

BRUNO CEZAR NASCIMENTO RAMOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PARENTESCO ENTRE PROLES DE IRMÃOS
DE PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri* STEINDACHNER, 1876) MANTIDOS
NAS ESTAÇÕES DE PISCICULTURA AO LONGO DO RIO SÃO
FRANCISCO.**

Recife,
12/2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PARENTESCO ENTRE PROLES DE IRMÃOS
DE PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri* STEINDACHNER, 1876) MANTIDOS
NAS ESTAÇÕES DE PISCICULTURA AO LONGO DO RIO SÃO
FRANCISCO.**

BRUNO CEZAR NASCIMENTO RAMOS DA SILVA

Trabalho de conclusão apresentado ao Curso
de Engenharia de Pesca da Universidade
Federal Rural de Pernambuco, como
exigência para a obtenção do Bacharel em
Engenharia de Pesca.

Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Moura Coimbra
Orientadora

Recife,
12/2019

- S586a da Silva, Bruno Cezar Nascimento Ramos
AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PARENTESCO ENTRE PROLES DE IRMÃOS DE PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri* STEINDACHNER, 1876) MANTIDOS NAS ESTAÇÕES DE PISCICULTURA AO LONGO DO RIO SÃO FRANCISCO. / Bruno Cezar Nascimento Ramos da Silva. - 2019.
25 f. : il.
- Orientadora: Maria Raquel Moura Coimbra.
Inclui referências.
- Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Engenharia de Pesca, Recife, 2020.
1. *Lophiosilurus alexandri*. 2. repovoamento. 3. rio São Francisco. 4. microsatélites. 5. parentesco. I. Coimbra, Maria Raquel Moura, orient. II. Título

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE GRADUAÇÃO
BACHAREL EM ENGENHARIA DE PESCA

**AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PARENTESCO ENTRE PROLES DE IRMÃOS
DE PACAMÃ (*Lophiosilurus alexandri* STEINDACHNER, 1876) MANTIDOS
NAS ESTAÇÕES DE PISCICULTURA AO LONGO DO RIO SÃO
FRANCISCO.**

Bruno Cezar Nascimento Ramos da Silva

ESO julgado adequado para a obtenção do
título de Bacharel em Engenharia de Pesca.
Defendida e aprovada em 13/12/2019 pela
seguinte Banca Examinadora.

Prof.^a Dr.^a Maria Raquel Moura Coimbra

(Orientador)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Santos

(Membro titular)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof.^a Dr.^a Karine Kelly Cavalcanti Oliveira Farias

(Membro titular)

[Colégio Agrícola Dom Agostinho Ikas - CODAI]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Prof.^a Dr.^a Suzianny Maria Bezerra Cabral da Silva

(Membro suplente)

[Departamento de Pesca e Aquicultura]

[Universidade Federal Rural de Pernambuco]

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por me proporcionar mais uma conquista pessoal e por todas as coisas boas que me aconteceram nesse período de formação.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco por toda dedicação em promover o ensino de qualidade para a minha formação.

Ao Departamento de Pesca e Aquicultura pelo excelente corpo docente e estrutura laboratorial que permitiu o meu avanço intelectual e científico.

À minha mãe, Cláudia, mulher guerreira que merece crédito por essa vitória tanto quanto eu, pois nunca desistiu de me proporcionar uma educação e qualidade e agora me sinto realizado por chegar onde ela sempre desejou.

Aos meus familiares pelo suporte e torcida, vocês são um alicerce na minha vida.

Aos meus amigos Leonardo Teixeira e Vitória Monteiro, só eu sei a importância de vocês no momento em que mais precisei e tenho certeza que se eu cheguei até aqui foi porque vocês me sustentaram quando eu quis desistir de tudo. Gratidão eterna!

Aos colegas de classe pelo companheirismo e bons momentos vividos.

Aos companheiros do Laboratório de Genética Aplicada, Renata, Gênisson, Wilka e Gabriell, por todo o trabalho em equipe e harmonia. Dale!

À Raquel Coimbra, minha orientadora e que posso chamar de amiga, por toda a confiança no meu trabalho e por termos trabalhado tão bem junto. Muito obrigado por ser uma excelente professora, profissional responsável e uma “segunda mãe” para mim.

Aos companheiros dos anos de escola, Caio, Andrews, Yuri e Jefferson, pelos excelentes momentos de lazer e companhia quando mais precisei.

A Gael por ser tanto em tão pouco tempo, capaz de assumir a responsabilidade de ser uma companhia essencial mesmo que nesta reta final.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a execução deste trabalho e com o meu bem-estar durante esses cinco anos.

