

Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros



República Federativa do Brasil

Fernando Henrique Cardoso
Presidente

Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

Marcus Vinicius Pratini de Moraes
Ministro

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Conselho de Administração

Marcio Fortes de Almeida

Presidente

Alberto Duque Portugal

Vice-Presidente

José Honório Accarini

Sergio Fausto

Dietrich Gerhard Quast

Urbano Campos Ribeiral

Membros

Diretoria-Executiva da Embrapa

Alberto Duque Portugal

Diretor-Presidente

Bonifácio Hideyuki Nakasu

Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Diretores-Executivos

Embrapa Pantanal

Emiko Kawakami de Resende

Chefe-Geral

José Anibal Comastri Filho

Chefe-Adjunto de Administração

Aiesca Oliveira Pellegrin

Chefe-Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento

José Robson Bezerra Sereno

Gerente da Área de Comunicação e Negócios



ISSN 1517-1981
Dezembro, 2002

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Documentos 36

**Aplicação da biologia molecular
em programas de conservação
de recursos pesqueiros**

Débora Karla Silvestre Marques

Corumbá, MS
2002

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pantanal

Rua 21 de Setembro, nº1880, Caixa Postal 109

Corumbá, MS, CEP 79.320-900

Fone: (67) 233-2430

Fax: (67) 233-1011

Home page: www.cpap.embrapa.br

Email: sac@cpap.embrapa.br

Comitê de Publicações da Unidade:

Presidente: Aiesca Oliveira Pellegrin

Secretário-Executivo: Marco Aurélio Rotta

Membros: Balbina Maria Araújo Soriano

Evaldo Luis Cardoso

José Robson Bezerra Sereno

Secretária: Regina Célia Rachel dos Santos

Supervisor editorial: Marco Aurélio Rotta

Revisora de texto: Mirane Santos da Costa

Normalização bibliográfica: Romero de Amorim

Tratamento de ilustrações: Regina Célia Rachel dos Santos

Foto da capa: Agostinho Carlos Catella e Débora Karla S. Marques

Editoração eletrônica: Regina Célia Rachel dos Santos

1ª edição

1ª impressão (2002): formato digital

Todos os direitos reservados.

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pantanal

Marques, Débora Karla Silvestre.

Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros / Débora Karla Silvestre Marques. - Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002.

22 p. (Embrapa Pantanal. Documentos, 36)

1. Marcadores moleculares. 2. Peixe - Biologia molecular. 3. Recursos pesqueiros – Conservação I. Embrapa Pantanal. II. Título. III. Série

CDD:

639.4098172

©Embrapa 2002

Autores

Débora Karla Silvestre Marques

Mestre em Ciências Biológicas

Embrapa Pantanal

Rua 21 de setembro, 1880, Caixa Postal 109

CEP 79320-900, Corumbá, MS

Telefone (67) 233-2430

marques@cpap.embrapa.br

Apresentação

Este trabalho fez uma revisão sobre os métodos moleculares aplicáveis a proporções de conservação pertinente para uma das maiores áreas inundáveis de água doce do mundo. Os recursos pesqueiros do Pantanal são a base da segunda atividade econômica da região, particularmente relacionada à pesca esportiva e à aplicação dos métodos moleculares na caracterização e identificação das populações de peixes podem fornecer informações valiosas para o manejo sustentável desses recursos para o Pantanal.

Emiko Kawakami de Resende
Chefe Geral da Embrapa Pantanal

Sumário

Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros.....	9
Introdução.....	9
Estudos genéticos em peixes	10
Marcadores moleculares.....	11
Eletroforese de proteínas	12
Seqüências de DNA como marcadores.....	13
Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)	14
Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified polymorphic DNA - RAPD).....	15
DNA com seqüências repetitivas: micro-satélites e mini-satélites	16
DNA mitocondrial	17
Considerações finais	18
Referências Bibliográficas.....	19

Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros

Débora Karla Silvestre Marques

Introdução

As pesquisas em genética de populações de peixes têm contribuído grandemente para elucidação de questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, de sua origem e características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural e eventos históricos (Parker *et al.*, 1998; Sunnucks, 2000). Esses estudos são de considerável importância quando se pensa em elaboração de projetos visando a conservação de recursos naturais, levando ao enfoque no papel desempenhado pelas variações ao nível do genoma em resposta às mudanças ambientais, particularmente àquelas de origem antropogênica.

Considerando as características biológicas dos peixes, a grande diversidade da ictiofauna neotropical e a importância da pesca em diversas regiões do mundo, a utilização de marcadores genéticos pode auxiliar os programas de conservação de recursos pesqueiros. O monitoramento regular das variações genéticas nos estoques pesqueiros faz-se necessário nos programas de

conservação, a fim de evitar o declínio da variabilidade genética (Ward & Grewe, 1995).

