do São Francisco. Ao longo destas regiões foram construídos imensos barramentos para geração de energia, o que vem prejudicando a migração reprodutiva dessa espécie. Diversas iniciativas de repovoamento têm surgido ao longo do rio São Francisco, sem que houvesse uma preocupação com princípios ecológicos ou genéticos. No intuito de produzir ferramentas que permitam análises quanto à diversidade e estruturação genéticas, uma biblioteca enriquecida para microssatélites foi construída para o piau-verdadeiro. A validação de sete marcadores obtidos foi feita a partir de uma população selvagem do Alto São Francisco. O número de alelos variou de cinco a 29, as heterosigozidades observadas e esperadas variaram de 0,568 a 0,977 e de 0,533 a 0,964, respectivamente. Todos os marcadores estudados estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e não apresentaram alelos nulos, portanto apresentam as características adequadas para avaliar a diversidade e estrutura populacional desta espécie, necessárias aos programas de repovoamento nas bacias brasileiras.

O Brasil é o terceiro produtor mundial de hidroenergia, contribuindo com 11,2% da hidrodução global em 2008 (Key World Energy Statistics, 2010). Apesar do evidente sucesso em relação aos objetivos da geração de energia, uma série de impactos negativos são por vezes despercebidos. Estes aproveitamentos hidrelétricos são responsáveis por perdas de áreas florestais e danos à biodiversidade, bem como, por mudanças nos ecossistemas aquáticos, muitas vezes irreversíveis (Silva *et al.* 2010).

No Brasil é inegável a auto-suficiência em energia, fornecida pelas hidrelétricas apesar disso, não se pode deixar de perceber que essas construções interrompem a migração dos peixes,

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

causando prejuízo à sua reprodução e multiplicação nos rios (Britto & Sirol 2006), o que desperta a necessidade de pesquisas para acompanhar e monitorar essas regiões impactadas. Atualmente, a grande maioria das bacias do país apresenta este tipo de construções, destacando-se aquelas do Paraná-Paraguai e do rio São Francisco, que são, respectivamente, a primeira e a segunda maiores geradoras de energia no Brasil (Eletrobras 2003).

O *Leporinus elongatus* é um peixe conhecido popularmente como piau-verdadeiro, pertencente à família dos anostomídeos, sendo nativo a duas importantes bacias da América do Sul, a bacia do Paraná-Paraguai e a bacia do São Francisco (Sato & Godinho 2003). Esta espécie normalmente habita rios, lagos e áreas alagadas, e alimenta-se de pequenos insetos, frutos e sementes, sendo caracterizada como onívora (Durães *et al.* 2001). Além da importância ecológica, o *L. elongatus* tem grande valor econômico, tanto para a pesca comercial como esportiva (Boscolo *et al.* 2005). Segundo Sato *et al.* (2003), esta espécie precisa realizar migrações ao longo dos rios para reproduzir e, devido, principalmente, à intensa construção de barragens no Brasil, essas populações estão sofrendo declínio.

Na verdade, várias espécies de peixes tem sofrido com as alterações em seu habitat, isso porque o ambiente de reprodução é modificado com os barramentos das construções de hidrelétricas, o que vem a acarretar diminuição do fluxo gênico entre as populações (Bert *et al.* 2002). Além disso, a migração reprodutiva é comprometida, levando a uma redução na abundância e, eventualmente, à extinção.

A diversidade genética de uma população depende do tamanho efetivo populacional, N_e , (número de indivíduos de uma população ideal sujeita à mesma deriva genética de uma população real), quanto menor for o N_e , menor será a diversidade genética (Frankham *et al.* 2002). Nos organismos, o potencial evolutivo (Borowsky 2001) e a capacidade adaptativa (Saura

et al. 2006) são a base da diversidade genética de uma dada espécie. E a diminuição dessa diversidade, seja por qual razão for, leva a um aumento da endogamia, podendo causar alterações nos padrões de sobrevivência e crescimento (Shikano & Taniguchi 2002; Cena *et al.* 2006). A diversidade genética significa flexibilidade adaptativa da população, observada principalmente em situações extremas, tais como: baixa concentração de O₂ dissolvido na água, doenças, substâncias tóxicas no ambiente, temperaturas extremas.

De maneira geral, a diversidade genética encontrada nas populações naturais é bastante versátil, sendo dependente da espécie, do rio, da localização no rio, bem como das pressões existentes em cada ambiente (Povh 2007). Assim, é fundamental a compreensão das diferenças e estruturas genéticas a que as espécies estejam condicionadas, visando o melhor manejo para conservação e aumento dos recursos (Ortega-Villaizán Romo *et al.* 2006).

Fica evidente que, em programas de conservação e de gestão a diversidade genética das espécies nativas é uma característica importante a ser destacada. Com isso, pode-se fazer uso de técnicas moleculares e avaliar os padrões da diversidade genética. Essa estratégia, serve de apoio aos programas de conservação, indicando quais espécies precisam de maior esforço de conservação e, também selecionando as áreas onde as populações naturais sejam mais viáveis (Johnson *et al.* 2001). Recentemente, marcadores moleculares têm sido construídos e utilizados em estudos populacionais (Povh 2007; Barroca *et al.* 2012; Sanches *et al.* 2012).

Os marcadores de sequencias simples repetidas (SSR) ou microssatélites são preferíveis em estudos de genética populacional, porque eles são potencialmente codominantes e altamente polimórficos (Powell *et al.* 1996). Além disso, microssatélites têm uma larga distribuição no genoma e podem ser eficientemente identificados, o que é essencial em estudos sobre a diversidade genética das populações (Collevatti *et al.* 1999).

O uso de marcadores microssatélites requer o desenvolvimento de *primers* específicos, ou seja, sequências únicas de DNA que flanqueiam as SSR do genoma de uma dada espécie. Aqui vale destacar que, as repetições tetranucleotídicas são mais específicas em géis de poliacrilamida, visto que apresentam menos “bandas fantasmas” (Ellegren 2004), sendo mais fáceis de genotipar.

