

---

**Universidade Federal de São Carlos**

**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**

**Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais**

---

**“Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii*  
(Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu  
significado para programas de conservação”**

**Alexandra Sanches**

**São Carlos**

**- 2007 -**

---

**Universidade Federal de São Carlos**  
**Centro de Ciências Biológicas e da Saúde**  
**Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais**

**“Estrutura genética populacional de *Brycon*  
*hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio  
Miranda, e seu significado para programas de  
conservação”**

**Alexandra Sanches**

**Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

**São Carlos**

**- 2007 -**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

S211eg

Sanches, Alexandra.

Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação / Alexandra Sanches. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

113 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Genética de populações. 2. Brycon. 3. Microsatélite. 4. Genética - conservação. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

Alexandra Sanches

**Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

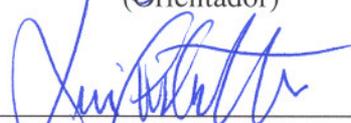
**Aprovada** em 09 de março de 2007

BANCA EXAMINADORA

Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior  
(Orientador)

1º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Luís Antonio Carlos Bertollo  
PPG GEV/UFSCar

2º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Reinaldo Otávio A. Alves Brito  
PPG GEV/UFSCar

3º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko  
UNESP/BOTUCATU-SP

4º Examinador

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Eucléia Primo Betioli Contel  
USP/RIBEIRÃO PRETO-SP

Alexandra Sanches

Pedro Manoel Galetti Junior

A meus pais, João Iginio Sanches  
e Massako Sugai Sanches. Pois,  
"sonho que se sonha só  
é só um sonho que se sonha só;  
mas sonho que se sonha junto é  
realidade" (Raul Seixas)

*Senhor! Fazei de mim um instrumento da vossa paz.  
Onde houver ódio, que eu leve o amor.  
Onde houver ofensa, que eu leve o perdão.  
Onde houver discórdia, que eu leve a união.  
Onde houver dúvidas, que eu leve a fé.  
Onde houver erro, que eu leve a verdade.  
Onde houver desespero, que eu leve a esperança.  
Onde houver tristeza, que eu leve a alegria.  
Onde houver trevas, que eu leve a luz.*

*Ó Mestre, fazei que eu procure mais:  
consolar, que ser consolado;  
compreender, que ser compreendido;  
amar, que ser amado.  
Pois é dando que se recebe.  
É perdoando que se é perdoado.  
E é morrendo que se vive para a vida eterna.*

**Oração de São Francisco de Assis**

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos pela oportunidade para a realização do doutorado.

À FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao IBAMA pelas autorizações concedidas para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior pela confiança, oportunidade, aprendizado, incentivo, paciência e amizade.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique pela autorização para utilização dos equipamentos que estão sob sua responsabilidade.

Ao Dr. Laércio, proprietário da Fazenda Estância dos Rios, assim como a sua família e funcionários pelo apoio, auxílio durante as coletas e amizade.

Ao Dr. José da Mata e família, proprietário da Fazenda Santa Júlia pelo auxílio durante as coletas e pela sincera amizade.

Aos proprietários e funcionários de estabelecimentos turísticos, moradores e amigos da região de Bonito, pelo apoio, interesse e incentivo.

A todos (familiares e amigos) que me auxiliaram incansavelmente na coleta das piraputangas.

A todos os meus amigos de antes ou agora, mas certamente de sempre, que representam sem dúvida nenhuma a minha mais importante conquista.

Ao José Matheus Sanches, onde encontrei força quando precisava, carinho quando necessitava, paciência nas fases mais difíceis, companheirismo em qualquer momento e pelo amor "de graça"... e como se não bastasse por dividir comigo sua maravilhosa e exemplar mamãe (Dona Elizabeth) que me acolheu como uma filha de verdade e enfim a toda a sua família (Marcelão, Junior, Sílvia, Ramon e Lauren) que também se tornou a minha. Ao Sr. Bibiano (*in memoriam*), quem ensinou tão bem o grande valor que existe em uma família.