Nesse contexto, surgiu a expressão biodiversidade, trazendo desde sua origem a idéia do conjunto de variabilidade ecológica, representada pelo número de espécies de uma comunidade e suas interações, e de variabilidade genética, onde o enfoque é a diversidade de alelos nos vários locos de uma espécie (Solé-Cava, 2001). Biodiversidade representa, então, um parâmetro necessário à manutenção do equilíbrio ambiental e ao desenvolvimento sustentável daquelas atividades ligadas diretamente aos recursos naturais.

A biologia molecular tem sido a ferramenta escolhida para os estudos de genética de populações e que tem acumulado avanços importantes, gerando técnicas cada vez mais precisas para o exame de segmentos de DNA, em adição à descoberta de variados marcadores moleculares aplicáveis aos mais diversos problemas encontrados no estudo de populações e às análises estatísticas que permitem desde a estimativa do grau de variabilidade genética de uma dada população à construção de árvores filogenéticas, relacionando espécies próximas e elucidando questões de parentesco.

O objetivo desta revisão de literatura é descrever de forma sucinta algumas possibilidades de uso de técnicas em biologia molecular no estudo de populações e de conservação de peixes.

Estudos genéticos em peixes

A ictiofauna neotropical é, em biodiversidade, a mais rica do mundo. Segundo Lowe-MacConnell (1987) os grupos de peixes encontrados nessa região são em sua maioria Characiformes e Siluriformes, que evidenciam uma notável radiação adaptativa iniciada durante o isolamento da América do Sul no Terciário. Entretanto, apesar do muito que se sabe atualmente sobre as relações evolutivas e história dos diversos grupos de peixes neotropicais, Britski (1992) ressalta que o conhecimento da taxonomia de grande número de peixes neotropicais de água doce necessita de maiores informações para permitir uma inferência segura das relações filogenéticas.

Nesse contexto, a citogenética de peixes neotropicais tem contribuído na separação de espécies próximas e, muitas vezes, na elucidação da história evolutiva de espécies e populações. A citogenética, portanto, tem auxiliado na compreensão das relações de parentesco entre ou dentro de diferentes ordens, famílias ou gêneros de uma mesma espécie, como em Anostomidae e

Chilodontidae (Martins *et al.*, 2000), *Hemigrammus* (Scheel, 1973), *Bryconamericus* (Wasko & Galetti Jr, 1998).

Muitas vezes, entretanto, os estudos citogenéticos não são suficientemente eficazes na elucidação de questões evolutivas de espécies e populações de peixes. Assim, os marcadores moleculares são ferramentas indispensáveis onde a identificação de espécies com base em características morfológicas e citogenéticas é impossível, bem como na separação de populações próximas geograficamente.

Portanto, é evidente a utilidade cada vez maior dos estudos com marcadores moleculares acerca dos grupos taxonômicos e populações de peixes. Sua importância abrange desde as questões evolutivas até a elaboração de programas de manejo para uso em conservação e auxiliando também no planejamento do manejo adequado dos estoques cultivados em piscicultura. Neste último, os marcadores moleculares são ferramentas amplamente utilizadas na seleção de linhagens e programas de melhoramento de características tais como crescimento e ganho de peso.

Marcadores moleculares

Trabalhar com marcadores genéticos significa utilizar características herdáveis em indivíduos de uma dada população, considerando que todos os marcadores refletem diferenças nas seqüências de DNA (Sunnuck, 2000). As principais características dos marcadores moleculares utilizados em estudos de populações encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos diversos marcadores moleculares em aplicações em estudos de populações de peixes.

Características	Proteínas	RFLP	RAPD	VNTRs
Material utilizado	As diversas formas de uma mesma proteína	DNA nuclear e DNA de organelas	DNA nuclear e DNA de organelas	DNA nuclear
Expressão genética	Co-dominante	Co-dominante	Dominante	Co-dominante
Base técnica	Formas alternativas das proteínas estudadas espelhando as variações genéticas	Fragmentos de restrição de DNA detectado por hibridização com sonda de DNA genômico ou cDNA	Polimorfismo de tamanho de segmentos de DNA amplificados arbitrariamente	Aplicação específica de região contendo seqüência repetitiva

Os marcadores unilocus são caracteristicamente co-dominantes, ou seja, em um indivíduo diplóide, ambos os alelos de um determinado locus são identificados, o que os torna altamente informativos. São marcadores unilocus os RFLP e as seqüências de DNA repetitivo mini-satélites e micro-satélites. Os marcadores multilocus permitem a visualização de muitos genes anônimos simultaneamente. Entretanto, sua característica dominante, onde somente um dos alelos é identificado, torna-os pouco informativos. No entanto, esses marcadores, tais como RAPD e AFLP, são largamente utilizados em estudos populacionais, pois, com base em eventos recentes, permitem a inferência de relações de parentesco entre indivíduos de uma dada população e da história de divergência entre populações de uma mesma espécie (Tabela 2).