Neste estudo procurou-se obter os primeiros marcadores de microssatélites para o *Leporinus elongatus*, sendo obtidos a partir de uma biblioteca genômica enriquecida com repetições tetranucleotídicas, a fim disponibilizar ferramentas para investigar a diversidade e estruturação genética destas populações nas bacias brasileiras.

DNA genômico de um único indivíduo de *L. elongatus* foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, de acordo com Sambrook *et al.* (1989). Para a obtenção das microssatélites foi construída uma biblioteca genômica, enriquecida com motivos tetranucleotídeos (GACA)₄ e (GATA)₇, o procedimento de hibridização e captura seguiu o protocolo apresentado por Glenn & Schable (2005), com pequenas modificações.

DNA genômico (~200 ng/μL) foi digerido separadamente com a enzima de restrição *RsaI* a 37°C e, em seguida, desfosforilado e purificado com kit de purificação QIAquick (Qiagen). T4 ligase foi utilizada para ligar os fragmentos aos adaptadores SNX F- (5'-GTTAAGGCCTAGCTAGCAGAATC-3') e SNX R- (5'-pGATTCTGCTAGCTAGGCCTTAAACAAAA-3') na presença de *XmnI* para evitar dímeros de adaptadores. Em seguida, os fragmentos foram amplificados por PCR assimétrica com o adaptador SNX-F. As amplificações foram realizadas em um volume de reação de 50 μL, contendo 100 ng DNA, 1 X Tampão de Thermopol® suplementado com 2,0 mM MgCl₂, 8 mM de dNTP's, 5 U de Taq Thermopol® e 10 μM de adaptador SNX-F. As amplificações por PCR foram realizadas nas seguintes condições: 72°C durante 5 min, 95°C durante 5 min, seguido de 25

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

ciclos (95°C durante 45 s, 62°C durante 1 min e 72°C durante 2 min) e em seguida 72°C durante 10 min. Estes produtos de PCR foram utilizados para hibridação com sondas biotiniladas de tetranucleotídeos (GACA)₄ e (GATA)₇ (ANEXO I). O DNA enriquecido com as sondas tetranucleotídicas foi amplificado com o adaptador SNX-F para gerar dupla cadeia de DNA, sendo utilizado o mesmo volume de reação anterior nas mesmas condições, à exceção do primeiro passo a 72°C. A clonagem foi realizada utilizando o Kit de clonagem pGEM-T Easy (Promega).

Neste trabalho foram obtidos 48 clones positivos, que foram purificados usando-se o Kit de Purificação de PCR QIAquick (Qiagen) e sequenciados no sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). As sequências foram editadas, mineradas; e os *primers* para amplificar microssatélites foram desenhados através dos softwares Bioedit (Hall 1999), Genrunner (Hastings Software, USA) e WebSat (Martins *et al.* 2009). Um total de 22 pares de *primers* foram construídos, sendo três com motivos de dinucleotídeos, um de trinucleotídeo e 18 de tetranucleotídeos. Destes, 14 amplificaram com temperatura de anelamento variando entre 56 a 65 °C, com padrões satisfatórios, sendo sete monomórficos e sete polimórficos.

Uma população selvagem, com quarenta e quatro indivíduos de *Leporinus elongatus*, coletada no rio Abaeté (18°06'35" de latitude e 45°27'48" de longitude) em novembro de 2011, foi utilizada para validar os *primers* desenhados. Os indivíduos foram genotipados com o seguinte protocolo de amplificação em um volume de 10 µl: 1U de Taq DNA polimerase Platinum®, 200µM de cada dNTP, 1X tampão de PCR, 1,5mM-2,5mM de MgCl₂, 10µM de cada *primer* e 20ng de DNA. As reações de PCR foram conduzidas utilizando-se as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 4 min; 35 ciclos sucessivos de desnaturação a 94°C por 30s, anelamento de 56-65°C por 30s, extensão a 72°C por 1 min e extensão final a 72°C por 40 min.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

Os produtos de PCR foram separados em gel de poliacrilamida a 5% e corado com nitrato de prata a 2%. O tamanho dos alelos foi estimado usando-se um ladder de 10 bp (Invitrogen), para confirmação do tamanho das bandas as imagens dos géis foram processadas no Molecular Imaging Software Version 4.0 (©1994-2005 EASTMAN KODAK COMPANY, Rochester, New York, USA).

Diversos parâmetros foram calculados usando-se o programa Genepop v3.4 (Raymond & Rousset 1995), incluindo número de alelos (A), heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e), desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação. O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) foi calculado através do Microsatellite Toolkit 3.3.1 (Park S. 2001). A presença de alelos nulos foi verificada com o aplicativo Micro-checker (Oosterhout *et al.* 2006) e a significância de múltiplos testes foi corrigida pelo método de Bonferroni (Rice 1989).

O número de alelos por locus (A) variou de cinco a 29 alelos e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) variou de 0,4961 a 0,9507 (Tabela 1). As heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) variaram de 0,5681 a 0,9772 e de 0,5327 a 0,9636, respectivamente, calculadas pelo GENEPOP v 3.4 (Raymond, Rousset 1995). Após a correção de Bonferroni ($p < 0,05$), nenhum marcador mostrou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 1) ou presença de alelos nulos. De acordo com a classificação de Oosterhout *et al.* (2006), nenhum alelo nulo foi encontrado nos *loci* estudados. Quanto ao desequilíbrio de ligação apenas os *loci* Lelo 4 e Lelo 14 estão ligados, mesmo depois da correção de Bonferroni (Rice 1989) para $p < 0,05$.

