

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TRANSFERIBILIDADE DE *PRIMERS* SSR HETERÓLOGOS EM
Pseudoplatystoma reticulatum

Autor: Jefferson Murici Penafort
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

MARINGÁ
Estado do Paraná
julho – 2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS SSR HETERÓLOGOS EM
Pseudoplatystoma reticulatum

Autor: Jefferson Murici Penafort
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM ZOOTECNIA, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá- Área de Concentração Produção Animal.

MARINGÁ
Estado do Paraná
julho – 2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá - PR, Brasil)

P397t	<p>Penafort, Jefferson Murici</p> <p>Transferibilidade de primers SSR heterólogos em <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i> / Jefferson Murici Penafort. -- Maringá, PR, 2020. 63 f.: il. color., figs., tabs.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Departamento de Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, 2020.</p> <p>1. Cachara (<i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>). 2. Transferibilidade de primers heterólogos. I. Ribeiro, Ricardo Pereira, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências Agrárias. Departamento de Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDD 23.ed. 639.31</p>
-------	--



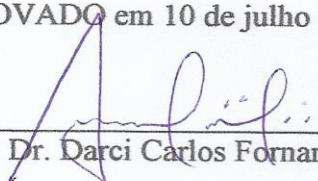
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

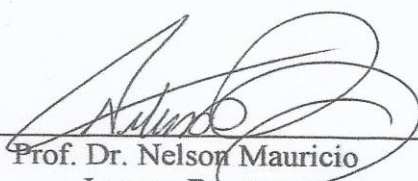
TRANSFERIBILIDADE DE PRIMERS SSR HETERÓLOGOS
EM PSEUDOPLATYSTOMA RETICULATUM

Autor: Jefferson Murici Penafort
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro

TITULAÇÃO: Doutor em Zootecnia - Área de Concentração Produção
Animal


APROVADO em 10 de julho de 2020.


Dr. Darci Carlos Fornari


Prof. Dr. Nelson Mauricio
Lopera-Barrero


Prof. Dr. Carlos Antonio Lopes de
Oliveira


Prof. Dr. Jayme Aparecido Povh


Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro
(Orientador)

“Os grandes espíritos sempre tiveram que lutar contra a oposição feroz de mentes medíocres.”

(Einstein)

A minha família, em especial à minha querida e amada mãe Darcy Murici e ao meu pai

Raimundo Penafort (*in memoriam*).

Aos meus irmãos Raicy, Eldimar e Deise Ane.

À minha esposa Daniely e minhas queridas filhas Ana Carolina e Ana Catarina, seus incentivos possibilitaram a realização desta pesquisa.

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS

Aproveito para expressar meus sinceros agradecimentos aos colegas e Instituições que contribuíram para a realização desta pesquisa:

A Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) e em especial ao Instituto Sócio Ambiental e dos Recursos Hídricos (ISARH).

A Universidade Estadual de Maringá (UEM) e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia (PPZ).

Aos Professores Dr. Paulo Jorge Oliveira Ponte de Souza e Dr. Israel Hidemburgo Aniceto Cintra (ISARH/UFRA), pelo estímulo e confiança.

Ao Professor Dr. Rosemiro dos Santos Galate (ICIBE/UFRA), pela amizade, consideração e apoio. Nos momentos em que tinha dúvidas com relação às questões burocráticas, o mesmo sempre me orientou da melhor forma.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro, pela orientação e pela confiança em meu trabalho. Nas horas de tirar as dúvidas fui contemplado além das conversas sobre as nossas famílias.

Aos Professores Doutores do PPZ/UEM:

Carlos Oliveira, Lauro Vargas, Ferenc Istvan Bánkuti e Eliane Gasparino, pela simplicidade e acolhimento nas horas que precisava tirar dúvidas. Em especial ao Prof. Dr. Lauro, pelas conversas sobre as nossas famílias em sua sala.

À Professora Dr^a. Maria Cláudia Takasusuki do Departamento de Biologia Celular (DBC), pela compreensão quando das dúvidas em suas aulas de Marcadores Moleculares.

Ao Prof. Dr. Nelson Mauricio Lopera-Barrero da Universidade Estadual de Londrina (UEL), pela grande contribuição nas horas precisas e necessárias.

Ao orientado de doutoramento do Professor Nelson, Felipe Pinheiro de Souza. Foi extremamente importante para a realização desta pesquisa. Suas orientações, treinamento e contribuição na estatística.

Aos professores da Banca de Defesa, Dr. Nelson Maurício Lopera-Barrero, Dr. Jayme Aparecido Povh, Dr. Carlos Antonio Lopes de Oliveira e Dr. Darci Carlos Fornari, pelas correções, sugestões e análises da tese apresentada que engrandeceu ainda mais a pesquisa.

A todos os colegas do grupo de pesquisa PeixeGen, em especial atenção às colegas e pesquisadoras Laís Mantovani e Gabriela Hernandez, pelas contribuições e aprendizado. Sem estas jamais conseguiria seguir os protocolos nas análises.

Ao Dr. Pedro Castro, pelas orientações e correções dos escritos. Foi de extrema importância para o enriquecimento e desenvolvimento intelectual da presente pesquisa.

Aos colegas Humberto Todesco, Filipe Teodózio e Eric Campos, pelo companheirismo e acolhimento, além da oportunidade de participar de seus experimentos.

Aos Colegas da CODAPAR, os senhores Vitor, Cleiton e José Geraldo pela simplicidade e aprendizado durante as atividades de manutenção dos experimentos.

Às colegas pesquisadoras Angélica de S. Khatlab e Fernanda Tanamati, pelas conversas produtivas sobre as técnicas e protocolos de extração de DNA.

Agradeço especialmente à Dra. Angélica de S. Khatlab, pelas contribuições na formatação do material escrito, dicas e incentivo. Suas palavras de otimismo foram importantes para que ocorresse o progresso da presente pesquisa.

A técnica de laboratório do PeixeGen, Bióloga Dilma, por todo auxílio no laboratório e pelo convívio carinhoso desse período das pesquisas.

Aos novos amigos que fiz nesse período na UEM e em Maringá.

BIOGRAFIA

JEFFERSON MURICI PENAFORT, filho de Darcy Murici Penafort e Raimundo da Silva Penafort, nasceu na cidade de Macapá, Estado do Amapá, no dia 20 de setembro de 1962.

Em 1986, ingressou no Curso de Licenciatura Plena em Ciências ofertado pelo Centro de Estudos Superiores do Pará – CESEP, hoje Universidade da Amazônia - UNAMA e foi graduado em abril de 1990, obtendo o título de Licenciado Pleno em Ciências.

Em 1990, iniciou sua atividade profissional, através de concurso público, como docente (Professor AD-4) na Secretaria de Estado de Educação – SEDUC/PA em Belém – PA.

Em 1992, ingressou no Curso de Especialização em Computação Gráfica pelo Departamento de Informática pela Universidade Federal do Pará, em Belém – PA, obtendo o título de Especialista em Computação Gráfica, em 1993.

Em 1997, ingressou no Curso de Mestrado em Engenharia de Pesca pelo Departamento de Engenharia de Pesca - DEP da Universidade Federal do Ceará – UFC, em Fortaleza – CE. Conclui, em 1999, obtendo o título de Mestre em Engenharia de Pesca, na Área de Concentração Aquicultura.

Em 2002, ingressou na Universidade Federal Rural da Amazônia (UFRA) campus Belém, através de concurso público, assumindo o Cargo de Professor 3º Grau.

Em março de 2017, ingressou no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, em nível de Doutorado, área de concentração Produção Animal – Piscicultura, na Universidade Estadual de Maringá, sob a orientação do Prof. Dr. Ricardo Pereira Ribeiro.

Aos 10 dias do mês de julho de 2020, submeteu-se à banca examinadora para defesa de doutorado.

ÍNDICE

	Página
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DA LITERATURA.....	3
1.0 Produção do pescado no Brasil e no mundo.....	3
2.0 Produção de <i>Pseudoplatystoma</i> sp. (cacharas, pintados e surubins).....	8
3.0 <i>Pseudoplatystoma reticulam</i> , o cachara.....	11
4.0 Marcadores Moleculares Microsatélites aplicados na piscicultura.....	12
5.0 Utilização de <i>primers</i> heterólogos na transferibilidade de locos.....	14
6.0 Potencial aquícola da cachara, <i>Pseudoplatystoma reticulam</i> , melhoramento genético e pesca esportiva.....	17
REFERÊNCIAS.....	22
III. OBJETIVO GERAL.....	30
IV. TRANSFERIBILIDADE DE <i>PRIMERS</i> HETERÓLOGOS SSR DE ESPÉCIES DOS GRUPOS <i>Brachyplatystoma</i> e <i>Pseudoplatystoma</i> NA CAHARA (<i>P. reticulatum</i>) (Eigenmann & Eigenmann, 1889).....	31
Resumo.....	31
Abstract.....	33
Introdução.....	34
Materiais e Métodos.....	36
Resultados.....	40
Discussão.....	41
Conclusão.....	45
Agradecimentos.....	45
Referências.....	45
V. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	55
VI. ANEXO.....	56

LISTA DE TABELAS

	Página
I. INTRODUÇÃO.	
Tabela 1. Produção e uso de pesca e aquicultura global (milhões de toneladas ¹ – peso vivo) em média por ano.....	4
IV. TRANSFERIBILIDADE DE <i>PRIMERS</i> HETERÓLOGOS SSR DE ESPÉCIES DOS GRUPOS <i>Brachyplatystoma</i> e <i>Pseudoplatystoma</i> NA CAHARA (<i>P. reticulatum</i>) (Eigenmann & Eigenmann, 1889).....	31
Tabela 1. Características dos <i>primers</i> heterólogos utilizados na análise de marcadores moleculares microssatélites em amostras de cacharas (<i>P. reticulatum</i>).....	38
Tabela 2. Relação de <i>primers</i> heterólogos amplificados com sucesso em amostras de cacharas (<i>P. reticulatum</i>) e parâmetros genéticos.....	41

LISTA DE FIGURAS

	Página
I. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
Figura 1. Figura 1. Produção da aquicultura de peixes nativos, em quilogramas, por tipo de produto no ano de 2018, no Brasil e grande região.....	5
Figura 2. Produção da aquicultura de peixes nativos, em mil reais, por tipo de produto no ano de 2018, no Brasil e grande região.....	6
Figura 3. Produção de tilápias, por estado, exibindo os estados com maior produção.....	7
Figura 4. Produção (em quilogramas) de cacharas, pintados e híbridos no Brasil e Grande Região no ano de 2018.....	9
Figura 5. Valor da produção (em mil reais) de cacharas, pintados e híbridos no Brasil e Grande Região no ano de 2018.....	10
Figura 6. Exemplar de cachara, <i>Pseudoplatystoma reticulatum</i>	11
Figura 7. Pesqueiro no Estado do Paraná, na cidade de Mandirituba.....	20
Figura 8. Pesqueiro no Estado de São Paulo, na cidade de Itu.....	20
IV.TRANSFERIBILIDADE DE <i>PRIMERS</i> HETERÓLOGOS SSR DE ESPÉCIES DOS GRUPOS <i>Brachyplatystoma</i> e <i>Pseudoplatystoma</i> NA CAHARA (<i>P. reticulatum</i>) (Eigenmann & Eigenmann, 1889).....	31

RESUMO

As cacharas pertencem ao gênero *Pseudoplatystoma*, têm como base sua diferenciação por meio somente de coloração padrão e morfologia externa, além de apresentarem grande potencial para a aquicultura pelas suas características zootécnicas, organolépticas e de rendimento de carcaça favoráveis ao atendimento do mercado consumidor, porém seus estoques naturais vêm sofrendo redução nos últimos anos. Para reduzir esse impacto negativo, estudos voltados à conservação estão sendo realizados e cada vez mais, a obtenção de ferramentas genéticas que permitam a discriminação de parâmetros populacionais ou de estoques se torna de grande importância. Em função de seu estado de conservação e seu potencial para o cultivo e apesar de pesquisadores terem desenvolvido *primers* microssatélites para a espécie *P. reticulam*, objetivou-se através do presente estudo avaliar a transferibilidade de *primers* heterólogos SSR de espécies dos grupos *Brachyplatystoma* *Pseudoplatystoma* na cachara (*P. reticulam*). Foram analisadas amostras de nadadeira caudal de 222 indivíduos. A extração de DNA foi realizada utilizando protocolo com NaCl. A integridade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 1%. Foram avaliados 11 *primers* desenvolvidos para as espécies: *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma punctifer*. Foi observada amplificação cruzada de três *primers* específicos para a espécie *B. rousseauxii* (BR47, BR51 e BR61) e cinco *primers* específicos para a espécie *P. punctifer* (PPU01, PPU04, PPU09, PPU10 e PPU15), em *P. reticulatum*. Três *primers*: um de *B. rousseauxii* (BR38), um de *P. corruscans* (PCOR1) e um de *P. punctifer* (PPU13) não mostraram amplificação cruzada na espécie analisada. Os resultados indicaram a possibilidade de uso dos oito

primers heterólogos amplificados em estudos genéticos em *P. reticulatum*, os quais amplificaram o total de 97 alelos, com variação de 142pb a 400pb.

Palavras-chave: cacharas, *primers*, heterólogos.

ABSTRACT

The cacharas belong to the genus *Pseudoplatystoma*, their differentiation is based on standard color and external morphology and presenting great potential for aquaculture due to their zootechnical, organoleptic characteristics and favorable carcass yield, but their stocks natural resources have been decreasing in recent years. To reduce this negative impact, studies on conservation are being carried out and increasingly, then obtaining genetic tools that allow the population parameters or stocks discrimination becomes of great importance. Due to its conservation status and its potential for cultivation and although researchers have developed microsatellite *primers* for the species *P. reticulam*, the objective of this study was to evaluate the transferability of heterologous SSR *primers* from groups of *Brachyplatystoma* and *Pseudoplatystoma* species in the cachara (*P. reticulam*). Caudal fin samples from 222 individuals were analyzed. DNA extraction was performed using NaCl protocol. The extracted DNA integrity was checked on 1% agarose gel. Eleven primers developed for the species were evaluated: *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma corruscans*, *Pseudoplatystoma punctifer*. Cross amplification of three *B. rousseauxii*-specific *primers* (BR47, BR51 and BR61) and five *P. punctifer*-specific *primers* (PPU01, PPU04, PPU09, PPU10 and PPU15) were observed in *P. reticulatum*. Three *primers*: one from *B. rousseauxii* (BR38), one from *P. corruscans* (PCOR1) and one from *P. punctifer* (PPU13) did not show cross amplification in the

analyzed species. The results indicated the possibility of using eight amplified heterologous *primers* in genetic studies in *P. reticulatum*, which amplified a total of 97 alleles, ranging from 142bp to 400bp.

Keywords: cacharas, *primers*, heterologue

I. INTRODUÇÃO

A população em todo o mundo continua aumentando com velocidade significativa e a demanda por alimentos tem que acompanhar, de forma que se faz necessário uma alimentação saudável. Uma das respostas para essa busca é a produção de pescado de qualidade. Saath & Fachinello (2018) afirmam que a adversidade e insegurança alimentar atualmente é proveniente da impossibilidade das classes mais pobres de terem acesso aos alimentos necessários para se alimentar de forma saudável e balanceada.

Foi detectado que o consumo per capita por brasileiros é de 3kg de peixes cultivados profissionalmente, em água doce (PEIXE BR, 2020). A média mundial de consumo é o dobro da nossa, deixando claro que no Brasil que tem águas, espécies e clima para produção de peixes de cultivo, essa proteína fantástica não deveria ser estranha na mesa das famílias brasileiras.

Entre os anos de 1961 a 2017, a taxa média anual de crescimento do consumo total de peixe em alimentos aumentou em 3,1%, superando a taxa anual de crescimento da população mundial (1,6%) e a contribuição alimentar do peixe é mais significativa em termos de proteínas animais de alta qualidade, micronutrientes de importância fundamental para dietas diversificadas e saudáveis (SOFIA, 2020)

Conforme Schuller & Vieira Filho (2017) acredita-se que o Brasil tem todos os elementos necessários para se tornar grande produtor aquícola, entretanto, será essencial ocorrer mudanças institucionais que assumam o segmento produtivo e toda cadeia de produção, investindo em ciência e tecnologia. O Brasil tem disponibilidade hídrica, grande variedade de peixes nativos, de água doce para garantir a demanda de investimentos. Em vista disso, intensificar a produção de peixes de águas continentais através de instrumentos que constituam informações pertinentes deve ser procurado.

Sabe-se que os marcadores moleculares são importantes ferramentas para aquisição de conhecimentos em genética. Para tanto, diferentes técnicas utilizadas em análise de marcadores de DNA foram acrescentadas com o advento da PCR, possibilitando a amplificação de grande parcela de sequência específica de DNA sem necessidade de clonagem, começando com apenas algumas moléculas da sequência alvo (Turchetto et al., 2017).

Estes marcadores são muito utilizados para a determinação da variabilidade genética, compreender eventos demográficos passados que influenciou a atual distribuição geográfica da diversidade genética, uma abordagem filogeográfica (Segatto et al., 2017). TONG et al. (2002) destacam a importância dos marcadores microssatélites na utilização de uma série de programas genéticos na produção de peixes, ou seja, na aquicultura.

A espécie *Pseudoplatystoma reticulam* (Eigenmann e Eigenmann, 1889) comumente conhecido como surubim cachara tem grande importância biológica e elevado valor comercial na América do Sul (Bignotto et al., 2009). Apesar da sua relevância, conhecimentos sobre a biologia, ecologia, diversidade de populações e genética são escassos.

Diante a estas situações, objetivou-se avaliar a transferibilidade de *primers* heterólogos SSR de espécies dos grupos *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* na cachara (*P. reticulam*).

II. REVISÃO DA LITERATURA

1.0. Produção do pescado no Brasil e no mundo

A produção mundial de pescado alcançou o máximo de 179 milhões de toneladas em 2018, com a aquicultura representando 46% deste total. O valor total da produção pesqueira e aquícola em 2018 foram estimados em US\$ 362 bilhões, dos quais US\$ 232 bilhões foram provenientes da produção aquícola (FAO, 2020). Do total 156 milhões de toneladas utilizou-se no consumo humano 20,5 kg per capita.

A aquicultura tem sido responsável pelo contínuo crescimento no fornecimento de peixe para consumo humano. Entre 1961 e 2016, o aumento médio anual do consumo global de peixe (3,2%) superou o crescimento da população (1,6%) e excedeu o da carne de outros animais terrestres de interesse econômico (2,8%). (FAO, 2018).

Conforme o dado da FAO, até 2030, ocorrerá importante impulso ao atual baixo consumo de pescado na América Latina e no Caribe, de acordo com um novo relatório. Segundo o relatório do “*O Estado Mundial da Pesca e Aquicultura 2018*” (SOFIA, sigla em inglês), a região verá aumento considerável no consumo total de pescado: 33% (FAO no Brasil, 2018). A Tabela 1 exhibe, com detalhes, a produção global pesqueira e na aquicultura, incluindo o consumo aparente.

Tabela 1. Produção e uso de pesca e aquicultura global (milhões de toneladas¹ – peso vivo) em média por ano.