Eletoforese de proteínas

Os estudos moleculares acerca das variações genéticas nas diversas espécies tiveram início com o desenvolvimento da eletroforese, nos anos 50, quando poucas marcas uni-locus foram descobertas (Parker *et al.*, 1998). Sua base está na migração diferenciada de moléculas com cargas diferentes quando submetidas a um campo elétrico. As pesquisas nesse campo fundamentam-se nas múltiplas formas moleculares (alélicas) da mesma enzima (isoenzimas) que ocorrem em uma espécie e que desempenham, portanto, a mesma atividade catalítica, mas que podem ter diferentes propriedades cinéticas (Ferreira & Grattapaglia, 1995). Podendo-se inferir que as diferenças apresentadas entre as isoenzimas são resultados de diferenças ao nível das seqüências de DNA que as codificam.

Para realizar a eletroforese de proteínas, o tecido deve ser homogeneizado em tampão específico para extração de enzimas, algumas vezes incluindo ingredientes para anular substâncias ligantes às proteínas (Parkers *et al.*, 1998) e aplicado a um gel, onde as enzimas serão separadas por tamanho, forma e carga ao longo de um gradiente elétrico.

Uma das vantagens técnicas deste marcador é a expressão co-dominante das bandas geradas em gel de eletroforese. Para interpretação do padrão de bandas é necessário o conhecimento da estrutura quaternária da enzima. Assim, uma enzima monomérica (constituída por uma única cadeia polipeptídica) apresentará duas bandas no heterozigoto, uma enzima dimérica (formada pela união de duas cadeias polipeptídicas) apresentará três bandas

no heterozigoto e uma enzima tetramérica apresentará cinco (Solferini & Scheepmarker, 2001).

As isoenzimas têm sido usadas em pesquisas de biologia evolutiva principalmente através do estudo detalhado de um loco e as suas variantes alélicas (alozimas) e a utilização de muitos locos para estudos populacionais, lembrando, entretanto, que mutações no material genético nem sempre levam a alterações na estrutura protéica e nem toda alteração na seqüência de aminoácidos provoca diferenças na mobilidade eletroforética, os níveis de variabilidade podem ser subestimados (Solferini & Scheepmarker, 2001). Toledo Filho *et al.* (1992) consideram que a eletroforese de proteínas é a mais aconselhada para o monitoramento de estoques de peixes em projetos de repovoamento por ainda constituir uma das técnicas mais eficientes para a análise genética de populações de peixes. As proteínas também têm sido utilizadas em estudos de filogenia (Tringali *et al.* (1999) e variabilidade de populações de peixes (Calcagnotto & Toledo-Filho (2000).

Entretanto, Sunnucks (2000) considera que este marcador molecular revela pequenas variações e gera informações genealógicas limitadas. O autor ressalta, portanto, as vantagens do uso de DNA para estudos em populações.

Seqüências de DNA como marcadores

Ao contrário de marcadores enzimáticos, o DNA pode ser extraído de tecidos fixados por tempo ilimitado e permite a visualização direta das variações ocorridas no genoma individual. Outra vantagem surgiu com o uso da reação em cadeia da enzima polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) permitindo a amplificação *in vitro* de ácidos nucléicos, resolvendo os problemas relacionados à quantidade de DNA a ser utilizado nas reações em laboratório.

A concepção inicial da técnica da PCR foi de Kary Mullis, um bioquímico que trabalhava com síntese química de oligonucleotídeos em uma firma biotecnológica da Califórnia, a Cetus Corporation (Matioli & Passos-Bueno, 2001) e consiste, basicamente, na repetição *in vitro* dos ciclos de duplicação da fita de DNA, já conhecidos através dos estudos de biologia molecular.

A reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) possibilita a amplificação exponencial de segmentos de DNA flanqueados por

seqüências iniciadoras (primers). A técnica consiste em submeter um “mix” de “primers”, tampões, nucleotídeos, enzima polimerase e o DNA de interesse a uma seqüência de cerca de 35 ciclos de variações de temperatura ótima para o pareamento dos primers (variando conforme a seqüência e o tamanho do primer utilizado) e para a extensão do segmento a ser amplificado. Os produtos da amplificação podem ser visualizados diretamente em gel de agarose ou poliacrilamida.

Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição (Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP)

Nesta técnica, as variações (polimorfismos) apresentadas são baseadas na aceitação de que o sítio de corte de uma mesma enzima encontra-se em diferentes pontos do DNA de indivíduos diferentes. Assim, não é necessário o conhecimento prévio das seqüências de DNA a serem utilizadas e isto constitui uma das vantagens observadas neste método. As variações são explicadas pela diferença entre os tamanhos dos fragmentos gerados pela digestão com enzimas escolhidas pela especificidade dos seus sítios de corte (chamadas enzimas de restrição). Se há a segregação Mendeliana de tais fragmentos, conclui-se que elas representam um loco de RFLP e, portanto, podem ser utilizadas como marcador genético (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

Resumidamente, a técnica consiste em submeter o DNA de interesse à ação de enzimas de restrição, gerando fragmentos de diversos tamanhos que são separados em gel de agarose por eletroforese. Os fragmentos separados são transferidos para uma membrana de nylon ou nitrocelulose - “Southern Blot” (Southern, 1975), onde é realizada a hibridização de sondas radioativas e exposição em filme de raio X para visualização do padrão de distribuição das bandas geradas pela complementariedade entre as sondas e determinadas seqüências do DNA digerido.

Uma característica importante do marcador RFLP é sua expressão co-dominante, que o torna vantajoso para estudos de segregação alélica, estimativa da variabilidade genética populacional e geração de árvores filogenéticas.

O uso mais amplo das enzimas de restrição nos estudos de população tem sido o estudo da diversidade alélica e diferenciação de populações em DNA mitocondrial, onde a frequência alélica pode ser quantificada pela presença ou ausência de sítios de restrição entre os indivíduos (Parker *et al.*, 1998). Os

autores explicam que grandes moléculas como DNA nuclear não podem ser analisadas pelo uso direto de enzimas de restrição devido à grande quantidade de sítios de clivagem enzimática, gerando padrões de bandas de difícil interpretação. Este problema é solucionado com o uso da técnica de hibridização em membrana, após eletroforese, com sondas que consistem de seqüências complementares aos segmentos de interesse.

RFLP tem sido aplicado com sucesso em estudos de populações de peixes, na determinação de variações genéticas (O'Connell *et al.*, 1995; Wolf *te al.*, 2000), avaliação de impacto da introdução de indivíduos de cativeiro em populações selvagens (Ferguson *et al.*, 1995; Clifford *et al.*, 1998) e filogenia (Michael & Phillips, 1995).

Como desvantagem do uso do RFLP pode-se citar: (1) a necessidade de grandes quantidades de DNA, uma vez que esta técnica não utiliza a PCR; (2) os gastos em termos de tempo e dinheiro no procedimento de hibridização em membrana (Southern Blot Hybridization).

Polimorfismo de DNA amplificado ao acaso (Randomly Amplified polymorphic DNA - RAPD)

No uso da técnica RAPD é desnecessário o conhecimento prévio da seqüência do DNA, uma vez que as variações genômicas detectadas por este método baseia-se na diferença entre indivíduos da distribuição dos sítios complementares a um primer curto (10 bases), de seqüência aleatória. Utilizando-se um único primer por reação, observa-se a geração de numerosos segmentos amplificados, cujas seqüências são desconhecidas e os tamanhos são variados. Assim, assume-se que diferentes indivíduos produzem distintos padrões de fragmentos amplificados com base nas diferentes localizações dos sítios de anelamento dos primers ao longo da fita de DNA. As amplificações resultantes são visualizadas diretamente em gel de agarose ou poliacrilamida, com uso direto de corantes como brometo de etídeo, e cada banda tem caráter dominante. Portanto, não é possível detectar alelos. As análises são feitas considerando a distribuição presença/ausência das bandas geradas pela reação de amplificação.

Este marcador é aplicável em estudos de populações de peixes para estimativa de variabilidade e similaridade entre populações, possibilitando a inferência da história recente de determinadas populações.

Os marcadores RAPD são eficientes na discriminação de espécies onde a identificação por características morfológicas tem se mostrado limitada, como por exemplo em peixes do gênero *Barbus* (Callejas & Ochando, 1998). Além do uso clássico na estimativa de similaridade genética entre populações, os marcadores RAPD foram utilizados com sucesso em grande número de pesquisas na obtenção de padrões espécie específicos em peixes (Dinesh et al., 1993, Takagi & Taniguchi, 1995 e Callejas & Ochando, 1998) e na estimativa de relações filogenéticas entre espécies e subespécies (Bardakci & Skibinski, 1994, Callejas & Ochando, 1998).