Estes microssatélites também foram testados em espécies do mesmo gênero *L. reinhardt* e *L. taeniatus*, apenas o *primer* Lelo 12 amplificou para a primeira espécie, os demais apresentaram

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

padrão inespecífico para as espécies testadas, não sendo indicados para o estudo de espécies cruzadas.

Um estudo feito por Morelli *et al.* (2007) mostrou que oito marcadores de microssatélites desenvolvidos para *L. macrocephalus* também amplificaram para o *L. elongatus*. Aqui vale salientar que, tais marcadores são do tipo dinucleotídicos, o que pode causar confusão na genotipagem em géis de poliacrilamida, através de bandas fantasmas, diferentemente dos marcadores tetranucleotídicos (Ellegren 2004).

No presente estudo foram desenvolvidos os primeiros marcadores dirigidos ao *L. elongatus*, passíveis de aplicação em estudos de diversidade genética. Estes marcadores polimórficos de microssatélites constituem um legado permanente para a conservação e manejo de *Leporinus elongatus*. Além disso, será possível avaliar a representatividade de estoques fundadores em programas de repovoamento, bem como monitorar e avaliar a eficiência de tais iniciativas, permitindo os ajustes necessários.

Referências

- Barroca, TM *et al.* (2012) Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the Paraopeba River, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil. *Open Journal of Genetics*, **2**, p. 121-130.
- Bert TM, Seyoum S, Tringali MD, McMillen-Jackson A (2002) Methodologies for conservation assessments of the genetic biodiversity of aquatic macro-organisms. *Braz. J. Biol.* **62**, 387-408.
- Borowsky RL (2001) Estimating nucleotide diversity from random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **18**, 143-148.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piaú, *L. elongatus*...**

- Boscolo, WR, Signor A, Feiden A *et al.* (2005) Farinha de resíduos da filetagem de tilápia em rações para alevinos de piaçu (*Leporinus macrocephalus*). *Revista Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, **34**, 6, 1819 - 1827.
- Botstein D, White RP, Skolnick M, Davis RW, (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Anim Genet* **32**:314-331.
- Britto SGC, Sirol RN, (2006) Transposição de Peixes como forma de manejo: as escadas do complexo Canoas, médio rio Paranapanema, Bacia do alto Paraná. . In: Nogueira M.G., Henry, R., Jorcin, A. (Eds.), *Ecologia de reservatórios: impactos potenciais, ações de manejo e sistemas em cascatas*. RiMA, São Carlos, 275-284.
- Cena, CJ, Morgan GE, Malette MD, Heath DD (2006) Inbreeding, outbreeding and environmental effects on genetic diversity in 46 walleye (*Sander vitreus*) populations. *Mol. Ecol.* **15**, 303-320.
- Collevatti RG, Brondani RVP, Grattapaglia, D (1999) Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species *Caryocar brasiliense*. *Heredity*, **83**, 748-756.
- Durães R, Pompeu PS, Godinho AL (2001) Alimentação de quatro espécies de *Leporinus* (Characiformes, Anostomidae) durante a formação de um reservatório no sudeste do Brasil. *Iheringia*, Sér. Zool., Porto Alegre, **90**, 183-191.
- Ellegren H (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Genetics* **5**:435–445.
- Eletrobras (2003) Energia Hidráulica. Available at: http://www.aneel.gov.br/altlas/energia_hidraulica. Accessed: July 74th, 2011.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Glenn TC, Schable NA (2005) Isolating microsatellite DNA Loci. *Methods in Enzymology*, **395**, 202–222.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis. Available at: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.
- Johnson WE, Eizirik E, Roelke-Parker M, O'Brien S J (2001). Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation, Pages 334-358 in J. L. Gittleman, S. M.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

- Funk, D. Macdonald and R. K. Wayne, editors. *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Key World Energy Statistics (2010) Available at: http://www.iea.org/textbase/nppdf/free/2010/key_stats_2010.pdf. Accessed: July 16th, 2011.
- Martins WS, Lucas DCS, Neves KFS, Bertoli DJ (2009) WebSat - A Web Software for MicroSatellite Marker Development, *Bioinformation*, **3**(6), 282-283.
- Morelli KA, Revaldaves E, Oliveira C, Foresti F (2007) Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* **7**:32-34.
- Oosterhout CV, Weetman D, Hutchinson WF (2006) Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes* **6**, 255-256.
- Ortega-Villaizán Romo MM, Aritaki M, Taniguchi N (2006) Pedigree analysis of recaptured fish in the stock enhancement program of spotted halibut *Verasper variegates*. *Fish. Sci.* **72**, 48-52.
- Park S, (2001) *Microsatellite Toolkit*. Available at: <http://oscar.gen.tcd.ie/sdepark/ms-toolkit>. Accessed: August 10th, 2011.
- Povh JA (2007) Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus*. *Tese Doutorado*. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual de Maringá. Maringá. 75 p.
- Powell W, Machray GC & Provan J (1996) Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends of Plant Science**, v. 1, p. 215-222.
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal Heredity*, **86**, V. 3: 248-249.
- Rice WW (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, Lancaster, **43**, 223-225.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanches A *et al.* (2012) Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, **40**, p. 177-186.