RESUMO

O pacamã (*Lophiosilurus alexandri*) é um bagre endêmico da bacia do rio São Francisco, atualmente classificado pelo ICMBio como uma das espécies ameaçadas de extinção. Seis programas de repovoamento dessa espécie são conduzidos ao longo de toda a extensão do rio. Para que tais programas sejam de fato efetivos, é preciso que haja o devido acompanhamento genético dos reprodutores, de modo que a diversidade genética das populações não seja afetada. Dentre os estudos que complementam as ações de repovoamento está a identificação do melhor índice de relação de parentesco para que se priorizem cruzamentos entre indivíduos não aparentados. O presente trabalho objetivou avaliar qual o índice que melhor representa as relações entre indivíduos selvagens sem grau de parentesco e das Estações de Piscicultura da Codevasf em Bebedouro (PE), de Itiúba (SE) e de Três Marias (MG) com grau de parentesco conhecido (famílias de irmãos completos compartilhando 50% da genética dos seus parentais) com o uso de marcadores microsatélites. Os índices de Wang (R_W) e Lynch & Li (R_{LL}) foram os que mostraram valores mais próximos aos esperados. Entre indivíduos selvagens de duas localidades (alto e submédio São Francisco), valores negativos, mas muito próximos a zero foram encontrados. A partir das combinações par a par das famílias de cativeiro, foi possível determinar que passe a existir alguma relação de parentesco entre pares de indivíduos com valores maiores ou iguais a 0,12 para R_W e 0,03 para R_{LL} .

Palavras-chave: *Lophiosilurus alexandri*; rio São Francisco; parentesco; repovoamento; microsatélites.

Lista de figuras

	Página
Figura 1: Gráfico comparativo dos índices de parentesco avaliados para as proles de irmãos completos.....	18
Figura 2 e 3: Gráficos comparativos do percentual de indivíduos selvagens com ou sem relação de parentesco nas regiões do alto e submédio São Francisco para os índices de Wang (2) e Lynch & Li (3).....	19

Lista de tabelas

	Página
Tabela 1: Determinação dos reprodutores para a formação das famílias de referência a serem utilizadas no estudo de relação de parentesco.....	14
Tabela 2: Marcadores microsatélites “Lalex” desenvolvidos pela PUC-Minas.	15
Tabela 3: Distribuição de alelos e suas respectivas frequências em três famílias de irmãos completos de <i>Lophiosilurus alexandri</i> construídas nas Estações de Piscicultura de Pernambuco (BEB), Minas Gerais (BH) e Sergipe (IT).	16
Tabela 4: Número de indivíduos (N), número de alelos (Na) e médias de todos os loci.	17
Tabela 5: Índices de relação de parentesco estimados para as proles de irmãos completos nos plantéis da Estação de Piscicultura de Bebedouro (PE), de Itiúba (SE) e de Três Marias (MG).	17
Tabela 6: Índices de relação de parentesco estimados para populações de animais selvagens capturados nas regiões do alto e submédio São Francisco.....	18

Sumário

Agradecimentos	5
RESUMO	6
Lista de figuras	7
Lista de tabelas	8
INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS	13
<i>Objetivo geral</i>	13
<i>Objetivos específicos</i>	13
MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
<i>Coleta do material</i>	13
<i>Extração de DNA</i>	14
<i>Microsatélites</i>	14
<i>Análise dos dados</i>	15
RESULTADOS E DISCUSSÃO	15
CRONOGRAMA DE ATIVIDADES	20
CONSIDERAÇÕES FINAIS	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	20
DIFICULDADES ENCONTRADAS	25
PARECER DO ORIENTADOR	25

INTRODUÇÃO

A bacia do rio São Francisco, um dos maiores recursos hídricos do Brasil, está distribuída em uma área de aproximadamente 639.219 km² (Pereira et al., 2007) e abrange diversos Estados em torno de seu percurso, a citar Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e o Distrito Federal, ocupando cerca de 7,6% do território nacional (Godinho & Godinho, 2003). Para melhor classificação dos seus recursos e tendo em vista a sua proporção, a bacia atualmente se divide em quatro unidades fisiográficas bem delimitadas: alto, médio, submédio e baixo São Francisco (Pereira et al., 2007).

Essa bacia apresenta grande importância dentro do cenário brasileiro: é fonte de subsistência para populações ribeirinhas, abastecimento urbano e industrial (Godinho & Godinho, 2003); há o desenvolvimento de atividades agrícolas irrigadas em suas margens, apresenta um potencial hidrelétrico que já é aproveitado em determinados trechos do rio para a geração de energia, além de apresentar uma extensa diversidade faunística (Sato & Godinho, 1999). São descritas 244 espécies habitantes do São Francisco, das quais 214 são nativas (Barbosa & Soares, 2009) e, neste total, encontram-se espécies de alto valor comercial para a pesca como o curimatá-pacu (*Prochilodus argenteus*), o dourado (*Salminus brasiliensis*), o piaui-verdadeiro (*Leporinus obtusidens*), o surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), o matrinhã (*Brycon orthotaenia*), entre outros.

Contudo, o desenvolvimento dessas atividades desencadeou uma série de impactos ambientais ao longo do rio. Destacam-se principalmente as instalações de usinas hidrelétricas que afetaram diretamente a biodiversidade e sua manutenção no meio ambiente. Essas estruturas são responsáveis por gerar grandes barramentos físicos no rio São Francisco, tendo como consequências o aumento da coluna d'água, seguido das inundações de terrenos e áreas de vegetação, e, em nível biológico, as barragens tendem a impedir o curso de algumas espécies da ictiofauna que realizam migração reprodutiva, a piracema, bem como prejudicam a sobrevivência de espécies bentônicas de áreas rasas uma vez que a profundidade local aumenta de acordo com a contenção física da água.