De uma forma geral, entre as vantagens da RAPD está a possibilidade de detecção de polimorfismos sem a necessidade de conhecimento prévio das seqüências utilizadas, a visualização direta em gel e a utilização de quantidades pequenas de DNA.

A principal limitação dos marcadores de RAPD é o baixo conteúdo de informação genética por loco, pelo fato de ser dominante e, portanto, permitir a detecção de genótipos heterozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

DNA com seqüências repetitivas: micro-satélites e mini-satélites

No genoma de diversas espécies ocorrem seqüências repetitivas organizadas em tandem cujos tamanhos podem variar. São chamados VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) e representam loci individuais onde alelos são compostos por repetições em tandem que variam no número de unidades do cerne (Nakamura *et al.*, 1987).

O DNA satélite foi primeiro identificado na década de 60, quando DNA centrifugado sob certas condições foi separado em duas ou mais camadas: uma banda média contendo genes e bandas secundárias que tornaram-se conhecidas como bandas satélites, onde foram encontradas as seqüências de DNA repetitivo (Moxon & Wills, 1999). Quando os blocos de DNA repetitivo são compostos por 10 a 64 pares de bases, cujo tamanho total varia de 0,1 a 7,0 Kb, estas seqüências são denominadas mini-satélites (Jeffreys *et al.*, 1985). As seqüências denominadas DNA micro-satélite têm unidades de repetição de 1 a 5 nucleotídeos (Schlötterer & Pemberton, 1998). Estes marcadores, também chamados "simple sequence repeats (SSRs)", são hipervariáveis, co-dominantes e revelam variações de comprimento entre os alelos (Parker *et al.*, 1998; Sunnucks, 2000).

Sondas baseadas em VNTRs podem detectar simultaneamente grande quantidade de loci hipervariáveis, fornecendo um padrão "fingerprint" utilizável para identificação de indivíduos, testes de paternidade e mapeamento genético (Jeffreys *et al.*, 1985; Nakamura *et al.*, 1987). Em estudos de populações, o uso de VNTRs é considerado um dos métodos mais efetivos para avaliar o nível de variabilidade genética em casos de reduções do número de alelos e de heterozigosidade (Ferguson *et al.*, 1995).

A metodologia de utilização de micro-satélites baseia-se na amplificação (por PCR) das seqüências simples repetidas utilizando-se um par de primers de seqüências complementares àquelas que as flanqueiam.

Tendo em vista a expressão co-dominante e o multialelismo, os marcadores micro-satélites são os que possuem o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo, ideais para mapeamento genético e físico de genomas, identificação e discriminação de genótipos e estudos de genética de populações (Ferreira & Grattapaglia, 1995).

O fator limitante para o emprego de micro-satélites é a disponibilidade de informações em termos das seqüências de nucleotídeos das regiões de repetições no genoma do organismo que se deseja estudar, sendo necessária a construção de uma biblioteca genômica do organismo em questão (Matioli & Passos-Bueno, 2001).

Os mini-satélites têm sido marcadores muito eficientes na identificação dos estoques pesqueiros (Beacham *et al.*, 1996; Angers *et al.*, 1995; Galvin *et al.*, 1995; Tessier *et al.*, 1995) e vários micro-satélites têm sido isolados e caracterizados a partir de DNA de algumas espécies de peixes, principalmente em salmonídeos (Estoup *et al.*, 1993; Pfeiffer *et al.*, 1997; Banks *et al.*, 1999).

DNA mitocondrial

Células de eucariotos apresentam DNA nuclear e DNA de organelas, tais como mitocôndrias em animais e cloroplastos em plantas denominados "genomas extranucleares" (Zaha *et al.*, 1996). O DNA de organelas apresenta fita dupla circular. O DNA de cloroplastos e mitocondrial são moléculas pequenas, apresentando cerca de 120-220 kb e 15-17 kb, respectivamente (Brown *et al.*, 1979; Palmer, 1985 e 1987, Parker *et al.*, 1998).