A meus irmãos, Ádila e Massao, pelo amor e exemplo, e por me darem as mãos desde meus primeiros passos. A meus cunhados, Bia e Ri, por amarem e cuidarem de meus irmãos. A Ádila e Ri por me proporcionarem uma alegria única e indescritível, ao me dar um afilhado abençoado, o Lucca.

Aos meus anjos que cercam a mim e àqueles que eu amo: Camila(s), Bibia, Bruninha, Panqueca e Mel.

A meus pais por ter construído uma base tão sólida sob meus pés. É a eles que devo tudo o que sou e o que tenho. Foram eles que me ensinaram que sou um ser-humano que tem grande capacidade de acertar e errar, pedir perdão e perdoar, mas principalmente que tem uma grande capacidade de amar. E isso é o que temos de mais precioso.

A Deus... o refúgio e fortaleza presente dentro de mim.

## RESUMO

*Brycon hilarii* (subfamília Bryconinae, Characidae), popularmente conhecida como piraputanga, é uma espécie de peixes migradores, distribuída por toda a bacia do Paraguai, bastante apreciada tanto pela qualidade da carne quanto para a pesca, além de ser a principal espécie de interesse turístico da região de Bonito (MS, Brasil). Considerando a escassez de informações sobre a estrutura genética populacional desses peixes, o objetivo do presente estudo foi analisar, através dos marcadores microssatélites, a distribuição da variabilidade genética de *Brycon hilarii* coletados em diferentes locais da sub-Bacia do Rio Miranda (Bacia do Paraguai), região de Bonito (MS). Para tanto, primeiramente foi prospectado um total de sete locos polimórficos (entre di, tri e tetranucleotídeos) que foi capaz de produzir uma considerada variação genética e ainda foi eficaz na amplificação heteróloga em outras cinco espécies do gênero. Na análise populacional de *B. hilarii* as diferentes amostras apresentaram níveis de diversidade genética bastante similares. Foi possível verificar através dos valores de  $F_{ST}$ , dos testes de diferenciação gênica e genotípica e da análise Bayesiana: (1) a existência de pelo menos duas populações genéticas de *Brycon hilarii* coexistindo através da extensão amostrada, a despeito de ser uma espécie potencialmente vágil; (2) somente os peixes provenientes de um cardume reprodutivo mostraram-se geneticamente diferenciados das demais amostras representando uma possível unidade

populacional. É possível que na época reprodutiva, os indivíduos geneticamente mais homogêneos se organizam em uma unidade genética populacional ou um cardume reprodutivo, de forma a manter sua integridade genética. Estes resultados sobre a estrutura genética de *B. hilarii* constituem ferramentas de extrema importância uma vez que podem fornecer subsídios para o entendimento do comportamento e biologia desses peixes, para programas de manejo de pesca e conservação da espécie.

## **ABSTRACT**

*Brycon hilarii* (subfamily Bryconinae, Characidae), popularly known as piraputanga, is a migratory fish species distributed throughout the entire Paraguay River basin and largely appreciated for its meat quality as well as for fishing, besides being the main species of touristic value in the Bonito region (MS, Brazil). Considering the lack of information on the population genetic structure of these fish, the objective of the present study was to analyze, through the use of microsatellite markers, the distribution of the genetic variability in *Brycon hilarii* collected in different localities of the Miranda River sub-basin (Paraguay basin) in the Bonito region (MS). For such an end, at first a total of seven polymorphic microsatellite loci capable of producing a considerable genetic variation was prospected (among di-, tri- and tetranucleotides), with their also being efficient in the heterologous amplification for five other species of the genus. In the populational analysis of *B. hilarii*, the different samples presented very similar genetic diversity levels. Through the  $F_{ST}$  values, gene and genotype differentiation tests and Bayesian analysis, it was possible to verify (1) the existence of at least two genetic populations of *Brycon hularii* coexisting in the sampled range, despite being a potentially mobile species; and (2) that only the fish from a reproductive stock were genetically differentiated from the other samples, representing a putative population unit. It is possible that in the reproductive season

the more genetically homogeneous individuals organize themselves into a population genetic unit or a reproductive stock, aiming the maintenance of their genetic integrity. These results on the genetic structure of *B. hilarii* constitute tools of extreme importance considering they can aid the understanding of the behavior and biology of these fish, contributing to fish management and species conservation programs.

## SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1. Considerações gerais sobre o gênero <i>Brycon</i> .....	7
2.2. A estrutura genética populacional de peixes .....	13
2.3. Os marcadores microsatélites .....	17
3. OBJETIVOS.....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1. Espécie estudada e locais de coleta .....	28
4.2. Extração de DNA genômico .....	34
4.3. Isolamento de Microsatélites - PIMA (" <i>PCR Isolation Microsatellite Arrays</i> ").....	37
4.4. Amplificação dos Microsatélites .....	45
4.5. Exame do perfil polimórfico dos locos em gel de poliacrilamida	46
4.6. A genotipagem.....	47
4.7. Análises estatísticas .....	50
5. RESULTADOS.....	54
5.1. Prospecção dos microsatélites .....	55
5.2. Genotipagem dos exemplares de <i>Brycon hilarii</i> .....	59
5.3. Caracterização dos locos microsatélites prospectados .....	60
5.4. Análise da variabilidade genética intrapopulacional.....	63
5.5. Análise da estrutura genética populacional de <i>B. hilarii</i> .....	69
6. DISCUSSÃO.....	73
6.1. Aplicação de metodologias alternativas na prospecção e genotipagem dos locos microsatélites em <i>Brycon hilarii</i> .....	74
6.2. Caracterização dos locos microsatélites de <i>Brycon hilarii</i> .....	78
6.3. A variabilidade genética populacional de <i>Brycon hilarii</i> .....	81
6.4. A estrutura genética populacional de <i>Brycon hilarii</i> e sua importância para programas de conservação.....	83
7. CONCLUSÕES .....	90
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93

---

# APRESENTAÇÃO

---

## 1. APRESENTAÇÃO

*Brycon*, principal representante da subfamília Bryconinae (Characidae), é um gênero amplamente distribuído por toda a América do Sul e América Central (Britski *et al.*, 1988). As espécies desse gênero, conhecidas regionalmente como matrinchãs, piraicanjubas, piraputangas ou pirapitingas, constituem um grupo de peixes neotropicais migradores (Howes, 1982) de reconhecida importância comercial, tanto para a pesca extrativa quanto para a piscicultura (Mendonça & Melo, 1994).

Entretanto, em algumas regiões brasileiras, tem-se observado uma redução drástica desses peixes e algumas espécies já se encontram ameaçadas de extinção (Braga, 1982; Faria, 1994; Mendonça & Melo, 1994; Ceccarelli & Senhorini, 1996). Ações antrópicas tais como, desmatamento de matas ciliares, construção de barragens e usinas hidrelétricas, drenagens para aproveitamento agrícola, poluição da água, ecoturismo mal-planejado, têm sido apontadas como as possíveis causas do comprometimento ou desequilíbrio dos ambientes naturais nos quais esses peixes ocorrem e/ou utilizam para a obtenção de seus recursos alimentícios.

A espécie *Brycon hilarii* Valenciennes 1850, anteriormente chamada *Brycon microlepis*, é a representante do gênero presente na sub-bacia do Rio Miranda, uma dentre as 6 subdivisões que a Bacia Hidrográfica do Paraguai recebeu no Estado do Mato Grosso do Sul (SEMA/MS, 1994). O rio Miranda, principal constituinte desta sub-bacia, e local de intensa procura para pesca amadora, tem suas águas bicarbonatadas, visto que seus

tributários ao longo da margem esquerda, escoam carbonatos da Serra da Bodoquena (Boggiani & Coimbra, 1995). Tais tributários cortam a extensão do município de Bonito (MS), para onde os turistas são atraídos tanto pela beleza cênica oferecida pelas águas caracteristicamente muito límpidas, como para a apreciação e pesca de peixes, onde se destaca a piraputanga (*Brycon hilarii*) como uma das espécies mais apreciadas. Por este motivo, muitas vezes, esses peixes são alimentados pelos proprietários de estabelecimentos turísticos, guias turísticos e pelos próprios visitantes. Esta atitude pode comprometer o desenvolvimento natural desses organismos, visto a possibilidade de ficarem condicionados a esta situação. De acordo com Froehlich (1999), a piraputanga teve sua abundância aumentada na região depois da instituição desse costume de alimentá-la para diversão dos turistas.