Categoria	1986–1995	1996–2005	2006–2015	2016	2017	2018
	Média por ano					
Produção						
Captura						
Interior	6,4	8,3	10,6	11,4	11,9	12,0
Marinho	80,5	83,0	79,3	78,3	81,2	84,4
Total captura	86,9	91,4	89,8	89,6	93,1	96,4
Aquicultura						
Interior	8,6	19,8	36,8	48,0	49,6	51,3
Marinho	6,3	14,4	22,8	28,5	30,0	30,8
Total aquicultura	14,9	34,2	59,7	76,5	79,5	82,1
Pesca mundial total e aquicultura	101,8	125,6	149,5	166,1	172,7	178,5
Utilização²						
Consumo humano	71,8	98,5	129,2	148,2	152,9	156,4
Usos não alimentares	29,9	27,1	20,3	17,9	19,7	22,2
População (bilhões) ³	5,4	6,2	7,0	7,5	7,5	7,6
Consumo aparente per capita (kg)	13,4	15,9	18,4	19,9	20,3	20,5

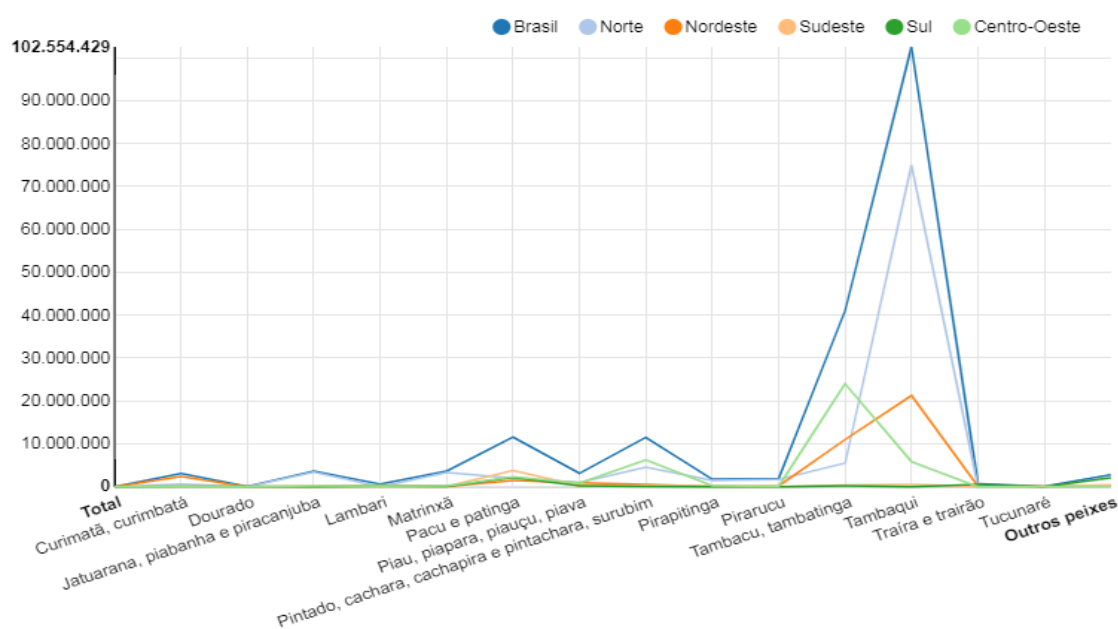
¹Exclui mamíferos aquáticos, crocodilos, jacarés, algas marinhas e outras plantas aquáticas;
²Dados de atualização para 2014 - 2018 são estimativas provisórias;
³Fonte de números populacionais: Nações Unidas (2019). Fonte: FAO (2020), modificado.

O Brasil produziu 722.560 toneladas de peixes de cultivo em 2018, com crescimento de 4,5% sobre as 691.700 toneladas do ano de 2017. Mesmo com as adversidades enfrentadas pela atividade tais como: o demorado processo de regulamentação dos piscicultores, problemas sanitários em alguns polos de produção, processos mercadológicos e climáticos, dentre outros, considera-se o desempenho em 2018 como positivo (PEIXE BR, 2019).

Em 2019 a produção avançou 4,9% e chegou a 758.006 toneladas. Foi o maior índice entre todas as proteínas animais no país, reforçando a posição de 4º maior produtor de tilápia do mundo. A espécie, aliás, já representa 57% da produção nacional e lidera o crescimento da produção, que avançou 31% nos últimos seis anos. A produção de peixes de cultivo saltou de 578.800 t (2014) a 758.006 t (2019) (PEIXE BR, 2020).

Os peixes nativos se mantêm fortes, com 38% em 2019, recuando quase dois pontos percentuais em relação aos 39,84% do ano anterior e, apesar de ligeiro recuo na produção

total, Rondônia se mantém com folga na liderança (PEIXE BR, 2020). Levantamento da mesma entidade identificou aumento de apenas 20 toneladas na produção, atingindo 287.930 t, em 2019, mas, recomendam-se investimentos em infraestrutura (plantas de processamento, desenvolvimento de novos produtos, etc.), controle sanitário, logística e licenciamento ambiental. A Figura 1 exibe a produção (em quilogramas) de peixes nativos, de interesse para o consumo humano, no Brasil e nas cinco regiões no ano de 2018. A Figura 2 mostra o valor da produção, em mil reais, no Brasil e regiões no ano de 2018.

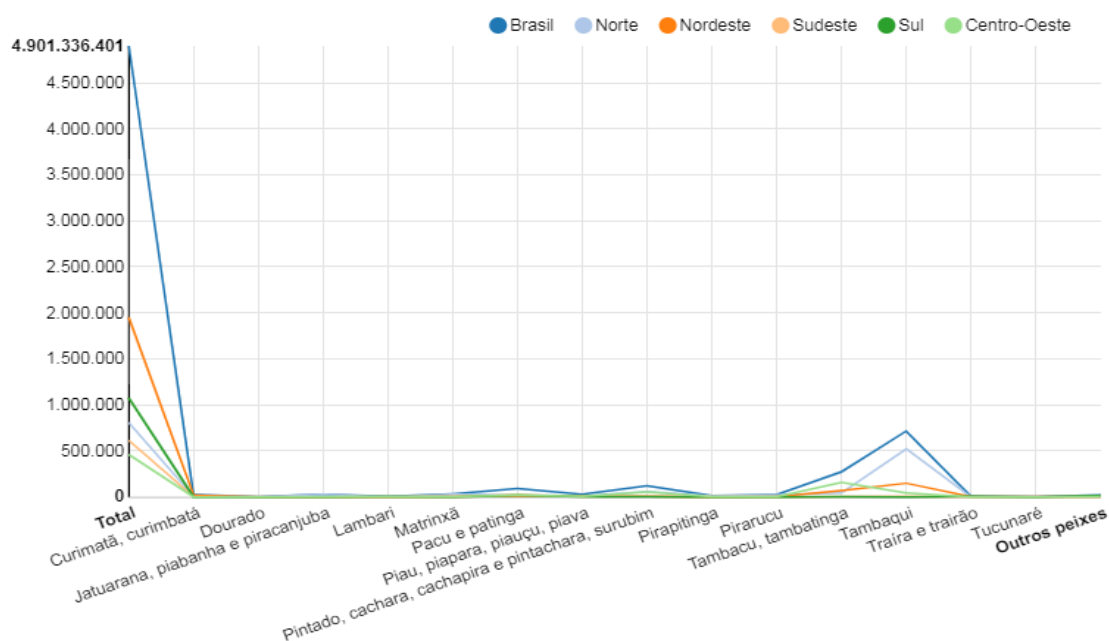


Fonte: IBGE - Pesquisa da Pecuária Municipal

Brasil e Grande Região x Tipo de produto da aquicultura

Figura 1. Produção da aquicultura de peixes nativos, em quilogramas, por tipo de produto no ano de 2018 no Brasil e grande região.

Fonte: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>.



Brasil e Grande Região x Tipo de produto da aquicultura

Figura 2. Produção da aquicultura de peixes nativos, em mil reais, por tipo de produto no ano de 2018 no Brasil e grande região.

Fonte: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>.

No estado do Paraná a produção cresceu 16% em 2018, saltando de 112.000 toneladas para 129.900 e o cultivo de tilápias cresceu acima da média da piscicultura, com o Brasil mantendo a 4ª posição entre os maiores produtores do mundo (PEIXE BR, 2019). Em 2019, o Paraná apresentou espetacular crescimento de 18,7% na produção de peixes de cultivo, com 154.200 toneladas, sucesso da atividade no Paraná se dá pelos bons índices de produtividade nas propriedades, com boa estrutura das empresas na área de comercialização e logística (PEIXE BR, 2020). A mesma entidade aponta que a produção de tilápias representou 57% de toda a Piscicultura brasileira em 2019. No ano anterior, a espécie participou com 54,1%. O resultado de 2019 foi 7,96% superior ao de 2018, comprovando a preferência nacional pela espécie. A Figura 3 exibe os maiores produtores de Tilápias em 2019 com destaque ao estado do Paraná, na produção.

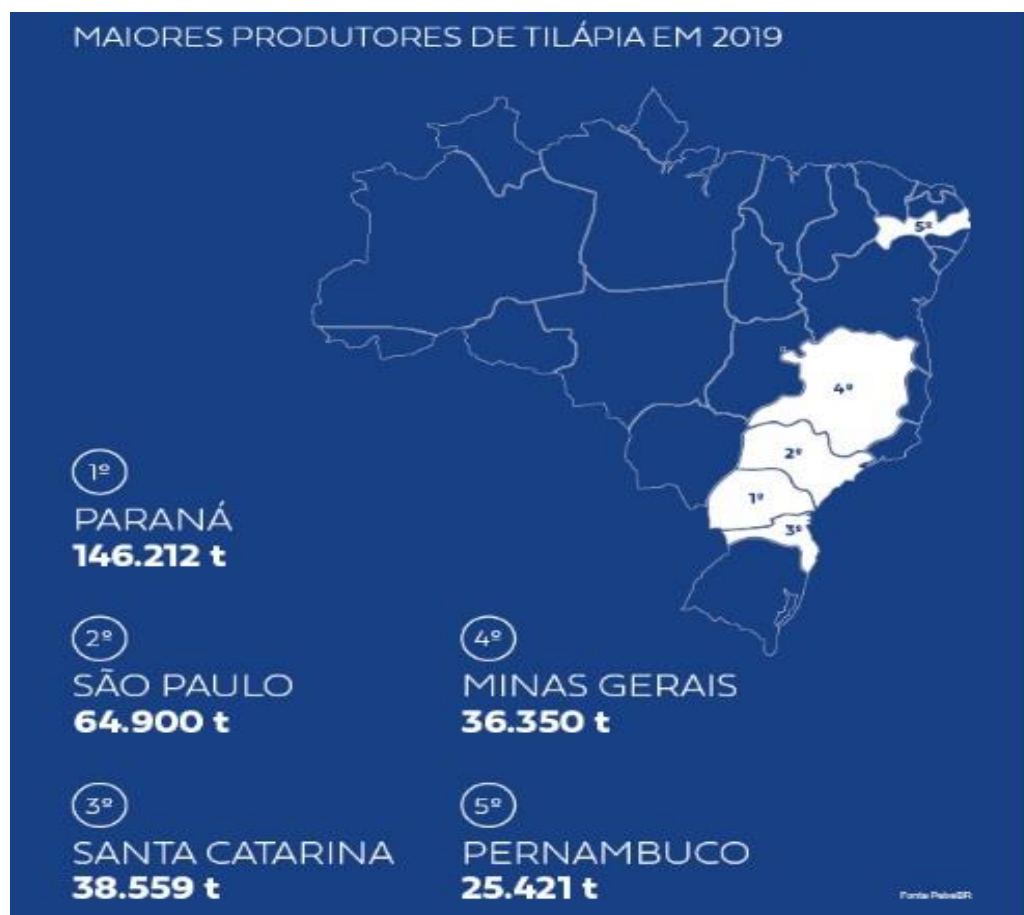


Figura 3. Produção de tilápias, por estado, exibindo os estados com maior produção. Fonte: PEIXE BR (2020).

Em pesquisa realizada por Brabo (2016) conclui-se que no Brasil, alguns Estados apresentam cadeias de produção aquícola em estágios mais avançados de estruturação, sendo autossustentáveis no que diz respeito aos insumos básicos e na capacidade de beneficiamento, enquanto outros são menos competitivos e necessitam de maiores investimentos. O estado do Pará se enquadra no segundo grupo, mesmo apresentando condições naturais favoráveis para a produção aquícola (Brabo, 2014).

A Espécie *Pseudoplatystoma reticulatum* comumente conhecido como surubim cachara, é um bagre da bacia do Paraná-Paraguai e da região central do Amazonas, possui barbilhões na região maxilar para auxiliar os estímulos químicos, hábitos noturnos com preferência em águas turvas (Crepaldi et al., 2006).

2.0. Produção de *Pseudoplatystoma* sp. (cacharas, pintados e surubins)

Pseudoplatystoma é um gênero amplamente distribuído em grandes rios da Região Neotropical, e as principais ocorrências são as bacias Amazônica/Orinoco, Bacia do Prata/Sub-bacia do Paraná e Bacia do São Francisco, Magdalena, Rupununi, Essequibo e Suriname. Notifica-se que as espécies de surubins mais representativas da pesca são o *P. corruscans*, *P. tigrinum* e *P. punctifer*, e foram registrados *P. corruscans* com 100 kg, enquanto o *P. tigrinum* dificilmente ultrapassa 20 kg (Bignotto et al., 2009; Aragão et al., 2008; Barthem e Goulding, 1997a; Barthem e Goulding, 1997b; Tavares, 1997; Burgess, 1989; Ferreira et al., 1998).

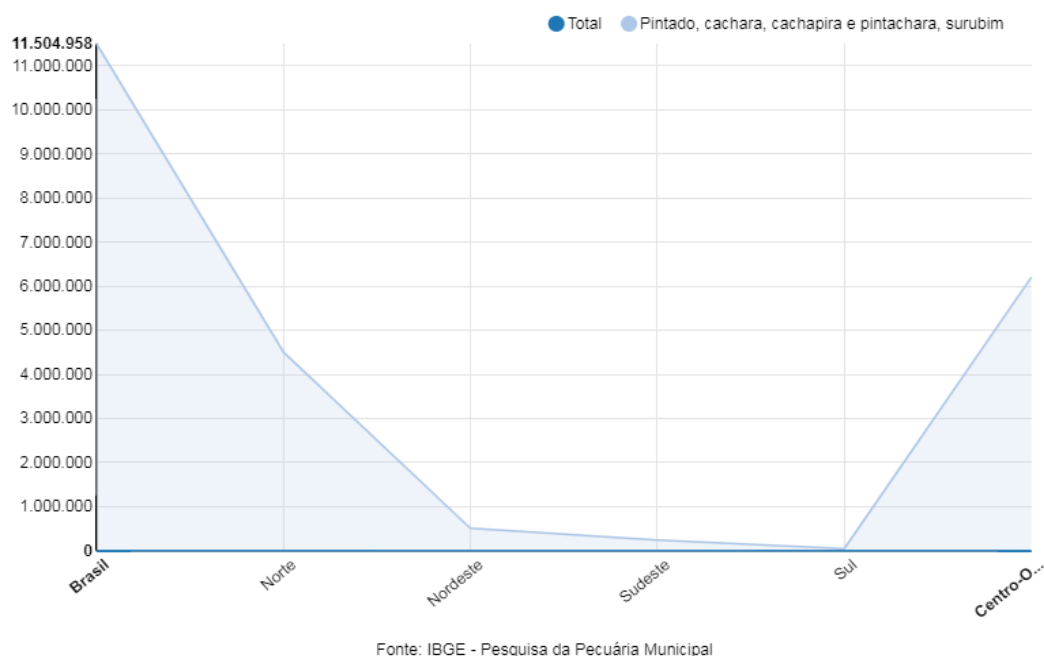
Surubim é uma denominação ampla e popular que engloba peixes de diferentes gêneros da Ordem Siluriformes. Tanto na pesca quanto na aquicultura, os principais representantes dos surubins são as espécies do gênero *Pseudoplatystoma* (Silva et al., 2015). Este gênero é representado comercialmente pelo pintado (*P. corruscans*), pelo cachara (*P. reticulatum*) (Campos, 2010). Na bacia do rio São Francisco, encontra-se apenas a espécie *P. corruscans*, conhecida popularmente como surubim ou pintado (Sato e Godinho, 2003). O pintado (*P. corruscans*) e o cachara (*P. fasciatum*), pertencentes a ordem Siluriformes, também são conhecidos como surubins (Rotta, 2003).

O gênero *Pseudoplatystoma* Bleeker se fundamenta em três espécies relatadas há muito tempo. Por volta da metade do ano de 2007 foram catalogadas apenas três espécies de *Pseudoplatystoma*, sendo elas *P. Corruscans*; *P. fasciatum* e *P. tigrinum*. Neste interim, o cachara era reconhecido como *Pseudoplatystoma fasciatum*, entretanto, na atualidade descobriu-se maior variação dentro do gênero *Pseudoplatystoma*, e novas espécies foram registradas e distintas, resultando em oito espécies no total. Descobriu-se que o *P. fasciatum*, refere-se a um animal exclusivo a região das Guianas, ocorrendo no Suriname e Guiana Francesa, incluindo o Rio Essequibo e Rio Suriname e seus afluentes. O cachara pertencente à região do Rio Paraná e Amazônia central, sendo endêmico do Brasil, Argentina, Bolívia, Paraguai e Uruguai. Desta forma o cachara foi diferenciado do *P. fasciatum* e reclassificado como *Pseudoplatystoma reticulatum* (Buitrago-Suárez e Burr, 2007).

As três espécies de surubins mais utilizadas para piscicultura são o *P. corruscans*, *P. fasciatum*, *P. reticulatum* e *P. punctifer*. Os principais híbridos são conhecidos por

“Cachapinta” (*P. reticulatum* x *P. corruscans*), “Pintachara” ou “Ponto e vírgula” (*P. corruscans* x *P. reticulatum*) (Carvalho et al., 2007). A produção mais expressiva de surubins em cativeiro ocorreu entre 2010 e 2011, período no qual a produção mais que triplicou (Silva et al. 2015), coincidindo com o início da produção comercial dos híbridos utilizando gêneros de Siluriformes, além de *Pseudoplatystoma*.

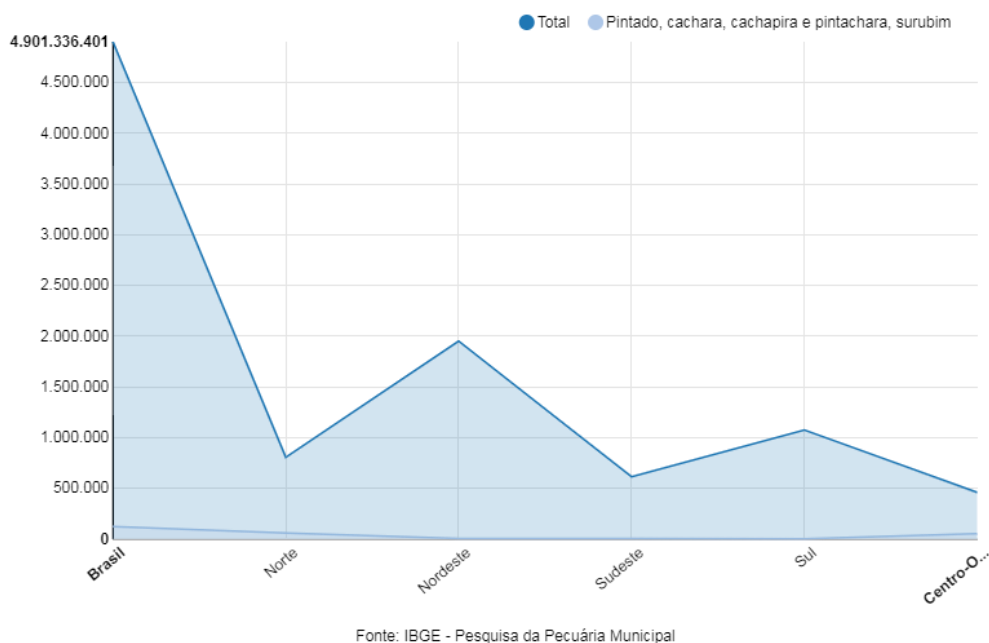
Nas regiões Centro-Oeste e Norte, onde os cultivos dos surubins e cacharas são mais comuns, a produção atingiu 75.107,9 e 94.578,0 toneladas respectivamente. Este valor expressivo acompanha o perfil e cultura dos habitantes dessas regiões em comparação ao resto dos consumidores brasileiros (Albuquerque, 2014). A Figura 4 exibe a produção em cativeiro de espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e híbridos no Brasil em 2018. Já a figura 5 mostra os valores obtidos no mesmo ano com a produção dos cacharas, surubins e híbridos.