A distribuição das usinas pelo rio também são critério de avaliação dos riscos à biodiversidade. Contabilizam-se oito usinas hidrelétricas instaladas apenas nas regiões do submédio e baixo São Francisco (Lima, 2016), o que compromete drasticamente as relações do ecossistema local e as condições de vida das comunidades pesqueiras que dependem do alimento proveniente do rio. Diante disso, medidas mitigatórias foram postas em prática de modo a preservar e promover a manutenção dos estoques naturais, tendo como uma das primeiras ações o decreto-lei nº 794/1988, Artigo 68 do Código de Pesca:

“As represas dos rios, ribeirões ou córregos devem ter como complemento obrigatório obras que permitam a conservação da fauna fluvial, seja facilitando a passagem dos peixes, seja instalando Estações de Piscicultura para o repovoamento” (Brasil, 1988).

Atualmente existem seis Estações de Piscicultura governamentais, instaladas ao longo da bacia, que desenvolvem as ações de repovoamento previstas por lei: uma localizada no alto São Francisco (Três Marias, MG), uma no médio (Xique-Xique, BA), uma no submédio (Bebedouro, PE) e duas no baixo (Betume e Itiúba, SE), além de uma Estação pertencente à Chesf no submédio (Paulo Afonso, BA) (Dantas, 2010; Lopes et al., 2013).

Em 2015, programas de recuperação e conservação de espécies da fauna aquática da bacia do São Francisco foram postos em prática pelo Instituto Chico Mendes (ICMBio). Dentre as espécies classificadas como “vulneráveis”, se encontra o *Lophiosilurus alexandri*, um bagre da ordem Siluriforme e família Pseudopimelodidae (Carvalho et al., 2016), popularmente conhecido como pacamã. É caracterizado como uma espécie bentônica, sedentária, carnívora de hábito noturno e que apresenta cuidado parental com a prole realizado pelos machos (Sato et al., 2003; Santos e Luz, 2009). O que o torna atrativo para a aquicultura é o seu potencial de mercado, uma vez que sua carne é firme, vermelha, com alto rendimento de filé e não contém espinhas intramusculares (Tenório et al., 2003; Luz e Santos, 2008).

O repovoamento, atividade que produz grandes quantidades de formas juvenis em cativeiro a partir de potenciais reprodutores para renovação dos estoques naturais, tem sido a estratégia utilizada para a recuperação do *L. alexandri*. Para que isso seja possível, faz-se necessário um controle adequado dos cultivos com atividades de

renovação dos plantéis, realização de desovas individualizadas e marcação física, a fim de manter preservada a diversidade genética dos indivíduos repovoados. Sem o controle há o risco do uso de reprodutores aparentados no acasalamento, o que resulta em perda da variabilidade genética e no aumento da consanguinidade (Moreira et al., 2007; Povh et al., 2009; Ribeiro et al., 2016). É de suma importância a maximização da diversidade genética entre reprodutores para o desenvolvimento de um programa de repovoamento verdadeiramente eficaz (Coimbra et al., 2017).

Alguns estudos podem ser realizados durante as ações de repovoamento para evitar a relação de aparentados e verificar a proximidade genética entre os animais, a exemplo da avaliação do índice de parentesco. A estimativa do índice de parentesco nas práticas de repovoamento é uma técnica eficaz quando se deseja identificar a semelhança genética entre indivíduos fisicamente isolados a fim de evitar cruzamentos indesejados (Rodzen et al., 2004), uma vez que a efetividade da manutenção dos estoques naturais se dá pela inserção de animais com a maior diversidade genética possível.

As microssatélites, também chamadas de Sequências Simples Repetidas (SSR), são marcadores constituídos por até seis nucleotídeos capazes de identificar indivíduos heterozigotos, são seletivamente neutras, com níveis elevados de alelos polimórficos e de fácil amplificação via PCR (reação em cadeia da polimerase) com o auxílio de primers específicos que flanqueiam a zona da microssatélite (Chistiakov et al., 2006). A partir da análise genotípica resultante dos estudos com microssatélites é possível determinar a relação genética entre pares de indivíduos e as contribuições dos parentais na formação da prole com o auxílio de softwares especializados em tais estimativas.

Existem diversos índices capazes de estimar as relações de parentesco entre indivíduos ou grupos. Contudo, é preciso definir qual deles retrata mais fielmente as relações da espécie em questão. Diante disso, fez-se necessária a avaliação de famílias mantidas em cativeiro pelas Estações de Piscicultura envolvidas neste projeto com o objetivo de encontrar o melhor índice de parentesco, a partir de relações de parentesco já conhecidas (irmãos completos compartilhando 50% da genética), que servirá de referência para a manutenção da diversidade dentro das famílias, bem como auxiliar na formação de novos cruzamentos entre reprodutores que também promovam o aumento da variabilidade genética e a diminuição da consanguinidade entre indivíduos.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Determinar o melhor índice de relação de parentesco que descreve relações entre irmãos completos de pacamã.