Recentemente, marcadores moleculares RAPD foram utilizados na determinação da estrutura genético-populacional de *B. hilarii* coletados em 4 localidades da região de Bonito (Sub-bacia do Miranda), com características ambientais e ações antrópicas diferenciadas. Em cada uma desses locais, os peixes foram amostrados tanto durante a época reprodutiva quanto durante a não reprodutiva. Foi possível, assim, a identificação de diferenciações genéticas entre as localidades e épocas de coleta, e desta forma, sugerida a ocorrência de populações estruturadas no sistema hidrográfico estudado (Sanchez & Galetii, *in press*).

No Brasil, apesar de escassos, existem ainda outros relatos para diferentes espécies de peixes migradores que mostram a existência de divergências genéticas entre populações dentro de um mesmo sistema hidrográfico (Sivasundar *et al.*, 2001; Wasko & Galetti, 2002; Almeida *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006).

Portanto, em contraste com a idéia até hoje aceita das grandes populações panmíticas de peixes migradores neotropicais de águas continentais, esses trabalhos caracterizam os primeiros resultados genéticos que indicam a existência de estruturação populacional onde, de alguma forma, essas unidades reprodutivas se organizam comigrando e coexistindo nos diversos sistemas hidrográficos.

No entanto, os fatores envolvidos na manutenção da integridade genética dessas unidades populacionais ainda permanecem obscuros. Tem sido muito discutido que a existência dessas subdivisões populacionais pode ser gerada devido à adaptação a diferentes condições ambientais variadas, a distância geográfica entre cada sub-população ou até por comportamentos específicos de cada grupo, como por exemplo, o conhecido comportamento "homing" entre os salmonídeos. Enfim, existem inúmeras hipóteses e muita controvérsia a respeito deste tema.

Porém, cada um desses sub-grupos compõe uma fração significativa da biodiversidade presente nos ecossistemas de nosso planeta e podem representar, em termos evolutivos, unidades tão ou mais reais do

que o conjunto total de populações que compõem a espécie em questão (Eizirik, 1996).

Desta forma, sob o aspecto da conservação, dada a existência de uma subdivisão ou estruturação populacional, cada uma de suas sub-unidades devem ser consideradas como unidades independentes a serem preservadas, já que contribuem com a variação total da espécie, aumentando o potencial evolutivo da mesma frente às alterações ambientais (Laikre *et al.*, 2005; Narum *et al.*, 2006).

---

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

---

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Considerações gerais sobre o gênero *Brycon*

O gênero *Brycon* pertence a mais ampla e complexa família da ordem Characiformes, a família Characidae. Esta engloba a maior parte dos peixes de escamas de água doce do Brasil, totalizando cerca de 400 espécies (Britski, 1972). Na América do Sul as espécies estão distribuídas em cerca de 30 subfamílias e 250 gêneros (Britski *et al.*, 1988).

A subfamília Bryconinae, cujo principal representante é o gênero *Brycon*, encontra-se amplamente distribuída por toda a América do Sul e América Central (Britski *et al.*, 1988). É considerado um dos gêneros da família Characidae com maior número de espécies, das quais 40 são consideradas válidas (Howes, 1982) e muitas ainda não foram descritas (Lima, 2003).

Porém, *Brycon* é reconhecido por um conjunto de caracteres, dos quais alguns são compartilhados por outras espécies da família, motivo pelo qual o gênero é considerado como "mal-definido". Além disso, a existência de uma grande diversidade morfológica do crânio e dos dentes entre as diferentes espécies, fez com que alguns autores questionassem a provável natureza monofilética do grupo (Howes, 1982; Castro & Vari, 1990).