Brasil e Grande Região x Tipo de produto da aquicultura

Figura 4. Produção (em quilogramas) de cacharas, pintados e híbridos no Brasil e Grande Região no ano de 2018.

Fonte: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>.



Brasil e Grande Região x Tipo de produto da aquicultura

Figura 5. Valor da produção (em mil reais) de cacharas, pintados e híbridos no Brasil e Grande Região no ano de 2018.

Fonte: <https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940>.

Os cacharas e surubins apresentam grande potencial para a aquicultura, possuindo características zootécnicas, organolépticas e de rendimento de carcaça favoráveis ao atendimento do mercado consumidor, além de que o real desenvolvimento da cadeia produtiva destes Siluriformes são necessários manejos mais eficientes para a reprodução, conhecimentos acerca das suas necessidades nutricionais, bem como da digestibilidade dos alimentos utilizados na formulação de dietas comerciais a fim de melhorar a eficiência alimentar (Honorato et al., 2015; Crepaldi et al., 2006).

Atualmente, em sistemas de produção há ocorrência de que a espécie a ser utilizada é o peixe oriundo do cruzamento entre o pintado (*Pseudopatystoma corruscans*) e do cachara (*Pseudopatystoma fasciatum*) dando origem a um híbrido denominado de pintachara ou simplesmente surubim (Almeida-Filho et al., 2012).

Boehlert (1996) reforça que a atividade da pesca com manejo inadequado degrada as populações selvagens; na distribuição etária, na idade da primeira reprodução, na estrutura genética e formação das espécies. Já na aquicultura, a sustentabilidade depende de diversas variáveis específicas das espécies; manutenção da variabilidade genética e a integridade

genética das populações, fundamentais para a domesticação de novas espécies e o melhoramento genético das espécies em cativeiro (Bartley et al., 2009).

3.0. *Pseudoplatystoma reticulatum* – a cachara

A etimologia do *Pseudoplatystoma* é originária do grego, *pseudēs*, significa falso; *platys*, plana e *estoma*, boca. Segundo Lauder e Liem (1983), os cacharas ocupam a seguinte posição sistemática:

Superclasse: Pisces

Classe: Osteichthyes

Subclasse: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Gênero: *Pseudoplatystoma* (Bleeker, 1862)

Espécie: *P. reticulatum* (C. H. Eigenmann & R. S. Eigenmann, 1889).

O *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann e Eigenmann, 1889), conhecido como cachara está entre os maiores peixes das principais bacias hidrográficas da América do Sul (Figura 6).



Figura 6. Exemplar de cachara, *P. reticulatum*. Fonte: Fishbase.

Os cacharas pertencem ao gênero *Pseudoplatystoma* possuindo como base sua diferenciação por meio somente de coloração padrão e morfologia externa (Ludberg e Littmann, 2003).

Recentemente, dividiu-se *Pseudoplatystoma fasciatum* nas espécies *P. fasciatum* (*Strictu sensu*) restrito aos rios da Guiana e Suriname, *P. punctifer*, bacias do Amazonas e nordeste do Brasil, *P. reticulatum*, bacia do Paraná-Paraguai e Amazonas Central, *P. orinocoense*, bacia de Orinoco e, *P. magdalenium*, na bacia do rio Magdalena na Colômbia. (Carvalho-Costa et al., 2011). Benites (2008) confirma que a espécie *P. corruscans*, distribui-se em rios da América do Sul e em especial no Brasil e Bacias do Alto Paraguai e Alto Paraná.

4.0. Marcadores moleculares microssatélites aplicados na piscicultura

Os marcadores moleculares são de primordial importância para a produção de estratégias de manejo e conservação, sendo os mais importantes da atualidade os microssatélites, SNPs, Indels e as sequências do DNA mitocondrial. O baixo custo constitui vantagem na utilização dos microssatélites no ato de sua genotipagem que é baseada na reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction, PCR) e com posterior separação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes por eletroforese (Hamoy et al., 2018; Vasemägi et al., 2010).

Uma ferramenta usada que busca a manutenção da variabilidade genética de peixes, realizando seleção e novos cruzamentos em uma mesma geração, aumentando a eficiência e definição de estratégias em programas de melhoramento é a utilização de marcadores moleculares. Considerando os fatores que influenciam nas características do indivíduo, os marcadores moleculares permitem identificar o potencial genético de um animal ou grupo de animais antes da expressão do seu fenótipo (Albuquerque, 2014; Regitano e Coutinho, 2001). Os estudos genéticos são muito relevantes para monitorar as espécies, pois podem ser a base de programas de conservação e produção comercial. (Ribeiro et al., 2016).

A diversidade de marcadores moleculares tem sido importante em estudos de genética de populações, populações cativas ou estoques, por serem diversificados, hipervariáveis e polimórficos, com destaque para os marcadores microssatélites de DNA ou Repetições de Sequências Simples (“Simple Sequence Repeats”-SSR), que são

marcadores de natureza codominante, baseados na herança mendeliana, proporcionam diferenciar indivíduos homocigotos e heterocigotos, e não é possível com marcadores dominantes (DeWoody e Avise, 2000; Tautz, 1989; Turchetto et al., 2017). São encontrados com relativa abundância no genoma, eficientes e de baixo custo, além de identificados em procariotos e eucariotos (Castro, 2015; Turchetto-Zolet et al., 2017). O número de unidades de repetição pode ser variável entre genótipos, e torna os SSRs marcadores altamente polimórficos e adequados para diversos tipos de análises genéticas (Zanella et al., 2017).

Os marcadores microssatélites têm sido utilizados em estudos de análise de parentesco, paternidade, certificação de pedigree na genética de populações (Tautz, 1989), sendo utilizados em uma série de programas genéticos na aquicultura (Tong et al., 2002), em uma variedade de peixes (Tong et al., 2005). Em análises populacionais, recomenda-se a utilização de um número alto de *loci* microssatélites para obter informações mais completas e confiáveis (Zane et al., 2002). Para espécies não modelos, foram também reportadas tentativas generalizadas de transferabilidade de marcadores de espécies taxonomicamente relacionadas (Turchetto et al., 2017).

A maioria dos trabalhos que utilizaram marcadores moleculares microssatélites foi com o intuito de observar a diversidade genética do gênero *Pseudoplatystoma* em ambientes naturais, possuem ampla utilização em estudos de populações, estimativas do tamanho efetivo de uma população bem como na identificação de híbridos e espécies, sendo observados raros trabalhos que caracterizam animais de piscicultura em programas de melhoramento genético, além de auxiliar para que uma determinada espécie tenha capacidade de adaptação às constantes mudanças ambientais, oportunizando propostas de planos de manejo de conservação e de reintroduções (Abreu et al., 2009, Ferguson et al., 1995, Hartl e Clark, 2010).

Em meados da década de 1980, com o advento da tecnologia do DNA recombinante e o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase – PCR, um método *in vitro* para a amplificação de fragmento de DNA possibilitou o desenvolvimento de técnicas mais eficientes para a caracterização de populações, por meio da detecção do polimorfismo

genético (Abreu, 2013). O princípio da PCR é uma imitação de um processo natural de replicação do DNA “in vivo” antes da divisão celular (Lopera-Barrero, 2007).

Entre as décadas de 1980 e 1990, na evolução dos procedimentos da PCR e sequenciamento de classes de marcadores, desenvolveu-se para examinar e evidenciar de maneira rápida e barata a variação contida na molécula de DNA. Desta forma, os marcadores foram popularizados por acrônimos (siglas) e em seguida acentuou-se a técnica para reproduzir *locus* STR, surgindo diversidade destes *loci* para diferentes espécies de diferentes táxons e taxonomicamente relacionadas. (Rico et al., 1996; Zane et al., 2002). No geral as pesquisas com o gênero *Pseudoplatystoma* que utilizaram marcadores moleculares microssatélites são efetuados com o propósito de avaliar a diversidade genética em ambientes naturais.

Em pesquisa, avaliando duas populações naturais de *Pseudoplatystoma reticulatum*, verificou-se a importância destes marcadores na capacidade de identificar e definir populações biológicas com primordial objetivo de conservação e gestão genéticas de recursos naturais (Abreu et al., 2009). Apesar das vantagens e utilidades que os marcadores SSR apresentam, a grande limitação reside na necessidade do isolamento e desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para cada espécie, ou ter disponível *primers* de espécies relacionadas filogeneticamente para avaliar transferibilidade (Zanella et. al., 2017).

5.0. Utilização de *primers* heterólogos na transferibilidade de locos

A utilização dos marcadores moleculares microssatélites é de baixo custo de sua genotipagem que é baseada na PCR, com posterior separação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes através da eletroforese (Vasemägi et al., 2010). A maior dificuldade no emprego desses marcadores é a presença de artefatos de PCR como as *stutter* band ou “banda fantasma” (Väli et al., 2008) ou alelos nulos, que são limitações (Turchetto et al., 2017), dificultando a interpretação dos resultados, gerando dados não confiáveis sobre a diversidade genética. As *stutter* band resulta do escorregamento da Taq durante a amplificação.

Conforme Turchetto et al. (2017), ISSR é uma técnica baseada em SSR em que a amplificação é realizada com um único *primer* consistindo de várias repetições e as

amplificações transcorrem através de uma técnica em que é possível visualizar em gel de agarose ou poliacrilamida. Este marcador ainda é utilizado na época atual em várias pesquisas, particularmente em estudos sobre diversidade genética. A transferência de marcadores ou *primers* heterólogos auxilia na comparação entre espécies que tenham aproximação taxonômica, permitindo estudos de mecanismos envolvidos em divergência populacional, hibridação e especiação, bem como padrão de diversidade em uma comunidade (Zanella et. al., 2017; Noor e Feder, 2006).

Estudos estão sendo conduzidos, por pesquisadores, utilizando *primers* heterólogos com populações naturais e populações estoques de piscicultura com o objetivo de desenvolverem ferramentas eficazes no monitoramento genético de populações naturais e populações cativas. Nestes casos, os *primers* heterólogos são avaliados em termos de transferibilidade, isto é, se estes microssatélites estão ou não presentes no genoma do organismo que se deseja investigar (Rossini, 2010). A distribuição da transferibilidade entre espécies de *loci* microssatélites é altamente desigual entre os táxons com perspectivas sobre possíveis fontes alternativas de marcadores transferíveis de espécies cruzadas (Barbará et al., 2007).

Habitualmente, o isolamento de novos marcadores microssatélites necessita de tempo, é oneroso, pois demanda de construção de bibliotecas, formação de clones até o desenvolvimento de novos oligonucleotídeos iniciadores (Zane et al., 2002). A conservação evolutiva de regiões de sequência única (não repetitiva) franqueadoras aos microssatélites no genoma proporciona a utilização de *loci* microssatélites isolados de uma espécie filogeneticamente próxima, para amplificar com sucesso o DNA de outras espécies de interesse (Tong et al., 2002; O'Connell e Wright, 1997).

Quando ocorrem amplificações com marcadores isolados em outras espécies, chama-se de amplificações cruzadas ou heterólogas. Neste caso, os *primers* microssatélites isolados de espécies próximas têm maiores chances de amplificação e conseqüentemente apresentam polimorfismo do que as espécies distantes filogeneticamente. Ecologicamente, estes *loci* microssatélites são transferíveis entre espécies e gêneros, permitindo amplificação cruzada de espécies que divergiram a cerca de 470 milhões anos (Primmer et al., 1996; Zane et al., 2002).

O uso de marcadores heterólogos depende do cuidado e da observação do comportamento do marcador em amostra de indivíduos da mesma população, pois a distância evolutiva pode implicar na perda da informação original contida nos sítios de anelamento de iniciadores (*primers*), e potencialmente leva a artefatos que impedem a detecção de um ou mais alelos na população (os chamados alelos nulos) (Wang et al., 2012). Conforme os mesmos autores, uma forma parcial de se resolver esse problema é encontrar marcadores em Equilíbrio de Hardy-Weiberg e estes marcadores inespecíficos necessitam, muitas vezes, de ajuste nas condições de amplificação na PCR, particularmente, no tocante à temperatura de anelamento de oligonucleotídeos iniciadores.

A elaboração de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para cada espécie é um dos grandes impasses da utilização destes marcadores, pela alta demanda de trabalho e altos gastos laboratoriais (Perles et al., 2018). Já Csencsics et al. (2010) afirma que o advento da NGS (Next Generation Sequencing) tornou mais simples a técnica de isolamento de microssatélites, facilitando o desenvolvimento de marcadores mesmo em espécies não modelo diminuindo o tempo com bom custo-benefício.

Quanto mais próxima a relação filogenética entre duas espécies, maior a possibilidade de preservação das sequências e de amplificação cruzada utilizando pares de *primers* hierólogos (Silva, 2008). Para tanto é comprovável que a diferença nos números de *primers* heterólogos com amplificação bem sucedida, em estudos realizados, esteja relacionada com a maior proximidade evolutiva das espécies testadas (Rodrigues, 2014).

Conforme Almeida et al. (2017), embora a confecção de *primers* específicos seja oneroso e aquelas espécies não sequenciadas sejam dificultadas pela inexistência de *primers* específicos, Mia et al. (2005) afirma que é possível em alguns casos a transferência de marcadores microssatélites entre espécies ou gêneros, observando maior transferibilidade de *loci* heterólogos, quanto mais próximo for relacionado. Portanto, procederam estudos com cacharas utilizando de *primers* SSR heterólogos descritos para pintados, *P. corruscans* em cacharas (Abreu et al., 2009; Seerig, 2010, Albuquerque, 2014; Prado, 2014, Almeida et al., 2017;) corroborando com as afirmativas de Mia et al. (2005).

Cada espécie necessita de *primers* específicos e para a espécie *Brycon goulding* não tem disponível, mas vários estudos têm mostrado que pares de *primers* para uma espécie podem ser usados em outras do mesmo gênero, que são conhecidos comumente por

heterólogos e, portanto, estudos objetivaram caracterizar esses *primers* para estudos genéticos dessa espécie (Oliveira et al., 2006; Lopera-Barrero et al, 2016; Castro et al., 2017).

Em estudos realizados por Souza et al., (2018) com a espécie *Brycon gouldingi*, avaliando a transferibilidade de *primers* microssatélites heterólogos, quatro *primers* apresentaram evidências de alelos nulos, o que provavelmente inferiu sobre o desvio de Hardy-Weinberg nos mesmos e sete *primers* foram validados para a amplificação cruzada em *B. gouldingi* e poderão ser utilizados em futuros estudos com essa espécie.

Na conclusão das pesquisas com a espécie o dourado, *Salminus brasiliensis*, Rossini (2010) afirma não ser possível evidenciar uma estruturação genética nas populações durante a época reprodutiva, possibilitando acúmulo de diferentes populações na área amostrada. Portanto, observaram altos índices de variação genética e baixa frequência de alelos privados. Consequentemente, ocorreram desvios significativos no Equilíbrio de Hardy-Weinbergi (EH-W), indicando, um possível efeito de Wahlund.

6.0. Potencial aquícola da cachara, *Pseudoplatystoma reticulam*, melhoramento genético e pesca esportiva

Conforme a EMBRAPA (2015), os peixes do gênero *Pseudoplatystoma*, tanto os inalterados como os híbridos interespecíficos, são preferidos pela qualidade da carne, valor de comercialização, relevante participação na pesca comercial, com potencial o cultivo para o consumo humano, para a pesca esportiva ou mesmo como peixe ornamental de interesse para exportação. Este gênero tem como representante o pintado (*P. corruscans*), o cachara (*P. reticulatum*) e pelo híbrido entre as duas espécies. Com o desenvolvimento de tecnologias para fins de produção de alevinos, o cultivo de cacharas vem expandindo gradualmente (Campos, 2010).

Segundo Ponzetto et al. (2010) e Vaini et al. (2014), aquicultores afirmam que os híbridos são mais produtivos (ganho de peso dos animais), mais dóceis e precoces se comparado com os animais puros (parentais). Mesmo apresentando características zootécnicas apropriadas, a viabilidade econômica na produção dos cacharas depende da

disciplina alimentar dos alevinos ao arraçoamento, durante o dia (Barbosa et al., 2011; Campos, 2010; Ostrensky et al., 2008).

Conforme Resende et al. (2010) a seleção de animais destinados para a reprodução em programas de melhoramento de espécies aquícolas, alguns requisitos deverão ser considerados, de modo que ocorra o acasalamento de indivíduos geneticamente superiores com manutenção da variabilidade genética e níveis de endogamia baixos.

O sucesso da piscicultura está associado ao manejo e manutenção da variabilidade genética em reprodutores, e se obtém por cruzamentos planejados que promovem a melhoria contínua da produtividade (Queiroz et al., 2016). Um programa nacional de melhoramento genético, sob responsabilidade do World Fish Center, foi então estabelecido, para monitorar a variabilidade genética e cruzamento entre e dentro de diferentes estoques de variadas espécies de peixes com abordagem principal em tilápia (GIFT), além de carpas (Ponzoni, 2006).

Pesquisas indicaram que o estoque com menor variabilidade genética ao longo das gerações pode induzir a endogamia, reduzir a adaptabilidade, a sobrevivência das progênes, além de promover perdas do potencial genético entre as populações (Lopera-Barrero et al., 2010; Povh et al., 2008). Portanto se faz necessário o manejo tecnicamente orientado para formação de um plantel com o direcionamento para o acasalamento.

A identificação individual é uma estratégia importante para o estabelecimento de um histórico dos animais utilizados em estudos de melhoramento genético, tanto em processos experimentais quanto de produção em escala comercial. A criação em cativeiro torna imprescindível a utilização de técnicas de marcação e indução à desova, com a obtenção de progênes com bom desempenho que possam ser utilizadas para os programas de melhoramento e consequentes programas de repovoamento (Lopera-Barrero, 2007).

A doutoranda Daniele Albuquerque nos anos de 2013/2014, sob orientação do Professor Dr. Ricardo Ribeiro, do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá – PPZ/UEM deram início ao programa de melhoramento de cacharas. Neste contexto, formaram aproximadamente 73 famílias considerando a avaliação de seleção e animais da geração parental, foram constituídos tanto de pisciculturas da região Centro-Oeste quanto de populações capturadas da natureza. Este trabalho foi realizado em caráter inédito tanto em âmbito nacional quanto mundial, fez-se

um esforço adicional em relação ao número de pessoas altamente qualificadas. O acompanhamento da variabilidade genética e análise de diversidade genética dos animais que formaram o plantel de reprodutores da população inicial foi avaliado por meio de técnicas de biologia molecular. As cacharas, *P. reticulam*, possuem produtividade na região Centro-Oeste e tendência crescente no mercado interno e externo. Para tanto, faz-se necessária a manutenção deste estoque pesqueiro com fins de melhoramento genético para que se proporcionem avanços tecnológicos nesse setor aquícola. Ao analisar duas populações naturais de cacharas, verificaram a importância destes marcadores na capacidade de identificar, definindo populações biológicas com o objetivo fundamental de conservação e gestão genéticas de recursos naturais (Abreu et al., 2009).