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

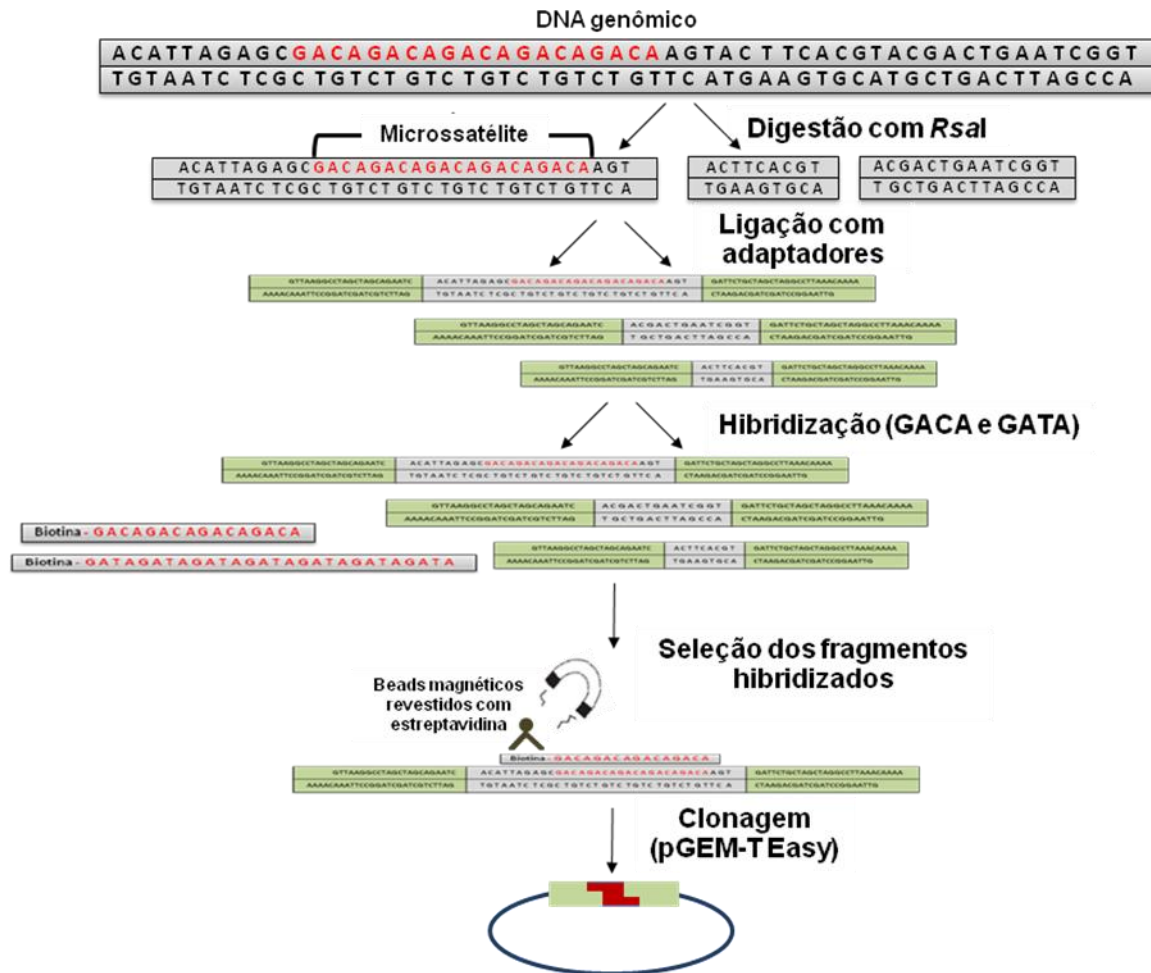
- Sato Y, Godinho HP (2003) Migratory fishes of the São Francisco river. In: *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*, Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. (eds.). World Fisheries Trust: Victoria, BC, Canada, p. 195-232..
- Saura M, Caballero P, Caballero A, Morán P (2006) Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. *ICES J. Mar. Sci.* **63**, 1290-1296.
- Shikano T, Taniguchi N (2002) Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy *Poecilia reticulata* as a fish model. *Aquaculture*, **204**, 271-281.
- Silva JJLS, Marques M, Damásio JM (2010) Impactos do desenvolvimento do potencial hidroelétrico sobre os ecossistemas aquáticos do Rio Tocantins. *Ambi-Agua*, Taubaté, **5**, 1,189-203.

Tabela 1. Diversidade genética para sete *loci* de microssátelite em uma população de *Leporinus elongatus*.

Locus	Sequência dos <i>primers</i> (5' - 3')	Motivo de repetição	TA (°C)	A*	Tamanho (pb)	Ho*	He*	HWE*	PIC**
Lelo 4	F - CGGAAACACTGCGGAG R - AATTATAGGAACCGTCTGG	(GACA) ₈	56	7	109-133	0,658	0,533	ns	0,496
Lelo 9	F - GGTCCCATTGACTTACAT R - CAGCAAAGTGATACATATCC	(GATA) ₁₄	56	9	132-176	0,628	0,543	ns	0,646
Lelon10	F - CGGGTTTCCTGCCATCTC R - GGGTGGAGAGAGAGCGC	(GA) ₄ (AA) (GA) ₁₇	65	7	134-160	0,568	0,622	ns	0,580
Lelo 12	F - GGAGTTCTGACCACTACTAAGG R - GAGTAGATTGAATGTGACAGCC	(GATA) ₁₈ (GACA) (GATA) ₆	58	23	154-262	0,923	0,917	ns	0,897
Lelon13	F - ATGCACCGACCTGTTTCC R - CGGCTCAGGACAATAGATAGAT	(GATA) ₁₀ (GGTA) (GATA) ₃	60	29	110-232	0,977	0,964	ns	0,951
Lelo 14	F - GTGGGGTGGAGTAGAGAAGATG R - CCGTCTGGGATTAAACAACAAT	(GACA) ₇	65	7	172-198	0,674	0,538	ns	0,572
Lelon20	F - AGTGCGTTCGTGAAATGTAGTG R - TCAGTCCATCTGTGCTTCAGTT	(GATG) ₆	65	5	160-202	0,705	0,628	ns	0,562

TA= temperatura de anelamento; A= número de alelos; H_o= heterozigosidade observada; H_e= heterozigosidade esperada; HWE= desvio no Equilíbrio de Hardy-Weinberg; PIC= conteúdo de informação polimórfica; ns= não significativo ($p < 0,01$). Fontes: * Genepop; ** Classificação de Botstein *et al.* (1990).