Weitzman (1960) considera os gêneros *Triportheus* e *Chalceus* muito próximos a *Brycon*, agrupando-os em uma única tribo, Bryconini. Gery (1977), porém, subdivide a subfamília Bryconinae em três tribos: Bryconini,

Salminini, e Triportheini. Este autor insere *Triportheus* na subfamília por considerar a forma e distribuição dos dentes similares a *Brycon*. Além disso, Uj (1990) eleva a subfamília Bryconinae ao nível de família, isto é, Bryconidae, na qual o gênero *Triportheus* é incluído. Por outro lado, Portugal (1990), em uma revisão de *Triportheus*, relaciona-o a um grande grupo de caracídeos sul-americanos, no qual estariam inclusos *Brycon* e *Salminus*. Dados citogenéticos sugerem uma maior proximidade entre Bryconinae e Salmininae, do que com qualquer outro Characidae, inclusive Triportheinae, revelada por uma macroestrutura cariotípica bastante similar (Margarido & Galetti, 1996 e 1999).

Entretanto, apesar das prováveis relações de parentesco citadas, o gênero *Brycon* foi considerado por muito tempo como o único representante da subfamília Bryconinae. Porém, em um estudo sobre as relações filogenéticas deste gênero, não foi encontrada nenhuma evidência que o aproxima dos demais grupos discutidos anteriormente (Zanata, 2000). Por outro lado, este autor incluiu dois gêneros monotípicos em Bryconinae, *Chilobrycon* Géry & Rham e *Henochilus* Garman, com a ressalva de que comparações mais detalhadas são necessárias.

Britski *et al.* (1988) caracterizam os representantes de Bryconinae pela presença de dentes espessos e multicuspidados distribuídos em três séries no pré-maxilar e em duas no dentário. Os dentes da série externa do dentário são grandes e, na série interna, existe apenas um dente junto à

sínfise e posteriormente, distante deste, uma série de dentes muito pequenos.

Além da problemática quanto à natureza filética do grupo, as espécies de *Brycon* parecem também, não estar taxonomicamente bem definidas. A espécie do presente estudo é chamada *Brycon microlepis* por Britski *et al.* (1999), e segundo este autor, tem sido erroneamente identificada como *Brycon hilarii*, nome que deveria ser aplicado apenas à espécie do Rio São Francisco. Por outro lado, é sugerido por Lima (2001) em uma revisão taxonômica mais recente do gênero, que esta espécie seja nomeada como *Brycon hilarii*, dada a sinonímia encontrada em seu estudo.

De qualquer forma, as espécies de *Brycon* são conhecidas regionalmente como matrinchãs, piracanjubas, piraputangas ou pirapitingas. Algumas espécies do gênero executam longas migrações reprodutivas geralmente nos períodos de cheia (Godoy, 1975; Goulding, 1980). Após um longo período de alimentação ou acúmulo de reservas nos rios de maior largura e volume d'água, onde existe uma grande disponibilidade de recursos energéticos, os peixes migram a montante em direção às cabeceiras para desova. Isso ocorre geralmente, após grandes chuvas, pois é quando nível do rio está em ascensão, com as águas bastante turvas e oxigenadas, garantindo assim a proteção dos ovos e larvas contra predadores e a alta necessidade de oxigenação desta fase inicial de desenvolvimento. Além disso, existem relatos de outras espécies, *B.*

*petrosus* e *B.guatemalensis*, que realizam desova terrestre nas margens de riachos em época seca (Kramer, 1978; Bussing, 1993).

Trata-se de caracídeos reofílicos, que habitam rios de águas limpas e de alta oxigenação. Possuem médio a grande porte, podendo atingir 8 Kg e são omnívoros, alimentando-se no ambiente natural preferencialmente de frutos, sementes e insetos (Horn, 1997; Sabino & Sazima, 1999; Lima & Castro, 2000). Inclusive, foi demonstrada em estudo desenvolvido em uma estação ecológica de Costa Rica, a importante função ecológica da espécie *Brycon guatemalensis* na dispersão de sementes de uma espécie de *Ficus*, *F. glabrata*, auxiliando na manutenção das populações dessas árvores a jusante dos rios (Horn, 1997). Um estudo semelhante tem sido desenvolvido com a espécie *Brycon hilarii* e também uma espécie de *Ficus* às margens do Rio Formoso na região de Bonito (informação pessoal).