Conforme Albuquerque (2014) pode-se realizar seleções direcionadas para a conservação da variabilidade genética de *P. reticulatum* das famílias dos grupos genéticos, tendo como possível estratégia o acasalamento entre indivíduos das populações analisadas. A pesquisadora afirma que os marcadores moleculares microssatélites podem agir na tomada de decisões em monitoramento da variabilidade genética das populações em programas de melhoramento genético, contribuindo na manutenção de níveis baixos de endogamia. Dentre os métodos de seleção a combinação mais simples é a de seleção individual com a seleção de família (Eler, 2017), baseada no peso adequado dos componentes de média de família e de desvios dentro de família. O melhoramento genético de peixes no Brasil se encontra em fase inicial. As pesquisas com espécies nativas, como o tambaqui, *Colossoma macropomum* e a cachara, *P. reticulatum* estão em fase de implantação, juntamente com empresas públicas e privadas (EMBRAPA, 2018).

O primeiro censo aquícola do Brasil, confirma que, entre os estados, Santa Catarina se destaca com 20% dos produtores do País, seguido por Paraná com 16%. Surgem os parques no modelo pesque-pague. As propriedades como o Valle Verde, localizado em Mandirituba (PR), criado em 2004, tinha na tilápia o seu principal produto (PEIXE BR, 2014). As Figura 7 e 8 exibem exemplos pesqueiros na região sul e sudeste do Brasil em época de competição. No Brasil acontecem, em épocas determinadas, campeonatos de pesca esportiva. Existem as etapas classificatórias do Campeonato Brasileiro em Pesqueiros (CBP) e os estados da região sul e sudeste são mais competitivos, organizados e têm participação efetiva.

Na região sudeste a aquicultura se caracteriza pelo cultivo de amplo número de espécies, tanto nativas como exóticas, que são cultivadas em pequenas propriedades, de forma semi-intensiva ou intensiva, servindo tanto para o consumo humano, como também, para a pesca esportiva (pesque e pague). A produção de espécies nativas, como o surubim, o surubim cachara (*P. fasciatum*) e o dourado (*Salminus maxillosus*) estão em alta. Na bacia do rio Piracicaba este tipo de empreendimento foi responsável por um faturamento anual superior a US\$ 70 milhões (Roubach et al., 2003).



Figura 7. Pesqueiro no Estado do Paraná, na cidade de Mandirituba.

Fonte:<https://www.fishtv.com/noticias/geral/arena-do-pesqueiro-valle-verde-esta-aberta-para-os-treinos>.



Figura 8. Pesqueiro no Estado de São Paulo, na cidade de Itu.

Fonte:<https://www.fishtv.com/noticias/fish-tv/arena-do-parque-maeda-esta-pronta-para-receber-o-campeonato-paulista>.

Conforme Brabo et al. (2016b), analisando a cadeia produtiva da aquicultura do nordeste paraense, constatou-se que a comercialização do produto ocorre ao longo do ano nas propriedades para o consumidor final e outros adotam o pesque-pague como uma estratégia para escoamento da produção. O pintado ou cachandiá (*P.reticulatum* x *L. marmoratus*) é uma das espécies preferidas e com valor agregado variando de R\$ 15,00 a R\$ 20,00/kg com peso entre 1,5 e 2,0 kg. A venda é rotulada como direta quando o produtor comercializa o peixe sem intermediários ao consumidor final ou a um cliente corporativo que pode ter o produto como fonte de renda a partir de um pesque-pague, por exemplo (SEBRAE, 2020).

A Pesca Esportiva é considerada, nas Cadeias Produtivas, um dos setores da pesca e estudos sobre biologia e dinâmica populacional das principais espécies, seus efeitos sobre a fauna acompanhante tem sido objeto de projetos no sentido de evitar impactos em ecossistemas de águas continentais, subsidiando a formulação de políticas públicas para o financiamento da pesquisa neste setor (EMBRAPA, 2012b).

Comparando a visão de diversos autores, suas propostas, assim como a problemática nas pesquisas, o presente estudo teve por objetivo avaliar a variabilidade genética de uma população de cachara mediante *primers* heterólogos desenvolvidos para *Brachyplatystoma rousseauxi*, *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma punctifer*.

REFERÊNCIAS

- Abreu M. M., Diversidade genética de populações naturais de *Brycon falcatus* (Muller e Troschel, 1844) nas bacias dos rios Araguaia e Guaporé, Mato Grosso, Brasil. 2013. 49f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Abreu, M. M.; Pereira, L.H.; Vila, V.B.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2009. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguai River Basin. *Genetic and Molecular Biology*, v. 32, p. 868-873.
- Albert, J. S.; Reis, R. E. 2011. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. University of California Press. 308 p.
- Albuquerque, D. M. Variabilidade genética de *Pseudoplatystoma reticulatum* do Programa de Melhoramento Genético. 2014, 52 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR.
- Almeida, M. da S.; Castro, P. L. de; Leite, N. G.; Lewandowski, V.; Casetta, J.; Celestino, L. S.; Goes, E. R.; Ribeiro, R. P. 2017. Amplificação cruzada de marcadores moleculares microssatélites para *Pseudoplatystoma reticulatum*. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Zootecnia, 2017, Santos. Anais eletrônicos...* Campinas: Galoá, 2018. Disponível em: <<https://proceedings.science/zootec/papers/amplificacao-cruzada-de-marcadores-moleculares-microssatelites>>.
- Almeida-Filho, R. L.; Honorato, C. A.; Almeida, L. C. de; Ushizima, T. T.; Santamaria, F. M. Nutrição de Surubim (*Pseudoplatystoma* sp.) 2012. Desafio para Aquicultura. Artigo 178 - Volume 9 - Número 05 – p. 1995-2010. *Revista Eletrônica Nutritime*. ISSN 1983-9006.
- ANA/GEF/PNUMA/OEA. Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado de Bacia Hidrográfica para o Pantanal e Bacia do Alto Paraguai ANA/GEF/PNUMA/OEA: Programa de Ações Estratégicas para o Gerenciamento Integrado do Pantanal e Bacia do Alto Paraguai: Relatório Final/Agência Nacional de Águas – ANA ... [et al.]. – Brasília: TDA Desenho & Arte Ltda., 2004. 316p. : il. ISBN 85-98276-03-0.
- Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2014, 1º. Carlson, V.. (Coord.). Associação Cultural E Educacional Brasil - ACEB, São Paulo - SP, 136p.
- Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2019. Medeiros. F. (Coord.). Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR), São Paulo - SP, 148p.
- Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR 2020. Medeiros. F. (Coord.). Associação Brasileira da Piscicultura (PEIXE BR), São Paulo - SP, 135p.
- Aragão, D. G.; Barros, M. C.; Fraga, E. C. Caracterização genética de *Pseudoplatystoma* cf. *punctifer* de bacias da região nordeste, Brasil baseado em sequências do DNA mitocondrial. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008, Salvador-BA. Anais... Salvador, BA. v 1.
- Barbará, T.; Palma-Pilva, C.; Paggi, G. M.; Bered, F.; Fay, M. F.; Lexer, C. 2007. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology*, v. 16, p. 3759-3767.
- Barbosa, O.N.; Raizer, J.; Gonda, M.F. et al. 2011. Desempenho e coeficiente intestinal de alevinos puros e híbridos de pintados em condicionamento alimentar. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 40, n. 12, p.2621-2627.
- Barletta, M.; Jaureguizar, A. J.; Baigun, C.; Fontoura, N. F.; Agostinho, A. A.; Almeida-Val, V. M. F.; Val, A. L.; Torres, R. A.; Jimenes-Segura, L. F.; Giarrizzo, T.; Fabré, N.

- N.; Batista, V. S.; Lasso, C.; Taphorn, D. C.; Costa, M. F.; Chaves, P. T.; Vieira, J. P. & Corrêa, M. F. M. 2010. Fish and aquatic habitat conservation in South America: a continental overview with emphasis on neotropical systems. *Journal of Fish Biology*, 76: 2118-2176.
- Barthem, R. B.; Goulding, M. 1997a. Os bagres balizadores. *Ecologia, migração e conservação de peixes amazônicos*. Brasília: SCM; CNPq/MCT; Ipaam. 129 p. (Série Estudos do Mamirauá, v. 3).
- Barthem, R. B.; Goulding, M. 1997b. *The Catfish Connection: Ecology, Migration, and Conservation of Amazon Predators*. New York: Columbia University. 61 p. ISBN 0-231-10832-X(cloth).
- Bartley, D. M.; Nguyen, T. T. T.; Halwart, M.; Silva, S. S. 2009. Use and exchange of aquatic genetic in aquaculture: information relevant to access and benefit sharing. *Reviews in Aquaculture*, v.1, p. 157-162.
- Benites, C. Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná- Paraguai, por marcadores moleculares tipo microsatélite. 2008. 90 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Centro de aquicultura da UNESP, Jaboticabal.
- Bignotto, T. S.; Prioli, A. J.; Prioli, S. M. A. P.; Maniglia, T. C.; Boni, T. A.; Lucio, L. C.; Gomes, V. N.; Prioli, R. A.; Oliveira, A.V.; Júlio-Junior, H. F.; Prioli, L. M. 2009. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River. 2009. *Brazilian Journal of Biology*, v. 69, n. 2, p. 681-689. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-69842009000300022>.
- Boehlert, G. W. 1996. Biodiversity and marine fisheries the sustainability of marine fisheries. *Oceanography*, v.9, p. 28-35.
- Brabo, M. F. 2014. Piscicultura no Estado do Pará: situação atual e perspectivas. *Acta Fish*, (2)1: 1-7.
- Brabo, M. F.; Pereira, L. F. S.; Santana, J. V. M.; Daniel, D. A. V. C.; Veras, G. C. 2016. Cenário atual da produção de pescado no mundo, no Brasil e no estado do Pará: ênfase na aquicultura. *Acta Fish*. 4 (2): 50-58. ISSN: 2357-8068.
- Brabo, M. F.; Pereira, L. F. S.; Ferreira, L. D. de A.; Costa, J. W. P.; Campelo, D. A. V.; Veras, G. C. 2016. A cadeia produtiva da aquicultura no nordeste paraense, Amazônia, *Informações Econômicas*, SP, v. 46, n. 4, jul./ago. 2016. ISSN: 2357-8068.
- BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. Boletim Estatístico da Pesca e Aquicultura 2011. Brasília: MPA. 2013. 60p.
- Buitrago-Suárez, U. A.; Burr, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*, v. 1512, p. 1 – 38, 2007.
- Burgess, W.E. 1989. *An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes: a Preliminary Survey of the Siluriformes*. T. F. H. Publications, Neptune City. 784 pp.
- Campos, J. L. 2010. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: Bernardo Baldisserotto e Levy de Carvalho Gomes (Orgs.). *Espécies nativas para piscicultura no Brasil*. Santa Maria: Ed. Da UFSM, p.335- 361.
- Carvalho, D. C. de; Andrade, D. A. O. de; Sousa, A. B. de; Teixeira, E. A.; Seering, A. S.; Faria, P. M. C.; Ribeiro, L. P. 2007. Diversidade genética de surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*), cachara (*P. fasciatum*) e do seu híbrido interespecífico.

- In: Anais do Congresso Brasileiro de produção de Peixes Nativos de Água doce, 1., 2007, Dourados, MS. Anais... Dourados-MS: Congresso Brasileiro de produção de Peixes Nativos de Água doce.
- Carvalho-Costa, L. F.; Piorski, N. M.; Willis, S. C.; Galetti, P. M. Jr.; Ortí, G. 2011. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma*, Bleeker 1862, based on nuclear and mtDNA markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 59, 177-194. doi:10.1016/j.ympev.2011.02.005
- Castro, P. L. Contribuição genética e reprodutiva de Piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) submetidos aos sistemas de reprodução seminatural e extrusão. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- Castro, P. L.; Ribeiro, R. P.; Santos, S. C. A. dos; Góes, E. S. dos R.; Souza, F. P. de; Poveda-Parra, A. R.; Vargas, L.; Urrea-Rojas, A. M.; Lopera-Barrero, N. M. 2017. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 47, e20170374. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20170374>.
- Crepaldi, D. V.; Faria, P. M. C.; Teixeira, E. de A.; Ribeiro, L. P.; Costa, A. A. P.; Melo, D. C. de; Cintra, A. P. R.; Prado, S. de A.; Costa, F. A. A.; Drumond, M. L.; Lopes, V. E.; Moraes, V. E. de. 2006. O surubim na aquicultura do Brasil. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.150-158, jul./dez.. Disponível em www.cbra.org.br.
- Eigenmann, C. H. and R. S. Eigenmann, 1889. Notes from the San Diego Biological Laboratory. The fishes of Cortez Banks. *West. Amer. Sci.* 6:123-132.
- Csencsics, D.; Brodbeck, S.; Holderegger, R. 2010. Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered dwarf bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *J. Heredity*. 101: 789–93.
- Dewoody, J. A.; Avise, J. C. 2000. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, v. 56, p. 461-473.
- Eler, J. P. Teorias e métodos em melhoramento genético animal: Sistemas de Acasalamento. 2017. 2ª Edição. Pirassununga: Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. 177 p.
- EMBRAPA. Genética na Piscicultura: Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. Brasília, DF: Embrapa, 2012, 32 p. (Cartilha / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISBN 978-85-7035-120-3)
- EMBRAPA. Relatório técnico do Seminário Nacional de Prospecção de Demandas da Cadeia Produtiva da Pesca: PROSPESQUE / autores, Adriana Lima ... [et al.]. Brasília, DF: Embrapa, 2012, 88 p. (Cartilha / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISBN 978-85-7035-107-4).
- EMBRAPA. Programas de melhoramento genético na piscicultura / autores, Silva, G. F. da; Shiotsuki, L.; Teixeira, R. de A.; Dias, L.T.; Vasques, L.C.; Freitas, L. E.L. de; Kirschnik, L.N.G.; Varela, E.S. Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2018. 58 p. (Documentos / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2318-1400; 37). CDD 664.942.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2018. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture - Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-5-130562-1
- FAO no Brasil, 2018 - Consumo de pescado na América Latina e no Caribe crescerá 33% até 2030. <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1144781/>.

- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief - Sustainability in action. Rome, Italy.. ISBN: 978-92-5-132773-9.
- Ferreira, E. J .G.; Zuanon, J. A. S.; Santos, G.M. Peixes comerciais do médio Amazonas: região de Santarém, Pará. IBAMA. Coleção meio Ambiente. Serie Estudos Pesca, (18), 1998, 214 p.
- Ferguson, A.; Taggart, J. B.; Prodhon, A.; Mcmeel, O.; Thompson, C.; Stone, C.; McGinnity, P.; Hynes, R. A. 1995. The application of molecular markers to the study and conservation of fish population with special reference to *Salmo*. Journal of Fish Biology, v.47, p.103-126. DOI: 10.1111/j.1095-8649.1995.tb06048.x.
- Hamoy, I.; Araripe, J.; Guerreiro, S.; Santos, S. 2018. Genética Molecular Aplicada à Conservação de Peixes Amazônicos. p. 275-293. In: Ecossistemas Aquáticos: tópicos especiais / Raimundo Aderson Lobão de Souza, Organizador, Willian Leslie Overal, Revisor Técnico. - Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 314 p.: il. ISBN: 978-85-7295-130-2. 275-293
- Hartl, D. A; Clark, A. G. 2010. Princípios de Genética de Populações. Editora Artmed, 542p.
- Hidrografia. Um continente de água: Programa Marco para a Gestão Sustentável dos Recursos Hídricos da Bacia do Prata, Considerando os efeitos decorrentes da variabilidade e Mudanças Climáticas, 2019. (<https://projetoscic.org/a-bacia-do-prata/hidrografia>).
- Honorato, C. A.; Ushizima, T. T.; Santamaria, F. M.; Flores-Quintana, C. I.; Marcondes, V. M.; Nascimento, C. A. 2015. Desempenho produtivo e econômica de surubins (*Pseudoplatystoma* sp.) alimentados com níveis de proteína e estocados em tanque-rede. Arq. Bras. Med. Vet. Zootec., v. 67, n.5, p.1408-1414.
- Lauder, G. V.; Liem, K. F. 1983. The evolution and interrelationships of the Actinopterygian fishes. Bulletin of the Museum of comparative Zoology, v. 150, n. 3, p. 95-197. In: Bulletin of the Museum of Comparative Zoology at Harvard College. Cambridge, Mass. : The Museum. ISSN 0027-4100.
- Lopera-Barrero, N. M.; Tanamati, F.; Rodriguez-Rodriguez, M. del, P.; Povh, J. P.; Poveda-Parra, A. R. ; Otone, R. A. A.; Castro, P. L.; Goes, E. S. dos R.; Furlan, P. J.; Ribeiro, R. P. 2016a. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in *Rhamdia quelen* and *Leporinus elongatus*. Semina: Ciências Agrárias, v.37, p.517-524.
- Lopera Barrero N.M. (2007). Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. 2007. 92f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá.
- Lopera-Barrero, N. M.; Ribeiro, R. P.; Povh, J. A.; Vargas, L.; Fornari, D. C.; Sirol, R. N.; Rodríguez Rodríguez, M. del P. 2010. Diversidad genética de *Brycon orbignyanus* en el sistema reproductivo semi-natural, utilizando o marcador RAPD. Zootecnia Tropical, Maracay, v. 28, n. 1, p. 73-82.
- Lundberg, J. G. ; M. W. Littmann. 2003. Family Pimelodidae (Longwhiskered catfishes). pp. 432-446. In: Reis, E. R.; S. O. Kullander & C. Ferraris Jr (Eds.). 2003. Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre, Edipucrs. 729p.
- Mia, M. Y.; Taggart, J. B.; Gilmour, A. E.; Gheyas, A. A.; Das, T. K.; Kohinoor, A. H. M.; Rahman, M. A.; Sattar, M. A.; Hussain, M. G.; M. Mazid, M. A.; David J.