O DNA mitocondrial animal codifica aproximadamente 5% de toda maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria, onde são

descritos 37 genes, dos quais 13 codificam RNAs mensageiros para proteínas envolvidas diretamente no processo de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, dois para subunidades ribossômicas e 22 para RNAs transportadores e há uma região não codificadora conhecida como A+T nos invertebrados e como D-loop nos vertebrados, que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma (Arias & Infante-Malachias, 2001). Ao contrário do DNA nuclear de herança biparental, o DNA de organelas encontra-se no citoplasma e, portanto, apresenta herança uniparental. Suas seqüências são extremamente conservadas. Assim, comparações de genótipos nucleares e mitocondriais podem ajudar a reconhecer indivíduos híbridos, acasalamentos preferenciais e efeitos estocásticos sobre variantes para as quais o taxa ancestral foi polimórfico, podendo-se gerar árvores filogenéticas (Sunnukcs, 2000).

Segundo Pereira (2000), o DNA mitocondrial de vários vertebrados tem sido amplamente utilizado para estudos de população. O autor também explica que a região controle do genoma mitocondrial é freqüentemente usada em estudos de populações devido à alta variabilidade em suas seqüências de nucleotídeos, cujos genes codificantes de proteínas tais como citocromo b (Cyt b), são geralmente usados para análises filogenéticas.

Regiões de DNA mitocondrial animal podem exibir considerável variação intra e entre populações (Parker *et al.*, 1998). Assim, o DNA mitocondrial foi usado com sucesso nos estudos realizados em diversas espécies de peixes, tais como no gênero *Salmo* (Ferguson *et al.*, 1995), em estudos de filogenia de peixes (Morita, 1999; Harris & Mayden, 2001; Nagl *et al.*, 2001; Perdices *et al.*, 2002; Obermiller & Pfeiler, 2003), assim como em estudos de estrutura de população (Chenoweth & Hughes, 1997) e de impacto da introdução de indivíduos cultivados em populações selvagens (Clifford *et al.*, 1998).

Considerações finais

Os estudos voltados para conservação de populações ou espécies de importância econômica ou em risco de extinção fornecem dados que constituem uma base essencial na tomada de medidas de manejo de populações selvagens ou cultivadas. A concatenação das diversas áreas de estudos populacionais, tais como biologia, ecologia e genética é uma tendência atual. Nesta última, o desenvolvimento de técnicas que possibilitam a detecção da evolução de diferentes genótipos enriqueceu a gama de ferramentas utilizáveis no suprimento de necessidades tais como

identificação de indivíduos e estimativa do grau de parentesco entre eles, a delimitação de populações de interesse, estimativa do grau de variabilidade das mesmas, bem como de sua história recente, e estimativa do grau de similaridade entre populações e espécies, com a construção de árvores filogenéticas.

Todos estes parâmetros compõem a biodiversidade, que é assumida ser essencial para o equilíbrio ambiental e que tem sido objeto de extensas discussões e debates em âmbito internacional.

No que diz respeito aos recursos pesqueiros, a preocupação em adquirir conhecimentos das características populacionais acessíveis pelos métodos de estudos genéticos está ligada tanto às necessidades ecológicas de conservação ambiental quanto ao aumento da demanda de alimentos como resultado do crescimento populacional humano. As alterações ambientais causadas pela presença humana e a exploração excessiva dos estoques pesqueiros têm levado a respostas como modificações nos padrões populacionais de várias espécies de peixes. Essas respostas são espelhadas em características essenciais como tamanho da população, reprodução, crescimento, alimentação e migração.

Com os conhecimentos adquiridos a partir das pesquisas acerca dos diversos aspectos genéticos dos estoques pesqueiros, espera-se poder embasar com segurança as normas de exploração dos mesmos, nos permitindo levantar propostas de manejo para manutenção ou recuperação de diversas espécies na natureza, avaliar impactos de atividades antrópicas tais como a exploração excessiva de recursos naturais e a introdução de espécies exóticas ou a existência de híbridos dentro de espécies protegidas.

Referências Bibliográficas

ANGERS, B. ; BERNATCHEZ, L. ; ANGERS, A. ; DESGROSEILLERS, L. Specific microsatellite loci for brook charr reveal strong population subdivision on a microgeographic scale. **Journal of Fish Biology**, London, v.47. p.177-185, 1995.

AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511 p.

ARIAS, M.C.; INFANTE-MALACHIAS, M.E. RFLP: O emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

BANKS, M.A.; BLOUIN, M.S.; BALDWIN, B.A.; RASHBROOK, V.K.; FITZGERALD, H.A.; BLANKENSHIP, S.M.; HEDGECOCK, D. Isolation and

inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). **Journal of Heredity**, Washington, v.90, n.2, p.281-288, 1999.

BARDAKCI, F.; SKIBINSKI, D.O. Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. **Heredity**, Edinburg, v.73, p.117-123, 1994.