Além ter uma importante função ecológica, constitui um grupo de reconhecida importância comercial (Mendonça & Melo, 1994; Lima, 2003; Borba *et al.*, 2003), pois são muito procurados para fins culinários, visto a apreciada qualidade da carne. Além disso, este grupo de peixes disputa com o tucunaré e o dourado como um dos grupos mais apreciados pela pesca esportiva, já que apresenta grande resistência e voracidade no momento da captura. Estes animais também têm sido bastante solicitados pela atividade turística, dada a beleza de sua coloração, com o corpo amarelado e nadadeiras avermelhadas.

No entanto, apesar da importância comercial e ecológica destes peixes, é sabido que as espécies de *Brycon* são extremamente sensíveis frente às mudanças de seus habitats naturais.

A percepção da redução desses peixes em algumas regiões brasileiras não é atual. Entre 1942 e 1963, o número de exemplares de *Brycon orbignyianus* capturados no Rio Mogi-Guaçu diminuiu cerca de 80% e, portanto, já se podia prever o possível desaparecimento da espécie (Godoy, 1975). De acordo com Faria (1994), a partir de 1948, quando o dourado (*Salminus brasiliensis*) foi introduzido no Rio Paraíba do Sul e as barragens de Santa Branca e Paraibuna-Paraitinga foram construídas, as capturas de piabanha (*Brycon insignis*) pelos pescadores e pela população ribeirinha tornaram-se extremamente reduzidas. Segundo Mendonça & Melo (1994), a piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) da região da Bacia do Paraná e o matrinchã (*Brycon orthotaenia*) do Rio São Francisco estão ameaçadas de extinção.

Atualmente foi publicada pelo Ministério do Meio Ambiente (2004) a "Lista Nacional de Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçadas de Extinção", na qual seis espécies do gênero foram citadas: *Brycon devillei* (Castelnau, 1855) dos estados ES e MG; *Brycon insignis* Steindachner, 1877 de MG, RJ e SP; *Brycon nattereri* Günther, 1864 de GO, MG, PR, e SP; *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) de MG, RJ e SP; *Brycon orbignyianus* (Valenciennes, 1850) de MG, MS, PR, SC, RS e SP; e *Brycon*

*vermelha* Lima & Castro, 2000 da BA, ES e MG. Nota-se que a maioria dessas espécies é pertencente à bacia do Leste.

Diante destas considerações, estudos sobre biologia, ecologia e monitoramento da variabilidade genética das populações desses organismos são de extrema importância, pois toda informação científica tem um papel estratégico não somente no manejo e conservação das espécies, como também na sustentabilidade do ecossistema estudado.

## **2.2. A estrutura genética populacional de peixes**

Atualmente a necessidade da conservação de recursos genéticos de peixes já é mais discutida. Para justificar tal necessidade existem inúmeros argumentos, desde aqueles de caráter nutricional, econômico e em menor intensidade, os ecológicos.

No entanto, os esforços e preocupações voltados a estudos de conservação dos recursos genéticos de plantas e animais terrestres parecem ainda não estar sendo aplicados com a mesma intensidade em relação aos organismos aquáticos. Frente a enorme diversidade de espécies de peixes encontrada no Brasil, pouco ainda se conhece sobre a estrutura genético-populacional desses recursos. O declínio da diversidade biológica aquática não deve ser preocupante somente pela queda do número de indivíduos de uma espécie, mas primeiramente pela perda de sua variabilidade populacional (Hiltsdorf, 1997).

As espécies não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente mais semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Laikre *et al.*, 2005). Este padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referido como “estrutura genética populacional” de uma espécie (Laikre *et al.*, 2005).

A identificação da estrutura genética de uma população é possível mediante a utilização de marcadores moleculares. Técnicas de genética molecular têm sido amplamente aplicadas em estudos da distribuição da

variação genética dentro e entre populações naturais de peixes, os quais têm revelado a existência de populações significativamente diferenciadas mesmo para aquelas espécies que apresentam grande vagilidade, habitando sistemas contínuos, não fragmentados (Wirth & Bernartchez, 2001; Ovenden *et al.*, 2004; Narun *et al.*, 2006; Hatanaka *et al.*, 2006).