- Penman, D. J.; McAndrew, B. J. 2005. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture* v. 247, p. 267–273.
- Noor, M. A. F.; Feder J. L. 2006. Speciation genetics: evolving approaches. *Nature Reviews Genetics*, v. 7, p. 851–861.
- O’Connell, M.; Wright, M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. *Rev. Fish Biol. Fish.*, v. 7, p. 331-363.
- Oliveira, E. J.; Pádua, J. G.; Zucchi, M. I.; Vencovsky, R.; Vieira, M. L. C. 2006. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, n. 2, p. 294-307.
- Ostrensky, A.; Borghetti, J.R.; Soto, D. 2008. *Aquicultura no Brasil. O desafio é crescer.* Secretaria Especial de Aquicultura e Pesca/FAO, Brasília, DF, 2008. 276 p.
- Perles, L.; Figueiredo, M. G. de.; Duarte, J. M. B. 2018. Transferabilidade de iniciadores de regiões microssatélites produzidos em veado catigueiro (*Mazama gouazoubira*) para uso em estudos genéticos com cervos-dopantanal (*Blastocerus dichotomus*). *Braz. J. Anim. Environ. Res.*, Curitiba, v. 1, n. 2, p. 320-328. ISSN 2595-573X.
- Ponzetto, J.M.; Porto-Foresti, F.; Senhorini, J.A.; Rocha, R.C.G.A.; Polaz, C.N.M. 2010. Reprodução induzida de híbridos de siluriformes em cativeiro: potencialidades e ameaças na conservação de espécies nativas. In: Maúba: congresso de Iniciação Científica da UNSP, 22., 2010, Marília. Anais... Marília: Universidade Estadual Paulista, 2010. 1 CD-ROM
- Ponzoni, R. W. 2006. Genetic improvement and effective dissemination: Keys to prosperous and sustainable aquaculture industries. p. 1-7. In: Development of aquatic animal genetic improvement and dissemination programs: current status and action plans. Ponzoni, R. W.; Acosta B. O. and Ponniah, A. G. (Eds). WorldFish Center Conference Proceedings, Penang, Malaysia. 73, 120p.
- Povh, J. A.; Ribeiro, R. P.; Sirol, R. N.; Streit Júnior, D. P.; Lopera-Barrero, N. M.; Vargas, L.; Gomes, P. C.; Lopes, T. S. 2008. Diversidade genética de pacu do rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 43, n. 2, p. 201-206.
- Primmer, R.; Muller, P.; Ellegren, H. A. 1996. A wide-range survey of cross-species microsatellite amplification in birds. *Mol. Ecol.* 5: 365-378.
- Queiroz, C. A. de, Sousa, N. R.; Silva, G. F, da, Inoue, L. A. K. A. 2016. Impacts of stocking on the genetic diversity of *Colossoma macropomum* in central Amazon, Brazil. *Genetics and Molecular Research* 15(2). DOI <http://dx.doi.org/10.4238/gmr.15027700>
- Regitano, L. C. A.; Coutinho, L. L. 2001. *Biologia molecular aplicada à produção animal.* Brasília, DF: EMBRAPA. 213p.
- Resende, E. K.; Oliveira, C. A. L.; Legat, A. P.; Ribeiro, R. P. 2010. Melhoramento animal no Brasil: uma visão crítica: espécies aquáticas. In: Simpósio Brasileiro De Melhoramento Animal, 8., 2010., Maringá. Anais... Maringá: UEM, 2010. 1 CD-ROM.
- Ribeiro, R.P.; Lopera-Barrero, N.M.; Povh, J.A.; Rodriguez-Rodriguez, M. del P.; Fornari, D.C.; Baumgartner, G.; Baumgartner, D.; Souza, F.P. de; Castro, P.L. de; Poveda-Parra, A. R. Genetic diversity of *Salminus brasiliensis* wild populations in downstream and upstream Cachoeira Branca, Verde River MS Brazil: a preliminary view. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 37, n. 1, p. 507-516, jan./fev. 2016. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n1p507.

- Rico, C.; Rico, I.; Hewitt, G. 1996. 470 million years conservation of microsatellites loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 263, p. 549-557, 1996. <https://doi.org/10.1098/rspb.1996.0083>.
- Rodrigues, A. dos S. Análise genética da piaba-faço *Legnobrycon myersi* (Osteichthyes, Characiformes), espécie ameaçada do Estado da Bahia. 2014. 92p. Dissertação (Mestrado em Genética, Biodiversidade e Conservação) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié.
- Rossini, B. C. Caracterização da estrutura genética de populações residentes emigradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do Rio Mogi-Guaçu, 2010. 121p. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.
- Rotta, M. A. 2003. Ictiômetro para biometria de surubins (pintado e cachara). Corumba: Embrapa Pantanal; Mato Grosso do Sul; Comunicado Técnico, 28. 4p. ISSN 1517-4875 F.
- Roubach, R.; Correia, E. S.; Zaiden, S.; Martinho, R. C.; Cavalli, R. O. 2003. Aquicultura Brasileira. Panorama da Aquicultura, v. 34, n. 1. ISSN 1519-1141.
- Saath, K. C. de O.; Fachinello, A. L. 2018. Crescimento da demanda mundial de alimentos e restrições do fator terra no Brasil. *Rev. Econ. Sociol. Rural*, Piracicaba-SP, Vol. 56, Nº 02, p. 195-212, <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>.
- Sato Y, Godinho H. P. 2003. Migratory fishes of the São Francisco River. p.197-228. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B. ; Ross, C.; Baer, A. Ed. *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. Ottawa, International Development Research Centre/World Bank.
- Schulter, E. P.; Vieira Filho, J. E. R. 2017. Evolução da piscicultura no brasil: diagnóstico e desenvolvimento da cadeia produtiva de tilápia. Texto para discussão / Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada.- Brasília : Rio de Janeiro: Ipea, 2017.- ISSN 1415-4765
- Souza. F. P. de; Lima, E. C. S. de; Leite, N. G.; Urrea-Rojas, A. M.; Yamachita, A. L.; Pandolfi, V. C. F.; Lopera-Barrero, N. M. 2018. Transferability of heterologous microsatellite primers in *Brycon gouldingi*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.48:11, <https://doi.org/10.1590/1234-56781806-94790560201>.
- Segatto, A. L. A.; Goetze, M. G.; Caroline Turchetto, C. 2017. Marcadores moleculares baseados na análise de sequências: utilização em filogenia e filogeografia. In: *Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações* / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.
- SEMA – Secretaria de Estado de Meio Ambiente. 2010. 74 p. Relatório de Monitoramento da Qualidade da Água da Região Hidrográfica Tocantins-Araguaia – 2007 a 2009. Organizado por Araújo, Adélia Alves de; Figueiredo, Sérgio Batista; Almeida, Adari Rogério de - Cuiabá: SEMA/MT; SMIA. CDU 556.(817.2).
- Silva, A. P.; Lima, A. F.; Lundstedt, L. M. 2015. 42p. A pesca e a aquicultura de surubins no Brasil: Panorama e considerações para a sustentabilidade. Palmas, TO : Embrapa Pesca e Aquicultura (Documentos/Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2318-1400 ; 21).
- Silva, T. de O. Amplificação cruzada de locos de microsatélites em crustacea decapoda. 2008. 49p. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Animal) – Universidade Federal de Santa Maria-RS, Centro de Clínicas Naturais e Exatas, Santa Maria-RS.

- Tavares, M. P. O surubim. In: Miranda, M. O. T. (Org.). Surubim. Belo Horizonte: IBAMA, 1997. p. 9-25. (IBAMA. Coleção meio ambiente; Série estudos pesca 19).
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.*, v. 17, p. 6463-6471.
- Tong, J.; Wang, Z.; Yu, X.; Wu, Q.; Chu, K. 2002. Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite primers of common carp. *Mol. Ecol. Notes*, v. 2, p. 245-247.
- Tong, J.; Yu, X.; Liao, X. J. 2005. Characterization of a highly conserved microsatellite marker with utility potentials in cyprinid fishes. *Appl. Ichthyol.*, v. 21, p. 232-235.
- Turchetto, C., Turchetto-Zolet, A. C., M., Passaia, G., Zanella, C. 2017. Marcadores genéticos baseados em DNA, In: Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.
- Turchetto-Zolet, A. C.; Turchetto, C.; Zanella, C.M.; Passaia, G. 2017. Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.
- Vaini, J.O.; Grisolia, A.B.; Prado, F.D.; Porto-Foresti, F. 2014. Genetic identification of interspecific hybrid of Neotropical catfish species (*Pseudoplatystoma corruscans* vs *Pseudoplatystoma reticulatum*) in rivers of Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, v.12, p.635-641.
- Väli, U.; Einarsson, A.; Waits, L.; Ellegren, H. 2008. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*, 17 (17), 3808–3817. 2008. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03876.
- Vasemägi, A.; Riho Gross, R.; Palm, D.; Paaver, T.; Primmer, C. R. 2010. Discovery and application of insertion-deletion (INDEL) polymorphisms for QTL mapping of early life-history traits in Atlantic salmon. *BMC Genomics*, v. 11, n. 156, p. 1-11. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/156>.
- Wang, C.; Schroeder, K. B.; Rosenberg, N. 2012. A maximum likelihood method to correct for allelic dropout in microsatellite data with no replicate genotypes. *Genetics*, v. 192, p. 651-669.
- Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, p. 1-16.
- Zanella, C. M.; Turchetto, C.; Palma-Silva, C.; Sperb-Ludwig, F. 2017. Microsatélites: Metodologias de identificação e análise. In: Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.

Sítios:

<http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/pt/c/1144781/> (acessado em 05 de setembro de 2019).

https://pt.wikipedia.org/wiki/Rio_Paraguai (acessado em 05 de setembro de 2019).

<https://projetoscic.org/a-bacia-do-prata/hidrografia> (acessado em 05 de setembro de 2019).

<https://www.fishbase.in/photos/ThumbnailsSummary.php?Genus=Pseudoplatystoma&Species=reticulatum> (acessado em 05 de setembro de 2019).

<https://sidra.ibge.gov.br/Tabela/3940> (acessado em 14 de julho de 2020).

<https://www.fishtv.com/noticias/geral/arena-do-pesqueiro-valle-verde-esta-aberta-para-os-treinos> (acessado em 22 de julho de 2020).

<https://www.fishtv.com/noticias/fish-tv/arena-do-parque-maeda-esta-pronta-para-receber-o-campeonato-paulista> (acessado em 22 de julho de 2020).

<https://m.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/artigosOrganizacao/saiba-comofunciona-comercio-de-peixes-no-brasil,8bc238e243312510VgnVCM1000004c00210aRCRD> (acessado em 23 de julho de 2020).

III – OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a transferibilidade de *primers* heterólogos SSR de espécies dos grupos *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* na cachara (*P. reticulam*), um peixe de importância ambiental e comercial com grande potencial para produção em pisciculturas.

IV. TRANSFERIBILIDADE DE *PRIMERS* HETERÓLOGOS SSR DE ESPÉCIES DOS GRUPOS *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* NA CAHARA (*P. reticulatum*) (Eigenmann & Eigenmann, 1889).

(Semina – Ciências Agrárias)

Resumo

Existem espécies de peixes nativas no Brasil que são potencialmente viáveis economicamente para o cultivo, porém seus estoques naturais estão sofrendo redução em decorrência da pesca predatória e degradação dos ecossistemas. Para diminuir este impacto, estudos têm sido intensificados para obtenção de ferramentas capazes de contribuir para a preservação desses recursos genéticos. Os marcadores microssatélites (SSR's) são referência no monitoramento genético, mas quando se trabalha com espécies que não têm genoma sequenciado se faz necessário a utilização de *primers* não específicos ou heterólogos. Apesar de já ter sido desenvolvido *primers* microssatélites para a espécie *Pseudoplatystoma reticulam*, objetivou-se através do presente estudo avaliar a transferibilidade de *primers* heterólogos SSR de espécies dos grupos *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* na cachara (*P. reticulam*). Foram analisadas amostras de nadadeira caudal de 222 indivíduos da espécie em estudo. Do conjunto de 11 *primers* microssatélites testados, 03 não apresentaram resultados satisfatórios de transferibilidade (apresentou monomorfismo ou não exibiu fragmentos). A extração de DNA de nadadeira caudal de cada indivíduo foi realizada utilizando o protocolo com NaCl, e a integridade do DNA extraído foi checada em gel de agarose 1%. Os *primers* heterólogos produziram o total de 97 alelos, com variação de 142pb a 400pb e o número por *locus* variou entre dois (BR47) a dezesseis (BR51 e PPU09) com média de 12,250. A média do número efetivo de alelos (N_e) e riqueza alélica (R_a) foram 8,177 e 12,053, respectivamente. Os valores médios esperados de heteroziguidade (H_e) foram superiores aos observados (H_o), e resultou em déficit heterozigótico, conforme demonstrado pelo coeficiente de endogamia (F_{IS}) que apresentou valores positivos ($> 0,00$) e os desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW)

foram significativos ($<0,05$). O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) variou entre 0,343 (BR47) e 0,919 (PPU09). Por fim, oito *primers* foram validados para a amplificação cruzada de *P. reticulam*, podendo ser utilizados em futuros estudos com a espécie em questão e até mesmo outras da mesma família ou ordem que não possuam iniciadores moleculares validados.

Palavras-chave: Cachara, Caracterização, Heterólogos, *Primers*, Transferibilidade.

TRANSFERABILITY OF HETEROLOGOUS SSR *PRIMERS* FROM GROUPS OF *Brachyplatystoma* and *Pseudoplatystoma* SPECIES IN THE CACHARA (*P. reticulam*).

(Eigenmann & Eigenmann, 1889).

Abstract

There are native fish species in Brazil that are potentially economically viable for cultivation, but their natural stocks are being reduced due to predatory fishing and ecosystem degradation. To reduce this impact, studies have been intensified to obtain tools capable of contributing to the preservation of these genetic resources. Microsatellite markers (SSR's) are a reference in genetic monitoring, but when working with species that do not have a sequenced genome, it is necessary to use non-specific or heterologous primers. Although microsatellite primers for the species *Pseudoplatystoma reticulam* have already been developed, the objective of this study was to evaluate the transferability of heterologous SSR *primers* from groups of *Brachyplatystoma* and *Pseudoplatystoma* species in the cachara (*P. reticulam*). Caudal fin samples from 222 individuals of the species under study were analyzed. From the set of 11 microsatellite primers tested, 03 did not present satisfactory transferability results (showed monomorphism or did not exhibit fragments). The caudal fin DNA extraction from each individual was performed using the NaCl protocol and the extracted DNA integrity was checked on 1% agarose gel. The heterologous primers produced a total of 97 alleles, ranging from 142bp to 400bp and the number per locus ranged from two (BR47) to sixteen (BR51 and PPU09) with an average of 12,250. The average effective number of alleles (N_e) and allelic richness (R_a) were 8.177 and 12.053, respectively. The expected average values of heterozygosity (H_e) were higher than those observed (H_o), which resulted in a heterozygous deficit, as shown by the inbreeding coefficient (F_{IS}) which presented positive values (> 0.00) and the Hardy-Weinberg (HW) equilibrium deviations were significant (< 0.05). Polymorphic Information Content (PIC) ranged from 0.343 (BR47) to 0.919 (PPU09). Finally, eight primers were validated for cross-amplification of *P. reticulam* and may be used in future studies with the

species in question and even with others of the same family or order that do not have validated molecular primers.

Key words: Cachara, Characterization. Heterologues. *Primers*. Transferability.

Introdução

Conforme a Associação Brasileira da Piscicultura (Peixe BR), a produção brasileira de peixes para o consumo humano atingiu 758.006 toneladas em 2019, com crescimento de 4,9% sobre o ano anterior (722.560 t) e os peixes nativos enfrentaram muitas dificuldades com a produção permanecendo estável, aumentando apenas 20 toneladas, atingindo 287.930 t (38%) (PEIXE BR, 2020). CARLSON (2014) relata que a piscicultura vem revelando grande crescimento, oferecendo proteína animal de alta qualidade e baixo custo.

A cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum* é um peixe originário dos rios Paraná e Amazonas, apresenta características econômicas e zootécnicas desejáveis como: alta taxa de crescimento e boa conversão alimentar, possui carne de excelente qualidade, tem, sabor suave e ausência de espinhos no músculo (CREPALDI et al., 2006; EMBRAPA, 2009). EMBRAPA (2015). Buitrago–Suárez e Burr (2007) analisaram espécimes do gênero *Pseudoplatystoma* com base na forma do corpo, padrão de coloração, anatomia do esqueleto além do número de vértebras, sendo quatro espécies encontradas no Brasil, *P. tigrinum* e *P. punctifer*, no rio Amazonas, *P. reticulatum*, no rio Paraná e *P. corruscans* nos rios Paraná e São Francisco (DANTAS, 2010).

O advento da técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), na década de 1980, provocou verdadeira revolução nos estudos genéticos, tornando possível a análise de um grande número de amostras de maneira mais rápida e prática. Entre os marcadores baseados em PCR, podendo citar, por exemplo: RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), ISSR (Inter-simple sequence repeats), SSR (Simple Sequence Repeats), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism). (ALMEIDA et al., 2017; TURCHETTO et al., 2017). Dessa forma, inúmeros marcadores de análise do DNA baseados na PCR foram desenvolvidos para avaliar a genética de um animal, de uma população ou de uma comunidade (LOPERA-BARRERO, 2007). São classificados de codominantes, possui a

capacidade de identificar indivíduos heterozigotos, realizar análise de paternidade, são multialélicos formados por séries de sequências curtas de DNA repetidas em fila (SEGATTO, 2017; TURCHETTO et al., 2017; HAMOY, 2018).

Uma importante vantagem na utilização dos microssatélites é o baixo custo de sua genotipagem e com posterior separação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes através da eletroforese (VASEMÄGI et al., 2010). A maior dificuldade no emprego desses marcadores é a presença de artefatos de PCR como as *stutter* band ou “banda fantasma” (VÄLI et al., 2008) ou alelos nulos, que são limitações (TURCHETTO et al., 2017), dificultando a interpretação dos resultados, gerando dados não confiáveis sobre a diversidade genética. As *stutter* band resulta do escorregamento da Taq durante a amplificação.

O desenvolvimento de iniciadores espécie-específicos para a amplificação de alelos tornou-se caro e demorado, mas a popularização de novas tecnologias de sequenciamento após 2010, facilitou a geração de grande número de sequências com tempo e custo reduzidos (ABDUL-MUNEER, 2014; SEGATTO, 2017). A conservação de regiões flanqueadoras de sequências de microssatélites entre espécies intimamente relacionadas tem sido relatada por vários pesquisadores (ABDUL-MUNNER et al., 2011; SUDHEER et al., 2011; YASODHA et al., 2005; KIM et al., 2004).

Desta forma, surgem duas soluções para o problema acima: a elaboração de *primers* microssatélites específicos para a espécie em estudo ou a busca de *primers* entre outras espécies relacionadas (*primers* SSR heterólogos). Em estudos com o gênero *Pseudoplatystoma* sp., alguns estudos foram bem-sucedidos na busca e transferência de *primers* entre espécies (ABREU et al., 2009; SEERIG, 2010; ALBUQUERQUE, 2014; ALMEIDA et al. 2017), obtendo sucesso na amplificação cruzada em *P. reticulatum*.

Devido ao número reduzido de pesquisas sobre a espécie em questão, apesar de já ter sido desenvolvido *primers* específicos para a cachara (PRADO et al., 2014), existem poucas informações sobre o uso de transferibilidade de *primers* heterólogos entre a espécie *P. reticulatum* e outras espécies relacionadas. Diante dessas circunstâncias, objetivou-se avaliar a transferibilidade de *primers* heterólogos SSR de *Brachyplatystoma rousseauxi*, *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma punctifer* na cachara (*P. reticulatum*).

Materiais e Métodos

As amostras foram obtidas de estoque comercial de cacharas da região de Coxipó do Ouro – Cuiabá/MT, Piscicultura Bom Futuro, Unidade Coxipó da Ponte, sob as Coordenadas Geográficas: 15°27'34.14"S e 55°59'10.43"O. Cortaram-se amostras de barbatanas caudais de 222 espécimes de *P. reticulatum* a partir de um estoque de reprodutores.

Fragmentos de nadadeira caudal foram coletados, armazenadas em microcubos de 1,5 ml contendo álcool 95% e transportadas, via terrestre, para a Universidade Estadual de Maringá - UEM. Em seguida, foram lavadas, acrescentado álcool etílico 70% e estocado em freezer a -20°C até o processamento. As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisas (PeixeGen) localizado no Departamento de Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá.