BEACHAM, T.D.; MILLER, K.M.; WITHLER, R.E. Minisatellite DNA variation and stock identification of coho salmon. **Journal of Fish Biology**, London, v.49, n.3, p.411-429. 1996.

BRITSKI, H. Conhecimento atual das relações filogenéticas de peixes neotropicais. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, 9., 1992, Maringá. **Documentos...** Maringá: UEM, 1992. p.42-57.

CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-FILHO, S. de A. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.1, p.127-130, 2000.

CALLEJAS, C.; OCHANDO, M.D. Identification of Spanish barbel species using the RAPD technique. **Journal of Fish Biology**, London, v.53. p.208-215, 1998.

CHENOWETH, S.F.; HUGHES, J.M. Genetic population structure of the catadromous Perciform: *Macquaria novemaculeata* (Percichthyidae). **Journal of Fish Biology**, London, v.50, n.4, p.721-733, 1997.

CLIFFORD, S.L.; MCGINNITY, P.; FERGUSON, A. Genetic changes in na Atlantic salmon population resulting from escaped juvenile farm salmon. **Journal of Fish Biology**, London, v.52, n.1, p.118-127, 1998.

DINESH, K.R.; LIM, T.M.; CHUA, W.K.; PHANG, P.E. RAPD analysis: an efficient method of DNA fingerprint in fishes. **Zoological Science**, Tokyo, v.10, p.849-954, 1993.

ESTOUP, A.; PRESA, P.; KRIEG, F.; VAIMAN, D.; GUYOMARD, R. (CT)_n and (GT)_n microstellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). **Heredity**, Edinburg, v.71, p.488-496, 1993.

FERGUSON, A.; TAGGART, J.B.; PRODOHL, P.A.; MCMEEL, O.; THOMPSON, C.; STONE, C.; MCGINNITY, P.; HYNES, R.A. The application of molecular markers to the study and conservation of fish populations, with special reference to *Salmo*. **Journal of Fish Biology**, London, v.47, suppl. A, p.103-126, 1995.

FERGUSON, A.; MCGINNITY, P.; STONE, C.; CLIFFORD, S.; TAGGART, J.; CROSS, T.; COOKE, D.; BOURKE, E. The genetic impact of escaped farm atlantic salmon on natural populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v.137, n.1-4, p.55-56, 1995.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 1998. 220 p. (EMBRAPA-CENARGEN. Documento 20).

GALVIN, P.; MCKINNELL, S.; TAGGART, J.B.; FERGUNSON, A.; O'FARRELL, M.; CROSS, T.F. Genetic stock identification of Atlantic salmon using single locus minisatellite DNA profiles. **Journal of Fish Biology**, London, v.47, p.186-199, 1995.

HARRIS, P.M.; MAYDEN, R.L. Phylogenetics relationships of major clades of Catostomidae (Teleostei: Cypriniformes) as inferred from mitochondrial SSU and LSU rDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.20, n.2, p.225-237, 2001.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable minisatellite regions in human DNA. **Nature**, London, v.314, p.67-73, 1985.

LOWE-MACCONNELL, R.H. **Ecological studies in tropical fish communities**. Cambridge: Cambridge University press. 382 p. 1987.

MARTINS, C.; VENERE, P.C.; MESTRINER, C.A.; CESTARI, M.M. ; FERREIRA, R.; GALETTI JUNIOR, P.M. Chromosome relationships between Anostomidae and Chilodontidae fish (Characiformes). **Cytologia**, San Francisco, v.65, p.153-160, 2000.

MATIOLI, S.R.; PASSOS-BUENO, M.R. dos S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirao Preto: Holos, 2001. p.153-161.

MICHAEL, D.; PHILLIPS, R. B. Phylogenetic analysis of Pacific salmon (Genus *Oncorhynchus*) based on mitochondrial DNA sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.4, n.4, p.366-371, 1995.

MORITA, T. Molecular phylogenetic relationships of the deep-sea fish genus *Coryphaenoides* (Gadiformes: Macrouridae) based on mitochondrial DNA.

Molecular Phylogenetics and Evolution, San Diego, v.13, n.3, p.447-54, 1999.

MOXON, E.R.; WILLS, C. DNA microsatellites: agents of evolution? **Scientific American**, New York, v.280-1, p.72-77, 1999.

NAKAMURA, Y.; LAPPERT, M.; O'CONNELL, N.; WOLFF, R.; HOLM, M.; CULVER, M.; MARTIN, C.; FUJIMOTO, E.; HOFF, M.; KUMLIM, E.; WHITE, R. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. **Science**, Washington, v.235, p.1616-1622, 1987.