ANEXO



4.1- Normas da Revista Molecular Ecology Resources

Author Guidelines

General Information

Molecular Ecology Resources publishes articles reporting new tools for use in molecular genetic studies of natural populations. The main areas covered are the development of new genotyping resources, broadly applicable statistical or molecular techniques, and computer software. Papers that report on the ecology, evolution, behaviour and conservation of organisms, rather than on technical issues, should be submitted to our companion publication, *Molecular Ecology*. We typically provide an editorial decision on new submissions within 4 to 6 weeks, and papers usually appear online 4 to 8 weeks after receipt of the final manuscript.

Editorial Office

Managing Editor: Dr Tim Vines
email: managing.editor@molecol.com

Molecular Ecology Resources Editorial Office
6270 University Blvd
Vancouver, BC
V6T 1Z4
Canada
email: editorial.office@molecol.com
fax: 1 604 822 8982

Article Categories

Molecular Ecology Resources considers the following types of manuscripts for publication.

Resource Articles

Our principal function is to publish full papers describing resources for the molecular ecology community. These articles fall into several different subject areas, as described below, and all of these articles are sent for peer review to be judged on the utility of the resource for the community.

Invited Technical Reviews

The editors invite submissions that summarize and discuss recent advances in molecular or analytical techniques, or review the molecular ecology of particular taxa. Authors wishing to propose topics for reviews should contact Prof. Alex Buerkle, the Reviews Editor.

Opinions

We occasionally publish manuscripts presenting points of view that are potentially controversial as a means of encouraging discussion of particular topics. Such manuscripts may present speculative and provocative viewpoints, although they must adhere to the normal standards of scientific objectivity and will be subject to peer review.

Comments

Comments on published papers, principally those published in *Molecular Ecology Resources*, will be considered by the editors and published after consultation or peer review. A rebuttal by the original authors(s) may also be solicited and published alongside the Comment.

Permanent Genetic Resources Notes

These papers describe new tools useful for the molecular characterization of individuals from natural populations. In general, they will define a substantial ecological question and demonstrate that a readily usable molecular toolkit has been developed that can answer this question. PGR Notes do not appear in the journal as individual papers and are instead published as part of a summary article; the accepted manuscripts themselves are made available on the [MER primer database](#). Authors submitting Permanent Genetic Resources Notes should consult the [FAQ](#) for these manuscripts to find more specific information.

Resource Article Subject Areas

Authors should select one of the following broad subject areas for their manuscripts. We take a very inclusive view of each area, so these subject areas are not meant to be limiting, and the choice of subject area will not affect the merits on which the paper is evaluated. Authors with questions regarding placement of their manuscripts are encouraged to contact the Chief or Managing Editor.

DNA Barcoding and Molecular Diagnostics

These articles describe methods or DNA resources for the identification of taxa. Given that a goal for the field is to arrive at a minimal set of loci for taxonomic identification in all kingdoms, it is expected that most submissions will present comprehensive data on the application of the standard DNA barcoding loci to novel groups of taxa, or present new techniques for analyzing barcoding data. In situations where the authors or others have demonstrated that the standard loci are not sufficiently informative, authors may present data from other loci. Research in this subject area must conform to established barcoding protocols, such as those available from the [Consortium for the Barcode of Life](#) or the [Canadian Centre for DNA Barcoding](#). These manuscripts must supply INSD (GenBank / EMBL / DDBJ) accession numbers (with or without the BARCODE keyword). An identifier number from the [BOLD database](#) may also be included.

N.B. This subject area represents a combination of the previous article types ‘DNA Barcoding’ and ‘Molecular Diagnostics and DNA Taxonomy’, and we no longer consider short note submissions in the latter category.

OLIVEIRA, K.K.C., *Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, L. elongatus...*

Molecular and Statistical Advances

These papers primarily present new techniques for collecting and analysing data for molecular ecology studies. These submissions can also describe meaningful comparisons of statistical, computational or molecular methods, or alternatively demonstrate the existence of important problems with current procedures.

Permanent Genetic Resources

These articles describe the development of significant genetic or genomic resources for application to evolutionary or ecological questions. For example, these papers could describe NGS projects in which transcriptomes, genome fractions or whole genomes are sequenced and analyzed or where genome information is utilized to enable high-throughput or large-scale genotyping technologies. Authors are encouraged to include additional data or analyses that would be of interest to researchers developing similar resources.

Computer Programs

These articles typically present new computer software or substantial updates of existing programs. Authors should clearly describe the need for the program and the rationale behind its design, as well as a summary of functions, usage and output. Authors may choose to present an evaluation of a program's performance compared to existing software, and this is particularly encouraged for new programs. Programmers are urged to remember that 'user-friendly' programs are more likely to be used by the community, and that it is helpful if programs require standard input/output file formats (e.g., Genepop or Arlequin).

Submissions should include the complete user manual as Supplementary Material and provide a persistent website where the software and user manual may be accessed free of charge. Authors should also include an example data set along with a description of expected results as a supplemental file so that editors and reviewers can evaluate the software. Finally, authors are strongly encouraged to have their program tested by colleagues prior to submission: non-functioning programs will lead to a manuscript either being returned without review or rejected.

N.B. This subject area represents an amalgamation of Computer Program Notes and Computer Program Articles, and submissions suitable for either of these previous article types will be considered.

Journal Policies

Policy on data archiving

Molecular Ecology Resources expects that data supporting the results in the paper should be archived in an appropriate public archive, such as GenBank, Gene Expression Omnibus, TreeBASE, Dryad, the Knowledge Network for Biocomplexity, your own institutional or funder repository, or as Supporting Information on the *Molecular Ecology Resources* web site. Data are important products of the scientific enterprise, and they should be preserved for the future.

Authors may elect to have the data publicly available at time of publication, or, if the technology of the archive allows, may opt to embargo access to the data for a period up to a year after publication. Exceptions may be granted at the discretion of the editor, especially for sensitive information such as human subject data or the location of endangered species.