Foi utilizada a metodologia descrita por LOPERA-BARRERO et al. (2008) para extração de DNA. Os fragmentos de nadadeira (0,5cm²) foram conservados em microcubos de 1,5 ml. Adicionou-se 550 µL de tampão lise (50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS) e 10 µL de proteinase K (200 µg mL⁻¹). Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 50°C por 12 h. O DNA foi precipitado com 600 µL de solução de NaCl (5M) e centrifugado por 10 min a 12.000 rpm. O sobrenadante com DNA foi transferido para novos microcubos, precipitados com 700 µL de álcool etílico absoluto e incubado por 1 h a -20°C. Depois de centrifugado, o DNA foi lavado com 700 µL de álcool etílico 70%, ressuspenso em tampão TE – 10 mM Tris pH 8,0 e 1 mM EDTA (80 µL para a nadadeira), sequencialmente tratado com 7 µL de RNase (30 µg mL⁻¹) em banho-maria a 37°C por 1 h e estocado em freezer a -20°C.

A quantificação do DNA foi realizada no espectrofotômetro Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) (amplitude de onda 260 nm) e, as amostras foram diluídas para concentração de 10 ng/µL. A integridade do DNA foi verificada em eletroforese horizontal usando gel de agarose 1% a 70 V durante 120 min, utilizando o DNA ladder de 100 pares de base (pb) DNA ladder (Invitrogen). A captura da imagem foi obtida por meio do sistema fotográfico L-PIX (LOCCUS biotecnologia).

Inicialmente os testes de amplificação foram realizados com cinco amostras e repetidos com o restante destas ao serem encontrados *locus* com amplificação nítida. Foram avaliados o total de 11 *primers* heterólogos cujas informações estão exibidas na Tabela 1.

O DNA foi amplificado em volume de reação de 16 μL , utilizando 1X tampão Tris-KCl, 2,5mM de MgCl_2 , 0,8 μM de *primer*, 0,4mM de dNTP, uma unidade de Platinun Taq DNA Polimerase e 30ng de DNA alvo. As reações foram amplificadas em termociclador Applied Biosystems Veriti. Inicialmente o DNA foi desnaturado a 94°C por quatro minutos e em seguida realizou 35 ciclos, cada um consistindo em: 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento (temperatura específica de cada *primer*) e um minuto de extensão a 72°C, após, realizou a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Tabela 1. Características dos *primers* heterólogos utilizados na análise de marcadores moleculares microsatélites em amostras de cacharas (*P. reticulatum*).

<i>Primer</i>	Sequência 5' - 3'	Ta (°C)	GenBank	Espécie	Referência
BR38-F	AGTTCCTTCTCGTTCCCCTTC	62 AM	GQ903737		
BR38-R	ATCTCCCCTCTCTCTGGCTC				
BR47-F	TCAGTGTGTGTGTGACTGTTG	59	GQ903739	<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Batista et al.,2009
BR47-R	GCTCCTCTTGTTCACATTC				
BR51-F	GTTACACATGGTCGCTGGTG	60	GQ903743		
BR51-R	GTTCACTCTCTTCGGCTTCG				
BR61-F	CTGTCGAAAACATGAGGCAG	65	GQ903749		
BR61-R	GACATCAGAGCGAAGCACAC				
PCOR1-F	AAACCCGAGGATAACCAGTC	55/66 NA	AY737063	<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	Revaldaves et al.,2005
PCOR1-R	CAGCGTGCTACTAACACAAAC				
PPU01-R	CAGCATCAGCGGAAAAGTTG	58/68	HQ317844		
PPU01-F	CAGTGGCGCATTCTGTAATC				
PPU04-R	GGTCTGATATGGAGGTCGTGA	58/68	HQ317847		
PPU04-F	CGGTGTCTCTGGGCTATTTT				
PPU09-R	CAGTGAGCCATACCTTCAGAG	60/68	HQ317852	<i>P. punctifer</i>	Saulo-Machado et al., 2010
PPU09-F	TGGATGGACAGATAGACAGG				
PPU10-R	GTTACCATGACCACTCGTTGC	50/68	HQ317853		
PPU10-F	AGTATTCTTGTGCGTAGCCCC				
PPU13-R	ATCAATTCCCAGCCGGAG	60/68 NA	HQ317856		
PPU13-F	TCTCAGGGGCCATTCTCA				
PPU15-R	GGCCAAAGTAACAGGCCA	60/68	HQ317858		
PPU15-F	GAGCGCCCAAGGTTTAC				

AM apresentou monomorfismo; NA não amplificou.

O conjunto contendo 8 μ L dos produtos amplificados mais 4 μ L de tampão de corrida (40% de sacarose e 0,25% de azul de bromofenol) foi submetido à eletroforese vertical em gel de poliacrilamida 10% (acrilamida: bisacrilamida - 29:1) e ureia 6 M, conduzidas em solução tampão TBE 0,5X (90 mM Tris-Borato, 2 mM EDTA) a 180 V (250 mA) durante 420 minutos (sete horas).

A visualização dos alelos microssatélites foi realizada com o gel corado com nitrato de prata seguindo a metodologia adaptada por BASSAM et al. (1991). O gel foi submetido à solução de fixação (10% etanol, 0,5% ácido acético) por 20 min, seguidamente por solução de nitrato de prata 6mM por 30 min e, posteriormente, procedeu-se uma prévia lavagem com água destilada por 30 segundos. O gel foi submetido na solução reveladora com 0,75 M NaOH 0,22% e formol 40%. Foram capturadas imagens dos géis revelados por meio de câmera digital e em seguida guardados para análise. O tamanho dos alelos foi calculado usando o marcador de peso molecular 100 pb (DNA ladder - Invitrogen®).

O gel foi documentado e submetido ao programa Adobe Photoshop CC (versão de 64 bits), e foi alinhado. Os alelos microssatélites foram calculados usando escada de DNA de 100 pb. Os alelos microssatélites observados nas amostras de *P. reticulatum* com os *primers* heterólogos, foram organizados em matriz de dados e posteriormente submetidos à análise estatística. Os *primers* que apresentaram padrões de amplificação satisfatórios foram selecionados para a análise populacional e posterior cálculo dos parâmetros genéticos.

As frequências alélicas, o tamanho dos alelos, o número de alelos (N_a), o número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), o coeficiente de endogamia (F_{IS}), Índice de Shannon (I) e o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) foram calculados para cada *locus* utilizando o software computacional GenAlex versão 6.5 (PEAKALL & SMOUSE, 2012).

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado através do software Cervus versão 3.0.7 (KALINOWSKI et al., 2007), e a riqueza alélica foi obtida pelo o programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2005). A presença de alelos nulos ($p < 0,05$) foi testada pelo programa Micro-Checker (OOSTERHOUT et al., 2004). De acordo com a escala proposta

por BOTSTEIN et al. (1980), os *loci* podem ser altamente ($PIC > 0,500$), moderados ($0,250 < PIC < 0,500$) ou pouco informativos ($PIC < 0,250$).

Resultados

Depois de eliminar os *primers* heterólogos que não amplificaram (NA) ou se caracterizaram como monomórfico (AM), mostrando pouca especificidade, não foram utilizados no presente estudo. Oito pares de *primers* apresentaram resultados satisfatórios de transferibilidade, amplificaram na população de cacharas: três originários de *B. rousseauxii* (BR47, BR51 e BR61) e cinco originários de *P. punctifer* (PPU01, PPU04, PPU09, PPU10 e PPU15) (Tabela 1).

O número de alelos por *locus* variou entre dois (BR47) a dezesseis (BR51 e PPU09), respectivamente. Os tamanhos dos alelos microssatélites produzidos nas análises tiveram variação de 142pb (BR47) a 400pb (PPU15). Após aplicar o software Micro-checker na planilha de dados, observaram-se evidências de alelos nulos em todos os *loci*.

A média do número efetivo de alelos (N_e) e riqueza alélica (R_a) foram 8,177 e 12,053, respectivamente, variando entre 1,784 (BR47) e 13,242 (PPU09) e 2,000 (BR47) e 16,000 (PPU09), respectivamente (Tabela 2). Alelos de baixa frequência ($< 0,100$) foram observados em quase todos os *loci* para os iniciadores heterólogos utilizados.

Os valores médios esperados de heterozigidade (H_e) foram superiores aos observados (H_o), e resultou em déficit heterozigótico, conforme demonstrado pelo coeficiente de endogamia (F_{IS}) que apresentou valores positivos ($> 0,00$) (Tabela 2). Os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W) foram significativos ($< 0,05$), e foi provavelmente influenciado pelo déficit heterozigótico ou pela presença de alelos nulos ($p < 0,05$) ou uma combinação de ambos. Por fim, o Conteúdo de Informação Polimórfica (sigla em inglês, PIC), que determina a representatividade do marcador molecular heterólogo, variou entre 0,343 (BR47) e 0,919 (PPU09), com valor médio de 0,806 (Tabela 2).

Tabela 2. Relação de *primers* heterólogos amplificados com sucesso em amostras de cachara (*P. reticulatum*) e parâmetros genéticos.

<i>Primer</i>	Na	(pb)	Ne	Ra	Ho	He	EH-W	F _{IS}	PIC
BR47	2	142-162	1,784	2,000	0,299	0,439	0,000*	0,320	0,343
BR51	16	221-383	10,650	15,685	0,640	0,906	0,000*	0,294	0,898
BR61	11	224-280	6,053	10,975	0,524	0,835	0,000*	0,372	0,814
PPU01	15	200-225	7,840	14,933	0,419	0,872	0,000*	0,519	0,862
PPU04	11	200-327	7,734	11,000	0,765	0,871	0,000*	0,122	0,858
PPU09	16	209-300	13,242	16,000	0,456	0,924	0,000*	0,506	0,919
PPU10	13	200-240	9,562	12,958	0,604	0,895	0,000*	0,325	0,886
PPU15	13	300-400	8,549	12,879	0,468	0,883	0,000*	0,471	0,872
Média	12,250	212- 290	8,177	12,053	0,522	0,828	0,000*	0,366	0,806

Na, número de alelos; pb, tamanho de fragmento em pares de base; Ne, número efetivo de alelos; Ra, riqueza alélica; EH-W, Equilíbrio de Hardy Weinberg (valores de p); F_{IS}, coeficiente de endogamia; PIC, conteúdo de informação polimórfica. *Significativo ao nível de 1% (p< 0,01).

Discussão

No presente estudo, a espécie *Pseudoplatystoma reticulatum* apresentou bons resultados na transferibilidade, com oito dos onze *primers* heterólogos testados, exibindo amplificação satisfatória. SUN et al. (2012) relataram que a amplificação cruzada de *locus* microsatélites tem relação direta com a distância filogenética entre as espécies, sendo menos eficiente entre famílias ou gêneros diferentes e é consistente com os resultados deste estudo, corroborando com outros pesquisadores (CARMO et al., 2015; CASTRO et al., 2017) que, em busca de *primers* heterólogos, confirmam que ocorrem as melhores amplificações entre espécies do mesmo gênero, quando trabalharam com *Brycon orbignyanus*.

OLIVEIRA et al. (2006) e ABDUL-MUNEER (2014) e afirmam que os *primers* heterólogos podem ser utilizados com sucesso em várias espécies de peixes e a qualidade da amplificação depende do grau de conservação genética dos locais de ligação do *primer* no DNA. Aplicando *primers* específicos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) em pirarucu (*Arapaima Gigas*), VERGUEIRO JUNIOR (2010), não obteve amplificação em nenhum produto mesmo após diversas alterações nas condições da PCR, na concentração de MgCl₂, concentração nas amostras de cDNA e temperatura de hibridação. Por outro lado, amplificações cruzadas foram satisfatória em seis espécies de Pimelodidae (SOUZA

et al., 2012) seis espécies do gêneros *Brycon* e um do gênero *Prochilodus* (SOUZA et al., 2018) ao proporem o isolamento e a caracterização de microssatélites de pirarara, *Phractocephalus hemiliopterus* e piabanha, *Brycon gouldingi*, respectivamente.

O número de alelos (Na) microssatélites para cada *primer* heterólogo e a variação no tamanho dos fragmentos (pb) produzidos nesta pesquisa, por *primers* derivados dos gêneros *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma*, foram similares aos estudos realizados com *P. reticulatum* (ABREU et al., 2009; ALBUQUERQUE, 2014; ALMEIDA et al., 2017), *P. punctifer* (MACHADO, 2013), *Leiarius marmoratus* (MANTOVANI, 2018), *Rhamdia quelen* (VIRMOND et al., 2017), *Brachyplatystoma platynemum* (OCHOA et al., 2015) e com seis espécies da família Pimelodidae (SAULO-MACHADO et al., 2011). Vale ressaltar que o menor número de alelos relatados em relação às pesquisas conduzidas por BENITES (2008) e PRADO (2014) pode ser atribuído a fatores tais como: características genéticas intrínsecas de cada espécie, estrutura populacional ou diferentes pressões (ocorrência de mutações, fluxo gênico, etc.) nas regiões avaliadas. BENITES (2008) afirma que o fluxo gênico é determinado pelo cruzamento entre indivíduos nativos ou imigrantes.

Há pouco tempo, Mantovani (2018) demonstrou que os *primers* para *Brachyplatystoma rosseauxii*, *Brycon hilarii* e *P. punctifer* podem ser usados em populações comerciais de Jundiá da Amazônia (*Leiarius marmoratus*), e, em casais silvestres de *P. reticulam* também foi comprovado que *primers* para *P. corruscans* e *P. punctifer* comportaram-se de maneira satisfatória (ALBUQUERQUE, 2014). Estes trabalhos exibiram índices de H_o e H_e aproximados aos relatados no presente estudo em amostras de uma população cativa, indicando sua utilidade como ferramenta adequada para estudos de genética populacional. A variação e o número de alelos, por *loci*, também foi semelhante ao relatado na amplificação cruzada em *Randhia quelen* e *P. reticulatum* em alguns *primers* heterólogos tais como: PC17, PC97, Pcor1 e Pcor2; Pcor1, Pcor5, Pcor8, Pcor10, Pcor21, Pcor23, Pcor28, respectivamente (VIRMOND et al., 2017; ABREU et al. 2009). No entanto, o número de alelos foi menor em relação aos encontrados em pesquisas que utilizaram *primers* específicos de *P. corruscans* em *P. reticulatum* (PRADO, 2014), contrário aos estudos de SEERIG (2010) que obteve números menores de alelos (média de 5,9) utilizando *primers* específicos em pintado, *P. corruscans* e em cacharas, *P. reticulam*. PENHA (2019) comprovou que além do gênero *Brycon*, *Prochilodus* e *Colossoma* também

apresentam flexibilidade na transferência de *primers* microssatélites em *B. falcatus*, apresentando amplificação cruzada satisfatória.

Os baixos valores de números efetivos de alelos (N_e) em relação à riqueza alélica (R_a), , foram consistentes com a baixa frequência em todos os *loci*, com exceção ao BR47 ($R_a=2,00$), diferente das pesquisas de PENHA (2019) que R_a se comportou com média de 2,507, confirmando que os alelos foram informativos quando o mesmo verificou em população de *Brycon falcatus* a viabilidade de *primers* heterólogos originários de *B. opalinus*, *B. hilarii*, *B. orbignyana*, *Prochilodus argenteus* e *Colossoma macropomum*. No entanto na pesquisa de VIRMOND et al. (2017) dois *primers* Pcor2(8,850) e PC17(9,813) os valores de N_e se aproximaram de nossa pesquisa em PPU10(9,562) e PPU15(8,549).

Na presente pesquisa, o Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC) de BOTSTEIN et al. (1980), sete locos heterólogos foram classificados como altamente informativo (BR51, BR61, PPU01, PPU04, PPU09, PPU10 e PPU15) ou moderadamente informativo (BR47). Nas pesquisas realizadas por CASTRO et al. (2017) e SOUZA et al., (2018) em busca de *primers* heterólogos com o gênero *Brycon*, obtiveram PIC altamente informático nos *loci* (Bh13 e BC48-10) e BoM13, respectivamente. Enquanto o conteúdo de informação moderada foi comum para o locus BoM5.

O desvio do equilíbrio de Hardy Weinberg (H-W) foi evidente nos oito *loci* utilizados no presente estudo. Conforme ZHIVOTOVSKY et al. (2015) pode ser justificado pela presença de alelos nulos, uma vez que pode resultar em superestimação de homozigotos, levando ao aumento na estimativa do coeficiente de endogamia (F_{IS}). O excesso de homozigotos apresentados nos *loci* pode ser pela segregação de alelos nulos na população. Outros testes podem ser feitos nestes marcadores para avaliações das causas destes desvios de H-W. Concede-se a possibilidade de diversos fatores ao desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EH-W) na população amostrada. Dentre estes pode-se destacar o déficit de heterozigotos por inferência da influência de inúmeros fatores. Um destes é o alto número de alelos por *locus*, presença de alelos nulos, endogamia e efeito Wahlund (proporção de heterozigóticos inferior à expectativa do modelo de Hardy-Weinberg).

No presente estudo, os valores de diversidade genética estimados por heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e) e número de alelos (N_a), por *loci*, recomendam que os *primers* heterólogos podem ser utilizados em avaliações genéticas em populações de

cacharas (*P. reticulam*). Estudos recentes utilizando populações naturais de cacharas e em populações cativas, o Jundiá (*R. quelen*), indicaram resultados semelhantes de H_o , H_e e N_a (PRADO, 2014; VIRMOND et al., 2017), deste modo, reafirmando a aplicabilidade dos *primers* testados, ao contrário de MANTOVANI (2018) e SOUZA et al. (2018), que trabalhando com Jundiá da Amazônia (*L. marmoratus*) e uma população de *B. gouldingi* no rio Araguaia, os valores de H_o , H_e e N_a se comportaram abaixo dos encontrados no presente estudo. Conforme os resultados de SOUZA et al. (2018), a baixa diversidade genética pode ter sido atribuído pela intensificação da ação antrópica no rio Araguaia (sobre pesca e fragmentação de habitat), diferente de VIRMOND et al., (2017) em que o manejo reprodutivo adotado em suas pesquisas se mostrou adequado, uma vez que garantiu a manutenção da variabilidade genética das populações, valores estes similares ao presente estudo

Conforme FRANKHAM et al. (2008) e ASHIKAGA et al. (2015), as populações naturais estão sujeitas as forças tais como: mutação, seleção, deriva e migração genética, levando à perda ou ganho de diversidade genética, assim como aos fatores relacionados as características genéticas intrínsecas de cada espécie, estrutura populacional ou diferentes pressões seletivas nas regiões avaliadas.

Uma relação de estudos sobre o desenvolvimento de *loci* microssatélites utilizando espécies da ordem de siluriformes (*P. corruscans*, *B. vaillantii*, *Zungaro jahu*, *B. rousseauxii*, *P. punctifer*, *Phractocephalus hemiliopterus*, *Trichomycterus areolatus*) e seus respectivos pesquisadores (REVALDAVES et al., 2005; RODRIGUES et al., 2009; CARRILLO-AVILA et al., 2009; BATISTA et al., 2010; SAULO-MACHADO et al., 2011; SOUZA ET AL., 2012; MUNÓZ-ROJAS et al., 2012), buscando a utilização de *primers* heterólogos na amplificação cruzada de espécies taxonomicamente relacionadas apresentou valores médios de N_a e H_e (11,8 e 0,813; 11,33 e 0,789; 6,75 e 0,659; 9,87 e 0,706; 7,4 e 0,592; 5,0 e 0,660; 4,40 e 0,580), respectivamente. Resultados estes compatíveis com o presente estudo.