Barreiras ambientais, processos históricos, comportamento reprodutivo ou a capacidade de dispersão das espécies são os fatores geralmente apontados como responsáveis pela manutenção da integridade genética dessas unidades populacionais (Chapman *et al.*, 1999; Danielsdottir *et al.*, 1997; Wirth & Bernatchez, 2001; Nesbo *et al.*, 1998; Narum *et al.*, 2004).

Muito conhecimento tem sido acumulado sobre a estrutura genética populacional de espécies marinhas de grande interesse comercial, como os salmonídeos (Danielsdottir *et al.*, 1997; Narum *et al.*, 2006). No Brasil, apesar desta abordagem ainda ser relativamente nova, já existem relatos sobre a existência de estruturação populacional de peixes que habitam nossas diferentes bacias hidrográficas (Sivasundar *et al.*, 2001; Batista & Alves-Gomes, 2006).

Dergam *et al.* (1998), com a utilização de marcadores RAPD, encontraram a existência de populações estruturadas entre as amostras de *Hoplias malabaricus* dos Rios Tibagi e Paraná. Posteriormente, ainda com a utilização de marcadores RAPD, foi sugerida por Dergam *et al.* (2002) a existência de dois grupos geneticamente distintos de *H. malabaricus* na

Bacia do Rio Doce. A espécie *Pimelodus maculatus* também apresentou uma significativa estruturação populacional no rio Paranapanema, enquanto a população do Rio Tietê mostrou-se geneticamente homogênea, conforme revelado pelos marcadores RAPD (Almeida *et al.*, 2003). Com a utilização deste mesmo marcador, Leuzzi *et al.* (2004) detectaram diferenciações significativas entre as populações de *Astyanax altiparanae* provenientes do baixo, médio e alto curso do Rio Paranapanema.

Hatanaka & Galetti (2003) e Hatanaka *et al.* (2006) utilizando respectivamente marcadores RAPD e microssatélites, encontraram uma diferenciação genética em *Prochilodus argenteus* (= *P. marggravii*) coletados em diferentes pontos próximos à jusante da barragem da hidroelétrica de Três Marias (Rio São Francisco), com características ambientais diferentes. De modo similar, em uma espécie do gênero *Brycon*, *B. orthotaenia* (= *B. lundii*), coletada nos mesmos locais citados acima, foi detectada a presença de uma banda em 100% dos indivíduos provenientes de um ponto e somente em 27% dos indivíduos do outro ponto (Wasko & Galetti, 2002). Esta distinção foi também evidenciada posteriormente, com a utilização de seqüências cerne de minissatélite como *primers* em PCR (Wasko & Galetti, 2003). Em *Brycon opalinus*, uma espécie endêmica da Bacia do Paraíba do Sul, também foi evidenciada uma significativa estruturação populacional por meio da análise de DNA mitocondrial (Hilsdorf *et al.*, 2002) e de marcadores microssatélites (Barroso *et al.*, 2005).

Portanto, apesar de ainda escassos, estes trabalhos são alguns dos pouquíssimos relatos que demonstram a possível existência de populações geneticamente estruturadas de peixes brasileiros de água doce. Sabendo que a manutenção da variação genética dentro e entre populações selvagens é necessária para a conservação de espécies, o seu conhecimento constitui um elemento essencial para planos de manejo já que podem auxiliar na identificação de áreas prioritárias para conservação.

### 2.3. Os Marcadores Microssatélites

Durante as últimas décadas, os microssatélites se tornaram um dos mais populares marcadores moleculares. Os microssatélites correspondem a seqüências curtas, de 1 a 6 pb, repetidas em *tandem* e distribuídas pelo genoma de eucariotos (Tautz & Renz, 1984; Tautz, 1989) e procariotos (Hancock, 1995; Field & Wills, 1996). São analisados por meio da PCR, onde uma pequena quantidade de DNA é requerida. O primeiro relato de genotipagem por marcadores microssatélites foi uma análise de um loco (TG)<sub>n</sub> no gene da actina cardíaca humana (Litt & Luty, 1989).