Authors are expected to archive the data supporting their results and conclusions, along with sufficient details so that a third party can interpret them correctly. As discussed by Whitlock et al. (2010), this will likely “require a short additional text document, with details specifying the meaning of each column in the data set. The preparation of such shareable data sets will be easiest if these files are prepared as part of the data analysis phase of the preparation of the paper, rather than after acceptance of a manuscript”. For additional guidelines on data deposition best practice, please visit <http://datadryad.org/depositing>.

Lastly, the utility of archived data is greatly enhanced when the scripts and input files used in the analyses are also made available. Given that scripts may be a mix of proprietary and freely available code, their deposition is not compulsory, but we nonetheless strongly encourage authors to make these scripts available whenever possible.

To enable readers to locate archived data from *Molecular Ecology Resources* papers, we require that authors include a ‘Data Accessibility’ section after the references (see below for details).

Policy on data analysis best practice

Molecular Ecology Resources expects that statistical and molecular tools used in submitted papers should meet a high standard of rigor. All analytical approaches have inherent limitations, and authors should therefore attempt to identify the limitations of their chosen approach and corroborate their interpretations when possible.

Policy on Conflicts of Interest

Authors are required to disclose any possible conflict of interest at the manuscript submission stage; these include financial conflicts (for example patent ownership, stock ownership, consultancies or speaker’s fees). When appropriate, a conflict of interest statement will be included in the published manuscript under a separate heading.

Compliance with International Conventions and Regulations

We strongly recommend that papers submitted to *Molecular Ecology Resources* comply with the Convention on Biological Diversity and the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CBD and CITES). Within the CBD we ask that authors follow the Access to Benefit Sharing (ABS) guidelines and give credit and equal access to benefits to countries, academic institutions and scientists that participated in the collection and analysis of data. Under the CITES convention, we request that authors observe the need for permits for the import and export of specimens that fall under CITES guidelines.

Compliance with Laws on Animal Experimentation

We expect that papers submitted to *Molecular Ecology Resources* comply with the laws on animal experimentation in the countries where the work was conducted. All experimental

procedures must be properly described and should be designed to minimize the suffering of animals.

Policy on reporting stable isotope data

For papers using stable isotopes, we recommend that authors follow the guidelines developed by the IUPAC Commission for Isotope Abundances and Atomic Weights; see <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/rcm.5129/full> for more details.

Article formatting guidelines

Resource Articles

Resource Articles have a limit of 8000 words per paper for **all** text (including title, abstract, keywords, references and table/figure legends), although exceptions may be granted in some cases. The format of these papers may vary according to the type of resource being presented, but in general they should contain a Title Page, an Abstract (<250 words), Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion, References, brief Acknowledgements, Figure Legends, and Tables and Figures, in this order. We generally prefer that Original Articles have separate Results and Discussion, but we will consider manuscripts where these sections have been combined.

Invited Technical Reviews

Technical Reviews have a limit of 8000 words per paper for **all** text (including title, abstract, keywords, references and table/figure legends), although exceptions may be granted in some cases. Authors may use boxes to provide additional information separate from the main text; the article should contain no more than five boxes, and each should be no more than 2000 words. All colour figures in review articles are published free of charge.

Opinions

Opinion pieces should not present new data, and should be less than 6000 words for **all** text (including title, abstract, keywords, references and table/figure legends). Again, such manuscripts may present speculative and provocative viewpoints, although they must be conditioned by the normal standards of scientific objectivity.

Comments

Comments should be kept as brief as possible (generally <3000 words), and should include title, keywords, references, and table/figure legends. As with Opinion papers, these manuscripts must also adhere to the normal standards of scientific objectivity.

PGR Notes

Permanent Genetic Resources Notes should be shorter than 3000 words for **all** text. They should include an Abstract (<100 words), main text, References, brief Acknowledgments, Figure Legends and Tables and Figures, in this order. Although not subdivided, the standard order of topics (Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion) should be followed in the

main text. Authors submitting Permanent Genetic Resources Notes should consult the [FAQ](#) for these manuscripts to find more specific information.

Submission Procedure

Molecular Ecology Resources accepts manuscripts via [ScholarOne Manuscripts](#), an online submission system. This system streamlines the submission process and ensures all authors' work is processed quickly and efficiently. If an author cannot submit the manuscript using the electronic procedures outlined below, they should contact the Managing Editor to ascertain whether or not an exception can be made. The following paragraphs describe aspects specific to each manuscript type, as well as general guidelines applicable to all manuscripts.

To submit your article, first create an account on [ScholarOne Manuscripts](#). Access the 'Author Centre', click on the 'submit new manuscript' link, and follow the instructions to submit your manuscript. The procedure consists of seven simple steps, which you are guided through by our online system. The help function is always available for any questions you might have. If you have any questions that cannot be addressed by the online help, please direct them to the Editorial Office at editorial.office@molecol.com.

N.B. *Molecular Ecology Resources* employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript you accept that it may be screened for plagiarism against previously published works.

Preparing Manuscripts for Submission

Covering Letter

A brief message addressed to the Managing Editor should indicate you wish to submit your manuscript for consideration, along with any relevant information for the subject editor. Authors submitting manuscripts rejected by other journals are encouraged to state that all comments on previous versions have been taken into account. Authors should also use the cover letter to explain their choice of preferred or non-preferred reviewers and editors.

Response

to

reviewers

If your paper is a resubmission, please prepare a detailed response to the previous set of editor and reviewer comments. The manuscript submission system typically removes text highlighting, bold type or text colours, so the most robust approach is to copy the decision letter and insert your responses beneath each comment, starting your text with ">>>". Uploading a copy of the manuscript with changes tracked assists with the review process, particularly for papers given a 'reconsider after revision' or an 'accept, minor revisions' decision.