A amplificação cruzada de marcadores de microssatélites demonstrou ser uma ótima ferramenta para estudos genéticos em cacharas, *Pseudoplatystoma reticulam*. Apesar de PRADO et al. (2014) terem desenvolvido *primers* microssatélites polimórficos que exibiu variação alélica suficiente para ser aplicado com sucesso em estudos genéticos dessa

espécie, fez-se necessário a presente investigação. Os mesmos autores confirmam que a espécie em questão não foi avaliada quanto à UICN (União Internacional para Conservação da Natureza). Neste contexto, constatou que o uso de iniciadores heterólogos em cacharas é executável e estudos complementares devem surgir para atestar a efetivação desses marcadores, especialmente no que diz respeito à possibilidade de amplificação cruzada entre espécies ou até o avanço de outros *primers* específicos para cada espécie.

Conclusão

A amplificação cruzada de oito *primers* originados de dourada, *Brachyplatystoma rousseauxii* (BR 47, BR 51 e BR 61) e surubim, *Pseudoplatystoma punctifer* (PPU 01, PPU 04, PPU 09, PPU 10 e PPU 15) foram validados para cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*. Esses marcadores microsatélites podem ser úteis para testar a diversidade genética e estrutura populacional da espécie em questão.

Agradecimentos

O apoio financeiro para este estudo deve-se ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual de Maringá (PPZ/UEM) e pelo apoio institucional do Instituto Sócio Ambiental e dos Recursos Hídricos da Universidade Federal Rural da Amazônia – ISARH/UFRA. Ao grupo de pesquisas PeixeGen, pela estrutura e apoio financeiro e treinamento. Às empresas privadas que forneceram os materiais utilizados na pesquisa.

Referências

ABDUL-MUNEER, P.M. Application of Microsatellite Markers in Conservation Genetics and Fisheries Management: Recent Advances in Population Structure Analysis and Conservation Strategies: Review Article. Hindawi Publishing Corporation Genetics Research International Volume 2014, Article ID 691759, 11 pages, p.01-11. 2014 <http://dx.doi.org/10.1155/2014/691759>.

ABDUL-MUNEER, P.M.A.; GOPALAKRISHNAN, R.; SHIVANANDAN, V.S. BASHEER, and A.G. PONNIAH, “Genetic variation and phylogenetic relationship between two species of yellow catfish, *Horabagrus brachysoma* and *H. nigricollaris* (Teleostei: Horabagridae) based on RAPD and microsatellite markers,” *Molecular Biology Reports*, vol. 38, no. 4, p. 2225–2232, 2011.

ABREU, M.M., Diversidade genética de populações naturais de *Brycon falcatus* (Muller e Troschel, 1844) nas bacias dos rios Araguaia e Guaporé, Mato Grosso, Brasil. 2014. 49 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

ABREU M. M; PEREIRA; L.H.G.; VILA, V.B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. *Genetics and Molecular Biology*, Brasil, n. 4, p. 868-873, 2009.

ACEB. 1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura – Brasil – 2014. Associação Cultural e Educacional Brasil, Brasília, DF, 136 p.

ALBUQUERQUE, D.M. Variabilidade genética de *Pseudoplatystoma reticulatum* do Programa de Melhoramento Genético. 2014. 52 f. : il. algumas color. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

ALMEIDA, M. da S. Caracterização genética de *Pseudoplatystoma reticulatum* do Mato Grosso por meio de marcadores moleculares microsatélites. 2017. 24 f. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

ALMEIDA, M.; CASTRO, P.L. de; LEITE, N.G.; LEWANDOWSKI, V.; CASETTA, J., CELESTINO, L.S., GOES, E.R., RIBEIRO, R.P. Amplificação cruzada de marcadores moleculares microsatélites para *Pseudoplatystoma reticulatum*. In: ANAIS DO CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, 2017, Santos. Anais eletrônicos... Campinas:Galoá,2018.Disponívelem:<<https://proceedings.science/zootec/papers/amplificacao-cruzada-de-marcadores-moleculares-microsatelites-para-pseudoplatistoma-reticulatum?lang=pt-br>>. Acesso em: 12 abr. 2020.

ASHIKAGA, F. Y., ORSI, M. L., OLIVEIRA, C., AND SENHORINI, J. A. (2015). The endangered species *Brycon orbignyanus*: genetic analysis and definition of priority areas for conservation. *Environ. Biol. Fishes* 98, 1845–1855. doi: 10.1007/s10641-015-0402-8

BATISTA, J.S.; FARIAS, I.P.; FORMIGA-AQUINO, K.; SOUSA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A.; DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma*

rousseauxii, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification.

Conservation Genetic Resources, v. 2, p. 5-10, 2010.

BASSAM, B.J.; CAETANO-ANOLLÉS, G.; GRESSHOFF, P.M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, v. 196, p.80-83. 1991.

BENITES, C. Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes:Pimelodidae) da Bacia hidrográfica Paraná- Paraguai, por marcadores moleculares tipo microssatélite. 2008. 88 f. Tese (Doutorado em Aquicultura em Águas Continentais) – Universidade Estadual Paulista, Centro de Aquicultura da UNESP, Jaboticabal.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R.L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, v.32, p.314-331, 1980.

BUITRAGO-SUAREZ, U.A.; BURR, MB. 2007. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma Bleeker* (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. *Zootaxa*. v.1512,p.138.,jun.2007.*availableonlineat* <https://doi.org/10.15468/SIENKK>. ISSN 1175-5326 (print edition), ISSN 1175-5334 (online edition).

CARMO, F.M., da S.; POLO, É. M.; SILVA, M. A. da; MENEZES, G. DE Y. Optimization of heterologous microsatellites in Piracanjuba. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.50, n.12, p.1236-1239, dez. 2015 DOI: 10.1590/S0100-204X2015001200015.

CARRILLO-AVILA, M.; RESENDE, E. K.; MARQUES, D. K. S.; GALETTI-JR., P.M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, *Zungaro jahu* (Siluriformes: Pimelodidae). *Conservation Genetics*, v. 10, p. 1597–1599, 2009. <https://doi.org/10.1007/s10592-008-9802-z>.

CARLSON, V. ANUÁRIO BRASILEIRO DE PESCA E AQUICULTURA (1º) 2014. Victor Carlson, (Coord.). Associação Cultural e Educacional Brasil – ACEB / Ministério da Pesca e Aquicultura – MPA, São Paulo - SP, 136p.

CASTRO, P.L. de; RIBEIRO, R.P.; ALVES, S.C. dos S.; GOES, E.S. dos R.; SOUZA, F. P. de POVEDA-PARRA, A.R.; VARGAS, L.; URREA-ROJAS, A.M.; LOPERA-BARRERO, N.M. Cross-amplification of heterologous microsatellite markers in Piracanjuba. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.47, n.12, p. 01-06 e20170374, 2017.

<https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20170374>. ISSN 1678-4596.

CREPALDI, D. V.; FARIA, M.C.; TEIXEIRA, E. de A.; RIBEIRO, L. P.; COSTA, A. A. P.; MELO, D. C. de, CINTRA, A. P. R., PRADO, S. de A., COSTA, F. A. A., DRUMOND, M. L., LOPES, V. E., MORAES, V.E. de. O surubim na aquicultura do Brasil. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.30, n.3/4, p.150-158, jul./dez. 2006. Disponível em www.cbra.org.br.

DANTAS, H. L. Avaliação da estrutura genética do surubim, *Pseudoplatystoma corruscans* (Actinopterygii: Siuriformes) como subsídio para o repovoamento do submédio São Francisco. 2010. 48 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2010.

EMBRAPA. Princípios básicos para a produção de alevinos de surubins (Pintado e Cachara) / autores, INOUE, L. A. K. A.; HISANO, H.; ISHIKAWA, M. M.; ROTTA, M. A.; SENHORINI, J. A. Dourados, MS: Embrapa Agropecuária Oeste. Manaus, AM: Embrapa Amazônia Ocidental. Corumbá, MT: Embrapa Pantanal, 2009. 26 p. (Documentos / EMBRAPA Agropecuária Oeste, ISSN 1516-845X; 99. EMBRAPA Amazônia Ocidental, ISSN 1517-3135; 68. EMBRAPA Pantanal, ISSN 1517-1973; 100).

EMBRAPA. A pesca e a aquicultura de surubins no Brasil: Panorama e considerações para a sustentabilidade / autores, SILVA, A. P. da; LIMA, A. F.; LUNDSTEDT, L. M.. Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2015, 42 p. (Documentos / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2318-1400 ;21).

EMBRAPA. Programas de melhoramento genético na piscicultura / autores, SILVA, G. F. da; SHIOTSUKI, L.; TEIXEIRA, R. de A.; DIAS, L.T.; VASQUES, L.C.; FREITAS, L. E.L. de; KIRSCHNIK, L.N.G.; VARELA, E.S. Palmas, TO: Embrapa Pesca e Aquicultura, 2018. 58 p. (Documentos / Embrapa Pesca e Aquicultura, ISSN 2318-1400; 37). CDD 664.942.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2018. El estado mundial de la pesca y la acuicultura 2018. Cumplir los objetivos de desarrollo sostenible. Roma. Licencia: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. ISBN 978-92-5-130688-8.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2020. FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. In brief - Sustainability in action. Rome, Italy.. ISBN: 978-92-5-132773-9.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: SBG – Sociedade Brasileira de Genética. 2008, 280p.

GOUDET, J. FSTAT: A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices(version2.9.3.2).2005.Available,from: <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Accessed: Mar. 21, 2018.

HAMOY, I. ARARIPE, J.; GUERREIRO, S.; SANTOS, S. Genética Molecular Aplicada à Conservação de Peixes Amazônicos. In: Ecossistemas Aquáticos: tópicos especiais / Raimundo Aderson Lobão de Souza, (Organizador), Willian Leslie Overal (Revisor Técnico). Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 2018. Cap. 12, p. 275-286. ISBN: 978-85-7295-130-2.

KALINOWSKI, S.T., TAPER, M.L., MARSHALL, T.C.. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Molecular Ecology. Mol. Ecol., v.16, n.5, p.1099-1106, 2007.

KIM, K. S.; MIN, M.S.; AN., J. H.; LEE, H., “Cross-species amplification of Bovidae microsatellites and low diversity of the endangered Korean goral,” Journal of Heredity, USA, vol. 95, no. 6, p. 521–525, 2004.

LOPERA-BARRERO, N. M. Diversidade genética de *Brycon orbignyanus* em sistema reprodutivo seminatural. 2007. 92 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Maringá.

LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; GOMES, P.C.; JACOMETO, C.B.; LOPES, T.S. Comparación de protocolos de extracción de ADN com muestras de aleta y larva de peces: extracción modificada con sal (NaCl). Ciencia e Investigación Agraria, Chile, v.35, n.1, p.15-24, 2008.

MACHADO, A.S.C. Genética populacional do bagre amazônico *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos rios Madeira e Mamoré/Guaporé. 2013. 76 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Amazonas. Instituto de Ciências Biológicas, Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, Amazonas, 2013.

MANTOVANI, L. S. C. Diversidade genética em estoques de jundiá da Amazônia (*Leirarius marmoratus*). 2018. 52 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Maringá, Paraná, 2018.

- MELO, B.F.; SATO, Y.; FORESTI, F. The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. *Neotropical Ichthyology*, São Paulo, v.11, n. 3, p. 625-636. 2013.
- MIA, M.Y.; TAGGART, J.B.; GILMOUR, A.E.; GHEYAS, A.A.; DAS, T.K.; KOHINOOR, A.H.M.; RAHMAN, M.A.; ABDUS SATTAR, M.A.; HUSSAIN, M.G.; MAZID, M.A.; PENMAN, D.J.; McANDREW, B.J. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. *Aquaculture*, v. 247, p. 267-273, 2005.
- MUNÓZ-ROJAS, P.; QUEZADA-ROMEGIALLI, C.; VÉLIZ, D. Isolation and characterization of ten microsatellite loci in the catfish *Trichomycterus areolatus* (Siluriformes: Trichomycteridae), with cross-amplification in seven Trichomycterinae species. *Conservation Genetic Resources*, v. 4, n. 2, p. 443-445, 2012. ISSN 1877-7252.
- OCHOA, L. E.; PEREIRA, L. H. G.; COSTA-SILVA, G. J.; ROXO, F. F.; , BATISTA, J. S.; FORMIGA, K.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. *Phylogeography of B. platynemum*. *Ecology and Evolution*, v. 5, n. 10, p. 2005–2020. 2015
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSK, R.; CARNEIRO, M. L. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* vol.29 no.2 São Paulo 2006, p.294-307, 2006. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572006000200018>.
- OOSTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; PETER, S. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Article in *Molecular Ecology Notes*, v. 4, n. 3, p. 535-538 · September 2004 with 6,603 Reads. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x. ISSN 1365-294X.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P.E. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, (Oxford, England), PMID: PMC3463245, v. 28, p. 2537-2539, 2012.
- PEIXE BR – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PISCICULTURA. 2020. Anuário Peixe BR da Piscicultura, 136p.

PENHA, D. dos S. Transferibilidade de *primers* heterólogos para *Brycon falcatus* e análise citogenética em *Oreochromis niloticus*. 2019. 61 f. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Universidade Estadual de Londrina, Paraná. 2019.

PENTEADO, P.R.; KAVALCO, K.F.; PAZZA, R. Cross-Amplification of six microsatellite loci isolated from *Astyanax mexicanus* to species of genus with South American distribution. *Evolução e Conservação da Biodiversidade*, Viçosa, v.2, n. 1, p. 11-15, 2011. ISSN 2236-3866.

PRADO, F.D. do. Marcadores moleculares na identificação de híbridos e introgressão genética em populações de *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulatum*. 2014. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas - Genética) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências de Botucatu, São Paulo.

PRADO, F. D., PARDO, B.G., GUERRA-VARELA, J. et al. Development and characterization of 16 microsatellites for the Neotropical catfish *Pseudoplatystoma reticulatum* and cross species analysis. *Conservation Genet Resour* **6**, 679–681 (2014). <https://doi.org/10.1007/s12686-014-0180-1>.

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes, Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, v.5, p.463-465, 2005. doi: 10.1111/j.1471-8286.2005.00883.x.

RIBEIRO, R.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; POVH, J.A.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, M. del P.; FORNARI, D.C.; BAUMGARTNER, G.; BAUMGARTNER, D.; SOUZA, F.P. de; CASTRO, P.L. de; POVEDA-PARRA, A. R. Genetic diversity of *Salminus brasiliensis* wild populations in downstream and upstream Cachoeira Branca, Verde River MS Brazil: a preliminary view. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 37, n. 1, p. 507-516, jan./fev. 2016. DOI: 10.5433/1679-0359.2016v37n1p507.

RIBOLLI, J. Caracterização genética populacional do dourado *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) da Bacia do alto e médio rio Uruguai. 2014. 105 f. Tese (Doutorado em Ciências – Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal São Carlos, São Carlos.

RODRIGUES, F.G.; FARIAS, I. P.; BATISTA, J.S.; ALVES-GOMES, J. Isolation and characterization of microsatellites loci for “piramutaba” (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genetic Resources*, v. 1, n. 1, p. 365–368, 2009. DOI: 10.1007/s12686-009-9084-x.

ROSSINI, B.C. Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) / Bruno César Rossini. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 121 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SAULO-MACHADO, A.C.; FORMIGA, K.M.; ORTIZ, M.F.; SOUSA, A.C.B.; ALVES-GOMES, J.A.; BATISTA, J. S. Polymorphic microsatellite DNA markers for the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae). *Conservation Genet. Resour.* 2011 3:307–310. DOI 10.1007/s12686-010-9349-4.

SEERIG, A.S. Utilização de Marcadores Microsatélites na Identificação E Caracterização do Híbrido Entre as Espécies *Pseudoplatystoma corruscans* e *Pseudoplatystoma reticulam*. 2010. 32 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) / Arno Soares Seerig. – Belo Horizonte: 2010. 32 f. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

SEGATTO, A. L. A.. 2017. Marcador molecular CAPS - Sequências polimórficas amplificadas clivadas (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences), In: Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores). – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.

ROSSINI, B.C. Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu. 2010. 121 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) / Bruno César Rossini. -- São Carlos : UFSCar, 2010. 121 f. Dissertação – Universidade Federal de São Carlos, 2010.

SOUZA, C.A; HASHIMOTO, D.T.; PEREIRA, L.H.G.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; PORTO-FORESTI, F. Development and characterization of microsatellite *loci* in *Phractocephalus hemiliopterus* (Siluriformes: Pimelodidae) and their cross-species amplification in six related species. *Conservation Genetic Resources*, v. 4, p. 499-501, 2012. DOI 10.1007/s12686-011-9584-3.

SOUZA, F.P. de; LIMA, E.C.S, de; LEITE, N.G.; URREA-ROJAS, A.M.; YAMACHITA, A.L.; PANDOLFI, V.C.F.; LOPERA-BARRERO, N.M. Transferability of heterologous microsatellite primers in *Brycon gouldingi*. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.48, n.11,p.1-6,2018. ISSN e1678-4596, <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20180412>.

SUDHEER, P.D.V.; MASTAN, N.S.G.; RAHMAN, H.; RAVI PRAKASH, C.; SINGH, S.; REDDY, M.P., “Cross species amplification ability of novel microsatellites isolated from *Jatropha curcas* and genetic relationship with sister taxa: cross species amplification and genetic relationship of *Jatropha* using novel microsatellites,” *Molecular Biology Reports*, vol. 38, no. 2, p. 1383–1388, 2011.

SUN, D.Q. LI, H.Y. XU, T.J. WANG, R.X. Development of microsatellite markers for the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* (Sciaenidae) by cross-species amplification. *Genetics and Molecular Research*. v. 11, n. 2, p. 1469-1474, 2012. DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2012>.

TURCHETTO, C., TURCHETTO-ZOLET, A. C., M., PASSAIA, G., ZANELLA, C. 2017. Marcadores genéticos baseados em DNA, In: *Marcadores Moleculares na Era genômica: Metodologias e Aplicações / Andreia Carina Turchetto-Zolet, Caroline Turchetto, Camila Martini Zanella e Gisele Passaia (organizadores)*. – Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 181 p. ISBN 978-85-89265-26-3.

VÄLI, U.; EINARSSON, A.; WAITS, L.; ELLEGREN, H. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? *Molecular Ecology*, 17 (17), 3808–3817. 2008. doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.03876.

VASEMÄGI, A.; GROSS, R.; PALM, D.; PAAVER, T.; PRIMMER, C.R. Discovery and application of insertion-deletion (INDEL) polymorphisms for QTL mapping of early life-history traits in Atlantic salmon. *BMC Genomics*, v. 11, n. 156, p. 1-11, 2010. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/156>.

VERGUEIRO JUNIOR, A.M.K. Efeito do disruptor endócrino 17 β -estradiol sobre

espécies *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) e *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818): Bioindicadores Fisiológicos e Moleculares. 2010. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) – INPA, Manaus, 2010. 59 f. : il. algumas color.

VIRMOND, M.; CONCEIÇÃO, D.; AMARAL JUNIOR, H.; PETERSEN, R. L. Genetic variability of captive populations of *Rhamdia quelen* (Teleostei: Pimelodidae) using microsatellite markers. *Biotemas*, v. 30, n. 4, p. 51-58, dezembro de 2017. ISSN 2175-7925 <http://dx.doi.org/10.5007/2175-7925.2017v30n4p51>.