Objetivos específicos

- Estimar a relação de parentesco para três famílias de irmãos completos de pacamã provenientes de três Estações de Piscicultura: uma situada em Bebedouro (PE), outra em Itiúba (SE) e a última localizada em Três Marias (MG);
- Determinar, com base em relações de parentesco conhecidas, o(s) índice(s) que mais se aproxima(m) do percentual esperado: irmãos completos compartilhando 50% da genética de seus parentais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta do material

Foi selecionada uma família constituinte do plantel mantido pela Estação de Piscicultura da Codevasf situada em Bebedouro (PE), uma da Estação de Itiúba (SE) e uma proveniente da Estação de Piscicultura de Três Marias (MG) (Tabela 1), cujos reprodutores foram marcados com *PIT tags* (*Passive Integrated Transponder*) e cruzados para a obtenção dos irmãos completos (*full-sib*) (Figura 1). Foi coletada uma porção da nadadeira caudal de 20 animais de cada prole da Estação de Bebedouro e de 21 animais selvagens provenientes das regiões do alto e submédio São Francisco, todos com tamanho médio de 10 centímetros, possibilitando a coleta do tecido sem ocasionar a morte dos indivíduos ou prejudicar a função motora. Da Estação de Três Marias foi coletado um total de treze larvas de pacamã e tecido da nadadeira caudal dos reprodutores dessa progênie. A conservação do material foi realizada em álcool a 95% e o armazenamento a -80° C para posterior análise no Laboratório de Genética Aplicada da Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, Brasil.

Tabela 1: Determinação dos reprodutores para a formação das famílias de referência a serem utilizadas no estudo de relação de parentesco.

Família	Reprodutor	Identificação (PIT Tag)
BEB	21 (M)	16125
	19 (F)	28625
BH	1 (M)	3602
	2 (F)	3618
IT	1 (M)	14117
	2 (F)	330754

Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada com base no protocolo fenol: clorofórmio, descrito por Sambrook et al. (1989).

Microsatélites

Foi utilizado um conjunto de sete primers de microsatélites (Tabela 2) no plantel de reprodutores, desenhados pelo Laboratório de Genética da Conservação da PUC-Minas com a denominação “Lalex”, todas modificadas com a inserção da cauda M13 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3') de Schuelke (2000) e aplicadas nas famílias selecionadas por apresentarem polimorfismo necessário para a execução do estudo (n° de alelos ≥ 2) (Almeida et al., 2006). A literatura mostra o uso de pelo menos seis marcadores microsatélites em trabalhos com a mesma finalidade (Sriphairoj et al., 2007; Almeida et al., 2006; Sekino et al., 2004). O DNA previamente extraído foi submetido à PCR seguindo o protocolo de Schuelke (2000). Cada amostra teve um volume final de 10 μ l, sendo 50 ng/ μ l de DNA genômico, 10 mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 2,5 mM de $MgCl_2$, 8 pmoles de cada primer R (*reverse*) e da fluorescência-M13, 2 pmoles do primer F (*forward*), 200 μ M de cada dNTP e 1U de *Taq* polimerase. Os ciclos de amplificação do DNA consistiram em uma fase inicial de desnaturação a 94° C por 5 minutos, partindo para 30 ciclos de 94° C (30 segundos) / 56° C (45 segundos) / 72° C (45 segundos), seguido por mais 8 ciclos de 94° C (30 segundos) / 53° C (45 segundos) / 72° C (45 segundos), e uma extensão final de 72° C por 10 minutos. Em seguida, o produto da PCR passou por eletroforese em gel de agarose 1% para verificação do material amplificado. Por fim, 1,5 μ l desse produto foram adicionados em uma solução contendo 13 μ l de formamida + 0,5 μ l de LIZ 600

(solução padrão de tamanho de fragmentos) e corridos em genotipagem no sequenciador automático GeneAnalyzer ABI 3500.

Tabela 2: Marcadores microssatélites “Lalex” desenvolvidos pela PUC-Minas.

Locus	Motif	Sequências dos primers (5' - 3')	Ta (°C)	Faixa de tamanho do alelo (pb)
Lalex1	(AT)8	F: GGACGTCATACCTTCTCTGTCC R: CTGAACACACTCAGAGGAAAGC	60	118 - 124
Lalex5	(CT)8	F: CCGTAACAGGCTCGGTTTT R: AGAGACAGGTCTGGGGAACA	60	109 - 139
Lalex25	(TG)8	F: AGACATGTTGCTGCCCTCCA R: CTATAGAAACAGAAGCGCTAA	60	184 - 286
Lalex30	(CG)8	F: CACCGATTTCAGAACTGAAGG R: ATGCAGAAAAATCGCAAACA	60	177 - 203
Lalex37	(CAG)6	F: TGGGTAAACGCAAAACAATC R: GAGACAGACACACTGGACTTTGA	62	259 - 265
Lalex38	(AT)9	F: GCGAAAATCGCAGGTTTCT R: ACGATATTCACGCACAAGA	62	277 - 295
Lalex58	(TTC)6	F: CAGAACCGTCCTGTTCAACC R: CCAACACCGTCACTCCTAACT	60	282 - 288

Motif = motivo de repetição; Ta = temperatura de anelamento; pb = pares de base.