NAGL, S.; TICHY, H.; MAYER, W.E.; SAMONTE, I.E.; McANDREW, B.J.; KLEIN, J. Classification and phylogenetic relationships of african tilapiinae fishes inferred from mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.20, n.3, p.361-374, 2001.

OBERMILLER, L.E.; PFEILER, E. Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.26, n.2, p.202-214, 2003.

O'CONNELL, M.O.; SKIBINSKI, D.O.F.; BEARDMORE, J.A. Genetic variation in stocked populations of Atlantic salmon. **Aquaculture**, Amsterdam, v.137, n.1-4, p.54-55, 1995.

PALMER, J.D. Evolution of chloroplast and mitochondrial DNA in plants and algae. In: MCINTYRE, R.J. **Molecular evolutionary genetics**. New York: Plenum Press, 1985. p.131-240.

PALMER, J.D. Chloroplast DNA evolution and biosystematic uses of chloroplast DNA variation. **American Naturalist**, Chicago, v.130, p.6-29, 1987.

PARKER, P.G.; SNOW, A.A.; SCHUG, M.D.; BOOTON, G.C.; FUERST, P.A. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. **Ecology**, Durham, v.79, n.2, p.361-382, 1998.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.25, n.1, p.172-189, 2002.

PEREIRA, S. Mitochondrial genome organization and vertebrate phylogenetics. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.4, p.745-752, 2000.

PIFFER, A.; OLIVIERI, A.M.; MORGANTE, M. Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* K.). **Genome**, Ottawa, v.40, p.411-419, 1997.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. 202 p.

SCHLÖTTERE, C.; PEMBERTON, J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations – a critical review. In: DESALLE, R.; SCHIERWATER, B. **Molecular approaches to ecology and evolution**. Basel: Birkhäuser Verlag, 1998. p. 71-86.

SCHEEL, J.J. **Fish chromosome and their evolution**. Charlottenlund, Denmark: Internal Report of Denmarks Akvarium, 1973. 22 p.

SOUTHERN, M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, London, v.98, p.503, [197-].

SOLFERINI, V.N.; SCHEEPMACKER, D.S. Polimorfismos de isozimas. In: MATIOLI, S.R. **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.137-142.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p.199-203, 2000.

TAKAGI, M.; TANIGUSHI, N. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) for identification of three species of *Anguilla*, *A. japonica*, *A. australis* and *A. bicolor*. **Fisheries Science**, v.61, n.5, p.884-885, 1995.

TESSIER, N.; BERNATCHEZ, L.; PRESA, P.; ANGERSS, B. Gene diversity analysis of mitochondrial DNA, microsatellites and allozymes in landlocked Atlantic salmon. **Journal of Fish Biology**, London, v.47, p.156-163, 1995.

TOLEDO FILHO, S. de A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F. de; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. **Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios**. São Paulo: USP, 1992. 39 p. (USP. Cadernos de Ictiogenética, 1).

TRINGALI, M.D.; BERT, T.M.; SEYOUM, S.; BERMINGHAM, E.; BARTOLACCI, D. Molecular phylogenetics and ecological diversification of the Transisthmian fish genus *Centropomus* (Perciformes: Centropomidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, San Diego, v.13, n.1, p.193-207, 1999.

WARD, R.D.; GREWE, P.M. Apraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: CARVALHO, G.R.; PITCHER, T.J. **Molecular geneticis in fisheries**. London: Chapman & Hall, 1995. p.29-54.

WASKO, A.P.; GALETTI JUNIOR, P.M. Karyotype diversity in the neotropical fish *Bryconamericus* (Characidae, Tetragonopterinae). **Cytobios**, Cambridge, v.94, p.185-193, 1998.

WOLF, C.; BURGENER, M.; HÜBNER, P.; LÜTHY, J. PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA: differentiation of fish species. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, London, v.33, p.144-150, 2000.

ZAHA, A.; SCHRANK, A.; FERREIRA, H.B.; SCHRANK, I.S.; RODRIGUES, J.J. S.; REGNER, L.P.; PASSAGLIA, L.M.P.; ROSSETTI, M.L.R.; RAUPP, R.M.; SILVA, S.C. da; GAIESKY, V.L.V. **Biologia molecular básica**. Porto Alegre: Mercado Aberto, 1996. 336 p.



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal
Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento*

Rua 21 de setembro, 1880 - Caixa Postal 109

CEP 79320-900 Corumbá-MS

Telefone: (67)233-2430 Fax: (67) 233-1011

<http://www.cpap.embrapa.br>

email: sac@cpap.embrapa.br

**Ministério da Agricultura,
Pecuária e Abastecimento**