WAHLUND, von S. 1928. Zusammensetzung von populationen und Korrelationserscheinungen vom Standpunkt der vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* v. 11, n. 1, p. 65-106, First published: May 1928. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1928.tb02483.x>

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, v. 38, n. 6, p. 1358-1370. 1984. <https://www.researchgate.net/publication/200102299>.

YASODHA, R.; GHOSH, M.; SUMATHI, R.; GURUMURTHI, K., “Crossspecies amplification of eucalyptus SSR markers in Casuarinaceae,” *Acta Botanica Croatica*, v. 64, n. 1, p. 115-120, 2005. <https://www.researchgate.net/publication/27189229>.

ZHIVOTOVSKY, L.A.; TETERINA, A.A.; MUKHINA, N.V.; STROGANOV, A.N.; RUBTSOVA, G.A.; AFANASIEV, K.I. Effects of genetic drift in a small population of Atlantic cod (*Gadus morhua kildinensis* Derjugin) landlocked in a meromictic lake: genetic variation and conservation measures. *Conservation Genetics*, September 2015. DOI 10.1007/s10592-015-0774-5.

V. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- Os iniciadores do tipo microssatélites, mesmo sendo heterólogos, mostraram-se eficientes no estudo da caracterização genética em populações de cacharas, *Pseudoplatystoma reticulatum*.

- Os *primers* heterólogos originados de *Brachyplatystoma rousseauxii*, apesar de não sendo do mesmo gênero da espécie em estudo, mostraram-se eficientes para espécie taxonomicamente relacionada (Ordem Siluriformes).

- Os *primers* heterólogos originados de *Pseudoplatystoma punctifer*, sendo do mesmo gênero da espécie em estudo, mostraram-se eficientes para espécie taxonomicamente relacionada (Gênero *Pseudoplatystoma*). Esses *primers* heterólogos são ferramentas eficientes para análise da diversidade e estrutura genética de populações do gênero *Pseudoplatystoma* das bacias Paraguai e Paraná.

- A amplificação cruzada de oito *primers* originados de espécies diferentes foi validada para *Pseudoplatystoma reticulatum*.

- Os resultados adquiridos com esses iniciadores do tipo microssatélites podem fornecer dados genéticos importantes para planos de manejo e conservação de cacharas, testar a diversidade genética e estrutura populacional da espécie em questão.

VI. ANEXO



Normas editoriais para publicação na Semina: ciências agrárias

A revista Semina: Ciências Agrárias, com periodicidade trimestral, é uma publicação de divulgação científica do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Estadual de Londrina. Tem como objetivo publicar artigos, comunicações, relatos de casos e revisões relacionados às Ciências Agrônômicas, Ciência e Tecnologia de Alimentos, Medicina Veterinária, Zootecnia e áreas afins.

Categorias dos Trabalhos

- A Artigos científicos: no máximo 25 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas;
 B Comunicações científicas: no máximo 12 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 16 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
 b) Relatos de casos: No máximo 10 páginas, com referências bibliográficas limitadas a 12 citações e no máximo duas tabelas ou duas figuras ou uma tabela e uma figura;
 c) Artigos de revisão: no máximo 35 páginas incluindo figuras, tabelas e referências bibliográficas.

Apresentação dos Trabalhos

Os originais completos dos artigos, comunicações, relatos de casos e revisões podem ser escritos em português, inglês ou espanhol e devem ser enviados em três cópias impressas em papel A4, com espaçamento duplo, elaborado no editor de texto Word for Windows, fonte Times New Roman, tamanho 12 normal, com margens esquerda e direita de 2,5 cm e superior e inferior de 2 cm, respeitando-se o número de páginas, devidamente numeradas, de acordo com a categoria do trabalho. Figuras (desenhos, gráficos e fotografias) e tabelas serão numeradas em algarismos arábicos e devem estar separadas no final do trabalho. As figuras e tabelas deverão ser apresentadas nas larguras de 8 ou 16 cm com altura máxima de 22 cm, lembrando que se houver a necessidade de dimensões maiores, no processo de editoração haverá redução para as referidas dimensões. As legendas das figuras deverão ser colocadas em folha separada obedecendo à ordem numérica de citação no texto. Fotografias devem ser identificadas no verso e desenhos e gráfico na parte frontal inferior pelos seus respectivos números do texto e nome do primeiro autor. Quando necessário deve ser indicado qual é a parte superior da figura para o seu correto posicionamento no texto.

Preparação dos manuscritos

Artigo científico:

Deve relatar resultados de pesquisa original das áreas afins, com a seguinte organização dos tópicos: Título; Título em inglês; Resumo com Palavras-chave (no máximo seis palavras); Abstract com Key-words (no máximo seis palavras); Introdução; Material e Métodos; Resultados e Discussão com as conclusões no final ou Resultados, Discussão e Conclusões separadamente; Agradecimentos; Fornecedores, quando houver e Referências Bibliográficas. Os tópicos devem ser escritos em letras maiúsculas e minúsculas e destacados em negrito, sem numeração. Quando houver a necessidade de subitens dentro dos tópicos, os mesmos devem receber números arábicos. O trabalho submetido não pode ter sido publicado em outra revista com o mesmo conteúdo, exceto na forma de resumo de congresso, nota prévia ou formato reduzido.

Na primeira página do manuscrito devem constar as seguintes informações:

1. *Título do trabalho*: O título, acompanhado de sua tradução para o inglês, deve ser breve e suficientemente específico e descritivo, contendo palavras que permitam ao leitor ter uma idéia do conteúdo do artigo.

2. *Nomes dos autores*: Deverão ser escritos por extenso, separados por ponto e vírgula, logo abaixo do título do trabalho. A instituição, os órgãos de fomento e a identificação dos autores deverão ser feitos por inserção numérica de notas de rodapé ao final do título e dos nomes. O autor para correspondência com endereço completo, telefone, fax e E-mail deverá ser destacado com um asterisco sobrescrito junto ao seu número de identificação.

A partir da segunda página do manuscrito a apresentação do trabalho deve obedecer à seguinte ordem:

1. *Título do trabalho*, acompanhado de sua tradução para o inglês.

2. *Resumo e Palavras-chave*: Deve ser incluído um resumo informativo com um mínimo de 150 e um máximo de 300 palavras, na mesma língua que o artigo foi escrito, acompanhado de sua tradução para o inglês (*Abstract e Key words*).

3. *Introdução*: Deverá ser concisa e conter revisão estritamente necessária à introdução do tema e suporte para a metodologia e discussão.

4. *Material e Métodos*: Poderá ser apresentado de forma descritiva contínua ou com subitens, de forma a permitir ao leitor a compreensão e reprodução da metodologia citada com auxílio ou não de citações bibliográficas.

5. *Resultados e discussão com conclusões ou Resultados, Discussão e Conclusões*: De acordo com o formato escolhido, estas partes devem ser apresentadas de forma clara, com auxílio de tabelas, gráficos e figuras, de modo a não deixar dúvidas ao leitor, quanto à autenticidade dos resultados, pontos de vistas discutidos e conclusões sugeridas.

6. *Agradecimentos*: As pessoas, instituições e empresas que contribuíram na realização do trabalho deverão ser mencionadas no final do texto, antes do item Referências Bibliográficas.

Observações:

Quando for o caso, antes das referências, deve ser informado que o artigo foi aprovado pela comissão de bioética e foi realizado de acordo com as normas técnicas de biosegurança e ética.

Notas: Notas referentes ao corpo do artigo devem ser indicadas com um símbolo sobrescrito, imediatamente depois da frase a que diz respeito, como notas de rodapé no final da página.

Figuras: Quando indispensáveis figuras poderão ser aceitas e deverão ser assinaladas no texto pelo seu número de ordem em algarismos arábicos. Se as ilustrações enviadas já foram publicadas, mencionar a fonte e a permissão para reprodução.

Tabelas: As tabelas deverão ser acompanhadas de cabeçalho que permita compreender o significado dos dados reunidos, sem necessidade de referência ao texto.

Grandezas, unidades e símbolos: Deverá obedecer às normas nacionais correspondentes (ABNT).

7. *Citações dos autores no texto*: Deverá seguir o sistema de chamada alfabética escrita com letras maiúsculas seguidas do ano de publicação de acordo com os seguintes exemplos:

Os resultados de DUBEY (2001) confirmam que o.....

De acordo com SANTOS et al. (1999), o efeito do nitrogênio.....

Beloti et al. (1999b) avaliaram a qualidade microbiológica.....

.....e inibir o teste de formação de sincício (BRUCK et al., 1992).

.....comprometendo a qualidade de seus derivados (AFONSO; VIANNI, 1995).

8. *Referências Bibliográficas*: As referências bibliográficas, redigidas segundo a norma NBR 6023, ago. 2000, da ABNT, deverão ser listadas na ordem alfabética no final do artigo. Todos os autores participantes dos trabalhos deverão ser relacionados, independentemente do número

de participantes (única exceção à norma – item 8.1.1.2). A exatidão e adequação das referências a trabalhos que tenham sido consultados e mencionados no texto do artigo, bem como opiniões, conceitos e afirmações são da inteira responsabilidade dos autores.

As outras categorias de trabalhos (Comunicação científica, Relato de caso e Revisão) deverão seguir as mesmas normas acima citadas, porém, com as seguintes orientações adicionais para cada caso:

Comunicação científica

Uma forma concisa, mas com descrição completa de uma pesquisa pontual ou em andamento (nota prévia), com documentação bibliográfica e metodologia completas, como um artigo científico regular. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Corpo do trabalho sem divisão de tópicos, porém seguindo a seqüência

– introdução, metodologia, resultados (podem ser incluídas tabelas e figuras), discussão, conclusão e referências bibliográficas. **Relato de caso**

Descrição sucinta de casos clínicos e patológicos, achados inéditos, descrição de novas espécies e estudos de ocorrência ou incidência de pragas, microrganismos ou parasitas de interesse agrônomo, zootécnico ou veterinário. Deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Introdução com revisão da literatura; Relato do (s) caso (s), incluindo resultados, discussão e conclusão; Referências Bibliográficas.

Artigo de revisão bibliográfica

Deve envolver temas relevantes dentro do escopo da revista. O número de artigos de revisão por fascículo é limitado e os colaboradores poderão ser convidados a apresentar artigos de interesse da revista. No caso de envio espontâneo do autor (es), é necessária a inclusão de resultados próprios ou do grupo envolvido no artigo, com referências bibliográficas, demonstrando experiência e conhecimento sobre o tema.

O artigo de revisão deverá conter os seguintes tópicos: Título (português e inglês); Resumo com Palavras-chave; Abstract com Key-words; Desenvolvimento do tema proposto (com subdivisões em tópicos ou não); Conclusão; Agradecimentos (se for o caso) e Referências Bibliográficas.

Outras informações importantes

é O autor principal deverá enviar, junto com o original, autorização para publicação do trabalho na Semina Ciências Agrárias, comprometendo-se a não o publicar em outro periódico.

é A publicação dos trabalhos depende de pareceres favoráveis da assessoria científica “*Ad hoc*” e da aprovação do Comitê Editorial da Semina Ciências Agrárias, UEL.

é Não serão fornecidas separatas aos autores, uma vez que os fascículos estarão disponíveis no endereço eletrônico da revista (<http://www.uel.br/proppg/semina>).

é Os trabalhos não aprovados para publicação serão devolvidos ao autor.

é Transferência de direitos autorais: Os autores concordam com a transferência dos direitos de publicação do referido artigo para a revista. A reprodução de artigos somente é permitida com a citação da fonte e é proibido o uso comercial das informações.

é As questões e problemas não previstos na presente norma serão dirimidos pelo Comitê Editorial da área para a qual foi submetido o artigo para publicação.

é Os trabalhos devem ser enviados para:

Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
 Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias
 Campus Universitário - Caixa Postal 6001
 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.
 Informações: Fone: 0xx43 33714709
 Fax: 0xx43 33714714
 E-mails: vidotto@uel.br; csvjneve@uel.br

Conselho Editorial das revistas Semina
 Campus Universitário - Caixa Postal 6001
 86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.
 Informações: Fone: 0xx43 33714105
 Fax: 0xx43 3328 4320
 E-mail: eglema@uel.br
 Home page: www.uel.br

Editorial rules for publication in Semina: Ciências Agrárias, UEL

The journal *Semina: Ciências Agrárias* is published each trimester to divulge scientific knowledge of the Agricultural Science Center of the Universidade Estadual de Londrina. The objectives of the Journal are to publish articles, short communications, case reports, and reviews related to the Agronomic Sciences, Science and Technology of Nutrition, Veterinary Medicine, Animal Science, and related areas.

Category of manuscripts

1. Scientific article: maximum of 25 pages, including figures, tables and references;
2. Scientific communications: maximum of 12 pages, references restricted to 16 citations, two tables or two figures, or one table and one figure;
3. Case reports: maximum of 10 pages, references restricted to 12 citations, two tables or two figures, or one table and one figure;
4. Review article: maximum of 35 pages, including figures, tables and references.

Submission of manuscripts

Original scientific articles, communications, case reports, and reviews can be written in Portuguese, English and Spanish. Three copies must be submitted typewritten in A4 paper using double spacing, prepared in Word for Windows text editor, with Times New Roman 12 Size typesetting, left and right margins of 2.5 cm, superior and inferior margins of 2 cm, and with consecutively numbered pages according to the type of paper. Figures (designs, graphs, and photographs) and tables must be numbered in Arabic typesetting and separated at the end of the manuscript. Figures and tables must be 8 or 16 cm wide and a maximum of 22 cm tall; when larger dimensions are submitted due to necessity, these will be reduced due to the aforementioned dimensions. Tables and figure must be placed in separate pages following the numeric order cited within the manuscript. Photographs must be identified on the reverse, while designs and graphs on the bottom corner with their respective text numbers and the name of the first author. When necessary, the superior part of the figure must be indicated to facilitate correct placement within the text.

Manuscript preparation

Scientific article

Must describe results of original research in related areas with the following organization of topics: Title, in Portuguese and

English; Abstract with key words (maximum of six); Introduction; Materials and Methods; Results and Discussion, with the conclusions at the end, or Results, Discussion and Conclusions separately; Acknowledgements; Suppliers, when necessary; and References. The topics must be written in large and small letters, and bold typesetting without numbers. When

there is the necessity to have sub items within the topics, these must be presented in Arabic numbers. The manuscript submitted for consideration must not be published in the in another Journal.

The first page of the manuscript must have the following information:

1. *Article title*: the article with the corresponding translation to Portuguese, must be brief, and adequately specific and descriptive, with terms that permit the reader to have an idea of the content;

2. *Names of authors*: full name(s) must be provided and separated by semicolon just below the title. The institution, financial agency, and identification of the authors must be provided by insertion of numeric footnotes at the end of the title and the given names. The address of the corresponding author must be highlighted by an asterisk and be complete with telephone and fax numbers and e-mail.

With effect from the second page of the paper, the manuscript must be written in the following order:

1. *Title of manuscript*: with a corresponding translation in Portuguese.

2. *Abstract and Key-words*: must be informative, consist of 150 and 300 words and be translated to Portuguese (Resumo e Palavras-chave).

3. *Introduction*: must be concise and have a review to introduce the topic and support the methodology and discussion.

4. *Materials and methods*: may be in the descriptive continuous pattern or with sub items, in order to permit understanding and reproduction of the described methodology with or without the help of bibliographic references.

5. *Results and discussion with conclusions or Results, Discussion and Conclusions*: using the chosen pattern, these parts must be clear, with the help of tables, graphs, and figures, so that the reader should have no doubts relative to the authenticity of the results, topics discusses and suggested conclusions.

6. *Acknowledgements*: persons, institutions or firms that contributed to the realization of the manuscript must be mentioned at the end of the text and before the bibliographic references.

Observations:

When pertinent, before the references, it should be informed that the research was approved by the bioethics committee and was realized in accordance to technical standards of biosecurity and ethics.

Footnotes: must be indicated by a subscript symbol immediately after the respective sentence with footnotes at the end of the page.

Figures: when indispensable will be accepted and must be mentioned within the text by a number in Arabic numerals. If the illustrations submitted were already published, the permission for reproduction and source must be informed.

Tables: must have a title that permit the understanding of the meaning of the information, without consultation of the text.

Units and symbols: must follow the national standards (ABNT) in vigor.

7. *Citations in the text*: must be in the alphabet system with large letters followed by year of publication as in the following examples:

The results of DUBEY (2001) confirmed that the ...

According to SANTOS et al. (1990), the effect of nitrogen Beloti et al.

(1999b) evaluated the microbiological quality

..... and inhibits the test of syncytial formation (BRUCK et al., 1992).

..... affecting the quality of the derivatives (AFONSO; VIANNI, 1995).

8. *Bibliographic references*: must be in accordance with the standards NBR 6023, Aug 2000 of ABNT, and must be listed in alphabetical order at the end of the paper. All participating authors must be mentioned, irrespective of the number of participants (only exemption of the standard – item 8.1.1.2). The exactitude of the references consulted and mentioned in the manuscript, as well as the opinions and affirmations are the complete responsibility of the authors.

Other categories of manuscripts (Scientific communications, Case reports, and Reviews) must follow the above mentioned rules, but with the following additional orientations for each case:

Scientific communications

Is a concise form, but with complete description, of the intentional or ongoing research (Note), with bibliographic documentation and complete methodology, as in normal scientific manuscript. It must have the following topics: Title (English and Portuguese); Abstract with key words; the rest of the manuscript with division in topics, but following this sequence – introduction, methodology, results (tables and figures can be included), discussion, conclusion, and references.

Review article

A review must involve topics that are relevant to the scope of the Journal. The number of review manuscripts in each fascicule is limited and authors may be invited to submit reviews of interest to the Journal. In case of spontaneous submissions, it is necessary to include results of the authors or the group involved, with bibliographic references, demonstrating experience and knowledge of the topic.

The review article must have the following topics: Title (English and Portuguese); Abstract with key words (with the corresponding in Portuguese); development of the proposed topic (with or without subdivisions in topics); Conclusions; Acknowledgements (if necessary); and References.

Other important information

1. The principal author must submit with a copy of the original manuscript, authorization to publish the paper in *Semina Ciências Agrárias*, agreeing not to publish same in another Journal.
2. The publication of articles is dependent on favorable approbations by the “Ad hoc” scientific committee and the Editorial Committee of *Semina Ciências Agrárias*, UEL.
3. Offprints will not be supplied to the authors, since the fascicules will be available online at the electronic address of the Journal (<http://www.uel.br/proppg/semina>).
4. Manuscripts not approved for publication will be returned to the author.
5. Transfer of copyrights: The authors agree with the transfer of the rights of publication of the articles for the Journal. The reproduction of articles is only allowed with the citation of the source and it is prohibited the commercial use of the information.
6. Problems and doubts not cared within this regulation will be dealt by the Editorial Committee from the area to which the manuscript was submitted.
7. Manuscripts must be submitted to:

Universidade Estadual de Londrina
Centro de Ciências Agrárias
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva
Comitê Editorial da Semina: Ciências Agrárias
Campus Universitário - Caixa Postal 6001
86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.
Informações: Fone: 0xx43 33714709
Fax: 0xx43 33714714
E-mails: vidotto@uel.br; csvjneve@uel.br

or

Universidade Estadual de Londrina
Coordenadoria de Pesquisa e Pós-graduação
Conselho Editorial das revistas Semina
Campus Universitário - Caixa Postal 6001
86051-990, Londrina, Paraná, Brasil.
Informações: Fone: 0xx43 33714105
Fax: 0xx43 3328 4320
E-mail: eglema@uel.br
Home page: www.uel.br