Análise dos dados

Os resultados das genotipagens dos marcadores microssatélites foram utilizados para a determinação dos alelos através do software GeneMarker v2.6.0 (SoftGenetics, 2004-2016). As frequências alélicas foram obtidas pelo Coancestry (Wang, 2011) que também foi usado para calcular as relações de parentesco e o percentual de indivíduos não relacionados usando os coeficientes de Wang R_W (2002) e Lynch & Li R_{LL} (Lynch, 1998; Li et al., 1993).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com os tamanhos dos alelos definidos através das genotipagens realizadas, foram calculadas as frequências alélicas para cada família (Tabela 3) nas quais se observou valores desde 0,17 até 1,0, revelando uma alta consanguinidade para determinados marcadores microssatélite. Dois alelos privados foram detectados na Estação de Três Marias: o 123 (Lalex1) e o 181 (Lalex30). O polimorfismo das microssatélites foi muito baixo com a maior parte delas mostrando apenas dois alelos, à exceção do Lalex30 com quatro alelos e do Lalex38 com três alelos.

Tabela 3: Distribuição de alelos e suas respectivas frequências em três famílias de irmãos completos de *Lophiosilurus alexandri* construídas nas Estações de Piscicultura de Pernambuco (BEB), Minas Gerais (BH) e Sergipe (IT).

Locus		Alelos		Locus		Alelos	
Lalex1				Lalex37			
	121	123	125		262	265	
BEB	0,575	—	0,425	BEB	0,775	0,225	
BH	0,5	0,384	0,115	BH	0,5	0,5	
IT	0,6	—	0,4	IT	0,525	0,475	
Lalex5				Lalex38			
	135	139			277	289	291
BEB	0,8	0,2		BEB	0,4	0,25	0,35
BH	0,923	0,076		BH	—	1	—
IT	0,55	0,45		IT	0,7	0,3	—
Lalex25				Lalex58			
	254	266			284	287	
BEB	0,5	0,5		BEB	0,825	0,175	
BH	—	1		BH	0,846	0,153	
IT	—	1		IT	0,725	0,275	
Lalex30							
	177	181	185	187			
BEB	—	—	0,5	0,5			
BH	0,269	0,73	—	—			
IT	—	0,125	0,5	0,375			

O número de alelos em cada família (Tabela 4) se manteve pequeno (dois alelos) para a maioria dos casos, com exceção dos Lalex1, Lalex30 e Lalex38 que apresentaram três alelos em alguma família. Houve casos como o do Lalex25 que revelou uma elevada consanguinidade para duas das três famílias, com um único alelo.

Como a consanguinidade na Estação de Bebedouro era muito alta, não foi possível encontrar situações em que quatro alelos fossem detectados entre os parentais (situação em que ambos os parentais fossem heterozigotos para um dado marcador), que variaram entre um e dois alelos apenas. Em estudos de relação de parentesco, quanto mais polimórficas forem as microssatélites, mais precisos serão os índices de relação (Moraes et al., 2012).

Tabela 4: Número de indivíduos (N), número de alelos (Na) e médias de todos os loci.

	Lalex1	Lalex5	Lalex25	Lalex30	Lalex37	Lalex38	Lalex58	Média
BEB								
N	20	20	20	20	20	20	20	
Na	2	2	2	2	2	3	2	2,14
BH								
N	13	13	13	13	13	13	13	
Na	3	2	1	2	2	1	2	1,85
IT								
N	20	20	20	20	20	20	20	
Na	2	2	1	3	2	2	2	2

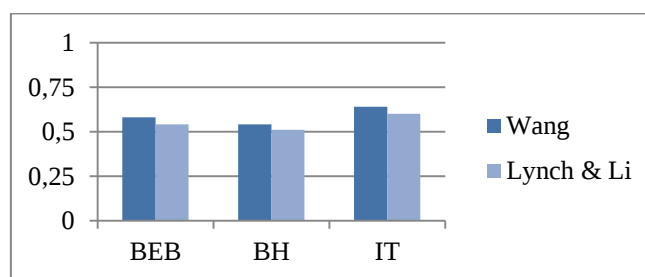
Ao comparar a quantidade de alelos detectados no *L. alexandri* com outras espécies da mesma família, a exemplo do *Microglanis cottoides* e do *Pseudoplatystoma punctifer*, ambos com detecção de 2 até 20 alelos (Revaldaves et al., 2005; Saulo-Machado et al., 2013; Shibatta, 2003), foi possível enxergar uma margem de alelos detectados em indivíduos selvagens de pacamã muito inferior (2 a 6 alelos). Esse baixo número de alelos talvez possa estar atrelado à espécie e sua estratégia de vida (deslocamento limitado e cuidado parental). Outra espécie de bagre de outro continente, *Neoceratodus forsteri*, para o qual um montante de 336 marcadores microsatélites foi desenhado, apenas 11 desses marcadores resultaram em algum polimorfismo que também se margeou entre 2 a 6 alelos e teve sua baixa diversidade genética também associada a mesma estratégia de vida sedentária e de cuidado com a prole (Hughes et al., 2015) – o que fortalece a hipótese de que o comportamento desses animais de fato interfira na sua diversidade genética.