Manuscript File

For initial submission, the main text of the manuscript can be in Microsoft Word with embedded tables and figures. Manuscripts can also be submitted as a single pdf containing the

text, tables and figures. In either case, please ensure that continuous line numbers are included and that figures are sufficiently high quality for review; manuscripts failing to include either of these will be returned to you. Please upload Supporting Information separately from the main text.

If your MS has been prepared in LaTeX, please ensure that you upload all additional files required to read your document, as well as providing a PDF proof for our typesetters to use as a reference. Please use the LaTeX ‘article’ class, and do not add coding to “force” line breaks or the positioning of “floats”, as this coding will need to be removed in the conversion of the file to XML. Authors can upload their LaTeX and EPS (figure) source files to ScholarOne Manuscripts, designating them “LaTeX support files”. These will be used for typesetting purposes and must be re-uploaded with each version of a paper. A single .zip file containing all source files should also be uploaded. The accompanying PDF should be designated as the “main document” during the file submission stage.

Keep the file as small as possible to facilitate information transmission (max 50 MB). Do not use any form of compression or zipping, excepting with LaTeX support files as outlined above, as these can interfere with our upload process.

Format

To facilitate viewing on screen, please format your manuscript with 2.5 cm side margins, 3 cm top and bottom margins, and clear paragraph delimitations. **All manuscripts must be double-spaced with page numbers and continuous line numbers.**

Text

The first text page should contain: 1. Title; 2. Author’s names with initials; 3. Full postal address(es); 4. Four to six keywords for indexing purposes; 5. Name, address, fax number and electronic mail address of corresponding author, to whom proofs will be sent; 6. Running title of no more than 45 characters, including spaces.

Please see the guidelines for specific article types for further layout information.

Tables and Figures

Tables and figures should appear after the main text. Table captions should be integral with and appear above the data tables. Footnotes for tables should be given below the table. Figure legends should not appear with their respective figure but should be grouped after the references. Colour images are welcome, but authors are charged for colour production (see Final MS Preparation). In the full-text online edition of the journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

Preparation of Figures:

Almost all figures submitted to Molecular Ecology should be vector graphics- these are clear at all magnifications and look good both in print and online. Graphs should always be saved directly as .eps or .pdf files from a professional graphics program (e.g. R) and never as .jpg or .tif or any other pixel based format. Maps should be made using vector graphics in e.g. Adobe

Illustrator. The output of scientific software programs should also be saved directly as vector graphics whenever possible. Photographic images can be in a pixel-based format, but please ensure that these are saved as .tif files with at least 300 dpi, or (failing that) a .jpg with no compression. Failure to follow these guidelines may result in your paper having blurred, illegible or otherwise low-quality figures. Please also ensure that figures are prepared such that, after reduction to fit across one column, two-thirds page width, or two columns (80 mm, 112 mm, or 169 mm, respectively) as required, all lettering and symbols will be clear and easy to read, i.e. no axes labels should be too large or too small.

Further details are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/>.

The corresponding author is responsible for obtaining written permission to reproduce material "in print and other media" from the publisher of the original source, and for supplying Wiley with that permission.

References

Please see a recent issue of the journal for reference formatting.

Data Accessibility

To enable readers to locate archived data from *Molecular Ecology Resources* papers, we require that authors include a 'Data Accessibility' section after the references. This should list the database and the respective accession numbers for all data from the manuscript that has been made publicly available. An example is below, more details can be found at <http://www.molecular ecologist.com/data-archiving-the-nitty-gritty/>.

"Data Accessibility:

DNA sequences: Genbank accessions F234391-F234402; NCBI SRA: SRX0110215

Final DNA sequence assembly uploaded as online supplemental material

R scripts: uploaded as online supporting information

Phylogenetic data: TreeBASE Study accession no. S9345

Sample locations and microsatellite data: DRYAD entry doi:10.5521/dryad.12311"

Please note: **papers lacking this section will not be sent to Production.** To avoid delays, we recommend initiating data archiving **prior** to the submission of your final revision. Authors wishing to use the Dryad repository will be provided with a link upon manuscript acceptance.

If you have any questions about the formatting of this section please contact the managing editor (managing.editor@molecol.com).

Supplementary Data

Supplementary materials give authors the opportunity to present large datasets or data in different formats than traditional print media. Manuscripts in all categories may, where appropriate, present supplementary material for online publication. Supplementary data must be submitted during the review process. Please note that supplementary data should be uploaded in a separate file and given the file designation "Supplementary material for online publication only".

For more information on preparing supplementary data, please see:
<http://authorservices.wiley.com/bauthor/>.

Cover Images

Molecular Ecology Resources uses images associated with published papers as covers for the journal. Authors are invited to submit candidate images, either with their manuscript or separately, preferably in electronic form, for consideration for the cover. Image resolution should be no greater than 600 d.p.i. We prefer images in landscape format, as this fills the space on the journal cover most effectively. Images should seek to be aesthetically pleasing and, wherever possible, to present a message related to the specific topic of the paper or the general coverage of the journal. It is important that authors submit a suitable brief caption to the image, together with a photo-credit where appropriate. Images submitted as prints or transparencies will be returned to authors, if requested. Copyright forms *must* be signed before your cover image is published. Please contact the Editorial Office for details.

Author Contributions Box

Authors should include a brief Author Contributions Box at the end of the paper in which they describe their specific contributions to the published work. Contributions could include, for example, designed research, performed research, contributed new reagents or analytical tools, analyzed data, wrote the paper, etc. An author may have multiple contributions, and multiple authors may have contributed to the same component of the study.

N.B. The mandatory Author Contributions Box replaces the optional Author Information Box.