Para explorar as similaridades genéticas entre os irmãos completos de cada família, um total de 458 combinações par a par, chamadas díades, foi considerado no cálculo uma vez que o sexo dos indivíduos (juvenis) de cada prole não estava disponível e todos foram tratados como potenciais casais. Tanto R_W como R_{LL} foram fiéis em expressar valores de parentesco próximos ao esperado (Tabela 5; Figura 1), sendo este o de irmãos completos compartilhando 50% da genética parental.

Tabela 5: Índices de relação de parentesco estimados para as proles de irmãos completos nos plantéis da Estação de Piscicultura de Bebedouro (PE), de Itiúba (SE) e de Três Marias (MG).

	Índices (média)	
	Wang	Lynch & Li
BEB	0,58 ± 0,03	0,54 ± 0,04
BH	0,54 ± 0,07	0,51 ± 0,09
IT	0,64 ± 0,03	0,60 ± 0,04

Figura 1: Gráfico comparativo dos índices de parentesco avaliados para as proles de irmãos completos.



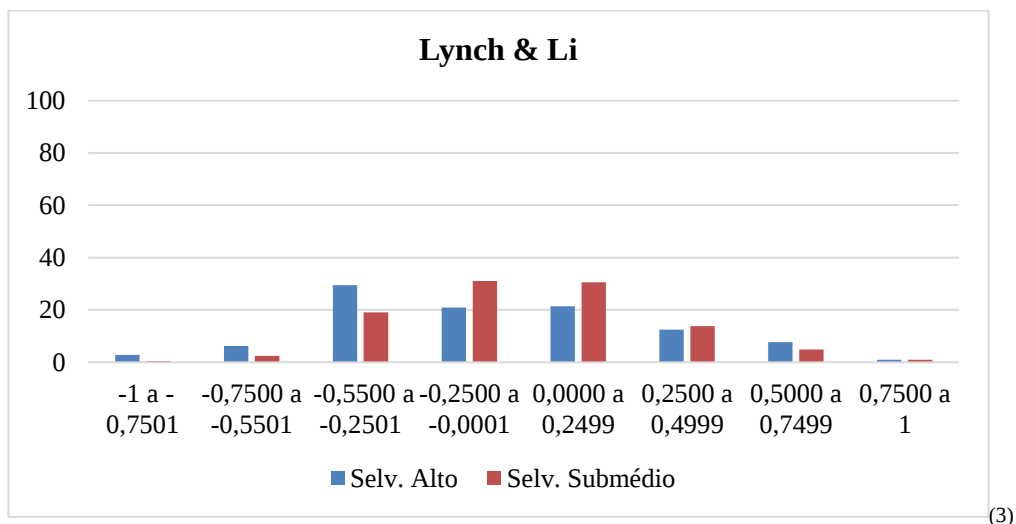
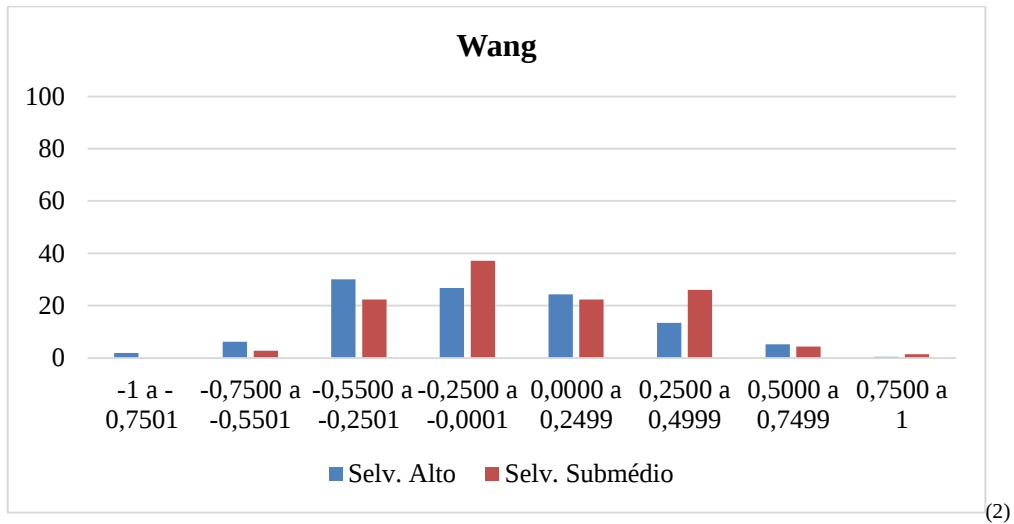
Os mesmos índices foram aplicados em duas populações de animais selvagens (Tabela 6), uma do submédio e outra do alto (Três Marias – BH), a fim de garantir que ambos sejam verdadeiros em suas estimativas, uma vez que se espera uma ausência de parentesco entre animais de ambiente natural. Os resultados garantiram a eficiência dos índices de Wang e Lynch & Li ao encontrarem valores negativos de relação parental, porém muito próximos a zero.

Tabela 6: Índices de relação de parentesco estimados para populações de animais selvagens capturados nas regiões do alto e submédio São Francisco.

	Índices (média)	
	Wang	Lynch & Li
Selv. Submédio	-0,02 ± 0,09	-0,005 ± 0,11
Selv. Alto	-0,05 ± 0,12	-0,02 ± 0,14

A porcentagem de indivíduos em cada classe de relação de parentesco foi levantada para o alto e submédio São Francisco (Figuras 2 e 3).

Figura 2 e 3: Gráficos comparativos do percentual de indivíduos selvagens com ou sem relação de parentesco nas regiões do alto e submédio São Francisco para os índices de Wang (2) e Lynch & Li (3).



Ao agrupar todas as díades dos selvagens em intervalos de parentesco conhecidos, foi possível detectar que existem aproximadamente 42,6% de díades positivas no alto enquanto no submédio esse total chega a 51,5% (valores médios de porcentagens entre R_W e R_{LL} para cada população). Isso sugere, novamente, que a estratégia de vida do pacamã (deslocamento limitado e cuidado parental) possa interferir sobre as relações de parentesco, ocasionando acasalamento entre indivíduos aparentados mais do que ocorreria ao acaso em ambiente natural.

CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Atividades	2018						2019					
	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J
Revisão de literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Extração de DNA e genotipagem		X	X	X	X	X						
Entrega do relatório parcial							X	X				
Análise em programas computacionais de genética				X	X	X	X	X	X	X	X	
Elaboração de artigo científico										X	X	
Entrega do relatório final											X	X

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Entende-se, a partir dos dados levantados, que o *Lophiosilurus alexandri* é uma espécie geneticamente complexa no sentido do desenvolvimento de atividades ligadas à aquicultura comercial, porém viável para a execução de programas de repovoamento guiados pelos índices de Wang (R_W) e Lynch & Li (R_{LL}) como referência nos cruzamentos realizados em cativeiro pelas Estações de Piscicultura ao longo do Rio São Francisco. Neste sentido, a partir das combinações par a par das famílias de cativeiro foi possível determinar que passe a existir alguma relação de parentesco entre pares de indivíduos com valores maiores ou iguais a 0,12 para R_W e 0,03 para R_{LL} . Ou seja, é crucial que sejam priorizados os cruzamentos entre reprodutores de pacamã cujas proles resultem em relações parentais inferiores a 0,12, caso Wang seja o índice adotado, ou menor que 0,03 para Lynch & Li.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Yane Santos et al. Análise de parentesco em filhotes de pirarucu (*Arapaima gigas* Cuvier, 1817), utilizando marcadores microssatélites. 2006.

BARBOSA, José Milton; SOARES, Emerson Carlos. Perfil da ictiofauna da bacia do São Francisco: estudo preliminar. **Revista Brasileira de Engenharia de Pesca**, v. 4, n. 1, p. 155-172, 2009.

BRASIL. Decreto-Lei nº 794, de 19 de outubro de 1988. Código de Pesca. Rio de Janeiro, RJ, Disponível em: <<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/declei/1930-1939/decreto-lei-794-19-outubro-1938-350346-publicacaooriginal-1-pe.html>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

CARVALHO, D.C.; PERINI, V.R.; BASTOS, A.S.; COSTA, I.R.; LUZ, R.K.; FURTADO, C.; PROSDOCIMI, F. The complete mitochondrial genome of the threatened neotropical catfish *Lophiosilurus alexandri* (Siluriformes: Pseudopimelodidae) and phylogenomic analysis indicate monophyly of Pimelodoidea. **Genetics and Molecular Biology**, v.39, p.674-677, 2016.

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**, v. 255, p.1-29, 2006.

COIMBRA, M.R.M.; LIMA, A.P.S.; OLIVEIRA, K.K.C.; SEVERI, W. Microsatellite assessment of the genetic diversity in indigenous populations of curimba (*Prochilodus argenteus*) in the São Francisco river (Brazil). **Conservation Genetics**, v.18, p.965-975, 2017.

DANTAS, Hozana Leite et al. Avaliação da estrutura genética do surubim, *Pseudoplatystoma corruscans* (Actinopterygii: Siluriformes) como subsídio para o repovoamento do submédio São Francisco. 2010.

FARIAS, R. S. Avaliação do perfil genético dos reprodutores de pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876) destinados ao repovoamento do rio São Francisco. 2019. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

GODINHO, Alexandre Lima; GODINHO, Hugo Pereira. Breve visão do São Francisco. Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte: PUC Minas, v. 468, p. 15-23, 2003.

HUGHES, Jane M. et al. Extremely low microsatellite diversity but distinct population structure in a long-lived threatened species, the Australian lungfish *Neoceratodus forsteri* (Dipnoi). **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0121858, 2015.

ICMBio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Portaria nº 34, de 27 de maio de 2015. Plano de Ação Nacional para Conservação das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna Aquática da Bacia do São Francisco - PAN São Francisco. 2015. Disponível em:

<<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/docs-plano-de-acao/pan-fauna-aquatica-sao-francisco/portaria-aprovacao-pan-fasf-site.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2018.

LI, C. C., D. E. Weeks, and A. Chakravarti, 1993. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. **Hum. Hered.** 43, 45-52.

LIMA, R.V. Marcadores microssatélites para o pacamã (*Lophiosilurus alexandri*, Steindachner, 1876): uma espécie endêmica ameaçada de extinção no rio São Francisco. 2016. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

LOPES, J. P.; FRANÇA, F. L.; NETO, M. A. S. O domínio na produção de alevinos de pacamã–Propagação na Chesf permite repovoamento no rio São Francisco. **Panorama Aquicult**, v. 23, p. 24-29, 2013.