Related Manuscripts

Reviewers and Editors often ask to see unpublished manuscripts (i.e. 'in press', 'in review' or 'submitted') that appear to be closely related to the submitted paper. As obtaining these during the review process adds unnecessary delays, we request that these related manuscripts are uploaded as at the submission stage. Papers 'in press' should be designated 'supplemental file for review' and will be visible to the referees, papers that are 'submitted', 'in review' or 'in preparation' should be designated 'supplemental file not for review' and will only be seen by the editor.

Notes for Accepted Manuscripts

The following items must be provided before your submission can be published. These files can either be uploaded during the revision process, or e-mailed to the editorial office at editorial.office@molecol.com.

1. Copyright Transfer Agreement:

<http://www.wiley.com/go/ctaaglobal>

2. If your manuscript contains colour, a Colour Work Agreement*:

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

*It is the policy of Molecular Ecology Resources for authors to pay the full cost for print

reproduction of colour artwork. This cost is £150 for the first colour figure and £50 per additional figure. The colour work agreement form before your paper can be published.

Molecular Ecology Resources offers authors the opportunity to reproduce the figures in colour for free in the online version of the article but have the figures appear in black and white in the print version. If an author wishes to take advantage of this free colour-on-the-web service, they should liaise with the Editorial Office to ensure that the appropriate documentation is completed for the Publisher. Clearly, we cannot offer this option for figures that are unintelligible in grayscale.

Once these two items have been signed by the corresponding author (or other institutional authority), scan the completed document and upload the image file, designating the file type to correspond with the appropriate form during the uploading stage of the revision process.

Publishing Information

Exclusivity and Copyright

Manuscripts must be submitted exclusively to *Molecular Ecology Resources* and we will only consider them for publication on the understanding that they have not been, nor will be, published elsewhere. If accepted, the copyright to papers is assigned to the journal. A statement confirming that all authors give formal consent to publication should accompany manuscripts in the covering letter. Permission to use published material elsewhere will be granted on request.

Copyright Transfer Agreement

Authors will be required to assign copyright to Blackwell Publishing Ltd. Copyright assignment is a condition of publication and papers will not be passed to the publisher for production unless copyright has been assigned. To assist authors an appropriate copyright assignment form will be supplied by the editorial office and is also available on the journal's website [here](#). Government employees in both the US and the UK need to complete the Author Warranty sections, although copyright in such cases does not need to be assigned.

After submission authors will retain the right to publish their paper in various medium/circumstances (please see the CTA form for further details). Correspondence to the journal is accepted on the understanding that the contributing author licenses the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents. The CTA form can be downloaded from [here](#), and further information can be obtained from http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp#1.20.

OnlineOpen

OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive

OLIVEIRA, K.K.C., **Desenvol. e padroniz. de microssatél. para estud. genét. do piau, *L. elongatus*...**

the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see http://wileyonlinelibrary.com/onlineopen#OnlineOpen_Terms.

Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp (Please note this form is for use with OnlineOpen material ONLY.)

Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

Early View

Molecular Ecology Resources is covered by Wiley-Blackwell's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Articles are therefore available as soon as they are ready, rather than having to wait for the next scheduled print issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. The nature of Early View articles means that they do not yet have volume, issue or page numbers, so Early View articles cannot be cited in the traditional way. They are therefore given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article. More information about DOIs can be found at: <http://www.doi.org/faq.html>.

NIH-funded authors and Molecular Ecology Resources

From April 2008, the NIH is mandating grant-holders to deposit their published papers in PubMed Central within 12 months of publication. *Molecular Ecology Resources* complies with the NIH mandate in allowing authors to post the accepted version of their article, i.e. the version incorporating any amendments made during peer review, 12 months after publication (please see the 'Accepted version' section on page 1 of the copyright transfer). In doing so authors will be meeting the terms of their grant (<http://publicaccess.nih.gov/FAQ.htm#general>).

As an alternative, NIH-funded authors may use the Online Open service (<http://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen.asp>). This service grants free and immediate availability of the article on publication, and deposition of the final pdf version with PubMed Central.

Wiley-Blackwell Author Services

Wiley-Blackwell Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so

they do not need to contact the production editor to check on progress. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor/> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Proofs

Authors will be sent an e-mail alerting them that PDF proofs are available to download from our secure designated author website. Therefore, the corresponding author should supply their email address when they submit their manuscript. Corrections must be returned to the Production Editor within 3 days of receipt; fax should be used to facilitate communication and minor corrections can be advised by e-mail ensuring that journal title, paper reference number and corresponding authors name are given in the body of the message.

Authors should note that proof corrections should be marked as clearly as possible, and should be kept to a minimum. If the Editors consider that significant changes have been introduced at the proof stage, the right is reserved either to levy the costs to authors, or to request resubmission of the manuscript. The corresponding author will be sent a form with their proofs to enable copies of offprints to be ordered.

Offprints

Free access to the final PDF offprint will be available via Author Services only. Paper offprints of the final published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. For order enquiries please email: offprint@cosprinters.com.

Referrals to the Open Access Journal "Ecology and Evolution"

This journal works together with Wiley's Open Access Journal, Ecology and Evolution, to enable rapid publication of quality research that is unable to be accepted for publication by *Molecular Ecology Resources*. Authors will be offered the option of having the paper, along with any related reviews, automatically transferred for consideration by the Editor of *Ecology and Evolution*. Authors will not need to reformat or rewrite their manuscript at this stage, and publication decisions will be made a short time after the transfer takes place. Once the referral is made, the manuscript will be held in a secure Wiley FTP site that is not accessed until authors request to transfer their manuscript. The Editor of *Ecology and Evolution* will accept submissions that report well-conducted research which reaches the standard acceptable for publication. Accepted papers can be published rapidly, typically within 15 days of acceptance. *Ecology and Evolution* is a Wiley Open Access journal and article publication fees apply. For more information please go to www.ecolevol.org/info or contact the editorial office at ecoevo@wiley.com at any time with any questions.