LUZ, Ronald Kennedy; DOS SANTOS, José Cláudio Epaminondas. Densidade de estocagem e salinidade da água na larvicultura do pacamã. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 43, n. 7, p. 903-909, 2008.

LYNCH, M., 1988. Estimation of relatedness by DNA fingerprinting. **Mol. Biol. Evol.** 5, 584-599.

LYNCH, Michael; RITLAND, Kermit. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. **Genetics**, v. 152, n. 4, p. 1753-1766, 1999.

MORAES, M. A. et al. Estimating coancestry within open-pollinated progenies of a dioecious species: the case study of *Myracrodruon urundeuva*. **Silva e Genetica**, v. 61, n. 1-6, p. 256-264, 2012.

MOREIRA, A.A.; HILSDORF, A.W.S.; SILVA, J.V.; SOUZA, V.R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microssatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.521-526, 2007.

PEREIRA, Silvio B. et al. Estudo do comportamento hidrológico do Rio São Francisco e seus principais afluentes. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 11, n. 6, p. 615-622, 2007.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; GOMES, P.C.; BLANCK, D.V.; VARGAS, L.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T.S. Monitoramento da variabilidade genética de pacu, *Piaractus mesopotamicus*, do programa de aumento de estoque do rio Paranapanema. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p.1191-1195, 2009.

QUELLER, David C.; GOODNIGHT, Keith F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, v. 43, n. 2, p. 258-275, 1989.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **J Hered**, v.86, p.248–249, 1995.

REVALDAVES, Eloisa et al. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 463-465, 2005.

RIBEIRO, R.P.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M.P.; RESENDE, E.K.; SOUZA, F.P.; POVH J.A.; POVEDA-PARRA, A.R.; GOES, E.S.R.; GALO, J.M.; JUNIOR, M.B.; LOPERA-BARRERO, N.M. Genetic characteristics of Tambaqui broodstocks in the state of Rondônia, Brazil: implications on production and conservation. **Semina: Ciências Agrárias**, v.37, p.2375-2386, 2016.

RITLAND, Kermit. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. **Genetics Research**, v. 67, n. 2, p. 175-185, 1996.

RODZEN, Jeff A.; FAMULA, Thomas R.; MAY, Bernie. Estimation of parentage and relatedness in the polyploid white sturgeon (*Acipenser transmontanus*) using a dominant marker approach for duplicated microsatellite loci. **Aquaculture**, v. 232, n. 1-4, p. 165-182, 2004.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989. 34p.

SANTOS, J.C.E.; LUZ, R.K. Effect of salinity and prey concentrations on *Pseudoplatystoma corruscans*, *Prochilodus costatus* and *Lophiosilurus alexandri* larviculture. **Aquaculture**, v.287, p.324–328, 2009.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Peixes da bacia do rio São Francisco, p. 401-413. In: LOWE-McCONNELL, R.H. Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais. São Paulo: Edusp, 1999. 534p.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; NUÑER, A.P.O.N.; GODINHO, H.P.; VERANI, J.R. Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco. In: GODINHO, H.P.; GODINHO, A.L. (org). Águas e peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais. Belo Horizonte. PUC Minas; 2003. p. 229–74.

SAULO-MACHADO, A. C. et al. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). **Conservation genetics resources**, v. 3, n. 2, p. 307-310, 2011.

SCHUELKE, Markus. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233, 2000.

SEKINO, Masashi et al. Relatedness inferred from microsatellite genotypes as a tool for broodstock management of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. **Aquaculture**, v. 233, n. 1-4, p. 163-172, 2004.

SHIBATTA, O. Family Pseudopimelodidae. **Checklist of the freshwater fishes of South America**, 2003.

SMULDERS, M. J. M. et al. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 94, n. 2, p. 264-272, 1997.

SOFTGENETICS, LLC. GeneMarker (v. 2.6.0): The Biologist Friendly Software. 2004-2016.

SRIPHAIROJ, Kednapat; KAMONRAT, Wongpathom; NA-NAKORN, Uthairat. Genetic aspect in broodstock management of the critically endangered Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* in Thailand. **Aquaculture**, v. 264, n. 1-4, p. 36-46, 2007.

TENÓRIO, R.A. Aspectos da biologia reprodutiva do niquim *Lophiosilurus alexandri* Steindachner, 1876 (Actinopterygii, Pimelodidae) e crescimento da progênie em diferentes condições ambientais. 2003. 57p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

WANG, Jinliang. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 1203-1215, 2002.

WANG, Jinliang. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 141-145, 2011.

WANG, J. Estimating pairwise relatedness in a small sample of individuals. **Heredity**, v. 119, n. 5, p. 302, 2017.

DIFICULDADES ENCONTRADAS

As constantes interrupções no fornecimento e energia do Departamento de Pesca e Aquicultura interferiram no andamento do projeto.

PARECER DO ORIENTADOR

Bruno desenvolveu todos os experimentos e atividades com afinco e dedicação sem prejudicar suas atividades acadêmicas.

Recife,

09 / 07 / 2019

Assinatura do(a) Orientador(a)