Atualmente são intensamente utilizados e o sucesso de tais marcadores se deve a sua abundância e grande distribuição pelo genoma dos eucariotos, ao seu alto grau de polimorfismo, além da herança Mendeliana e de se tratar de marcadores co-dominantes, permitindo a identificação dos heterozigotos. Esses fatores, combinados ao multialelismo e ao enorme avanço das análises estatísticas desenvolvidas para os microssatélites, colocam-no como o marcador molecular com maior conteúdo de informação de polimorfismo (Ferreira & Grattapaglia, 1996; O'Reilly & Wright, 1995).

As taxas de mutação dos microssatélites são extremamente altas, aproximadamente  $10^{-3}$  eventos por loco por geração (Jarne & Lagoda, 1996). Esta alta taxa de mutação pode ser explicada principalmente pelo deslizamento ou *slippage* durante a replicação (Levinson & Gutman, 1987), ou pelo *crossing-over* desigual (Smith, 1976).

Nos últimos tempos, houve um enorme avanço no desenvolvimento de novas ferramentas estatísticas específicas para a análise desses marcadores (Pritchard *et al.*, 2000). Frente a tais vantajosas características, esses marcadores têm se mostrado como uma poderosa ferramenta em estudos com peixes envolvendo o mapeamento genético e testes de paternidade (Sakamoto *et al.*, 2000; Sprecher *et al.*, 1996), além de serem intensamente utilizados em estudos populacionais e/ou de conservação e manejo de recursos naturais (Yamamoto *et al.*, 2004; Hatanaka *et al.*, 2006).

Um dentre esses casos foi o trabalho desenvolvido entre cinco populações de *Copadichromis* sp., um ciclídeo demersal, coletadas em diferentes localizações de um lago do Leste da África, onde foram encontradas pequenas, porém significativas diferenças entre as mesmas, evidenciadas pelas frequências alélicas. Tais resultados tiveram importantes implicações no manejo e conservação da espécie na região de estudo (Taylor & Verheyeb, 2001). Da mesma forma, um polimorfismo de marcadores microssatélites foi utilizado em um estudo de variabilidade genética e estrutura de populações naturais do robalo Europeu, *Dicentrarchus labrax*, coletados em locais diferentes (De Leon *et al.*, 1997). Estes marcadores também foram eficazes na detecção de uma significativa diferenciação entre diferentes estoques de arenque, *Clupea harengus*, provenientes do Atlântico. Porém quando estes estoques foram comparados com os provenientes do Pacífico, *Clupea pallasii*, as diferenças não foram tão marcantes, indicando

que os microssatélites possivelmente sejam menos informativos em detectar divergências em larga escala, ou seja, entre espécies (Shaw *et al.*, 1999).

No entanto, apesar dos inúmeros benefícios oferecidos, os marcadores microssatélites também apresentam suas desvantagens. O primeiro problema é que ainda não existe um modelo evolutivo bem fundamentado que possa ser aplicado de forma universal para os microssatélites, o que torna difícil quantificar a diferenciação genética entre populações (Estoup *et al.*, 1993b). Dois modelos mutacionais foram inicialmente propostos para descrever a variação nos microssatélites. O modelo de mutação de alelos infinitos ou IAM (*Infinite Allele Mutation Model*) assume que a mutação originará um novo alelo pela adição de unidades repetitivas (Kimura & Crow, 1964). Em contraste, o modelo de mutação por passos ou SMM (*Stepwise Mutation Model*) assume que a mutação ocorre pelo ganho ou perda de uma unidade repetitiva, o que significa que admite homoplasia (Kimura & Ohta, 1978). Porém, existe muita controvérsia sobre qual modelo é o mais adequado para estudos com populações de peixes. Muito provavelmente o modo de mutação dos microssatélites seja caso ou loco específico (O'Connell & Wright, 1997).

Existem ainda os problemas relacionados com a PCR e posteriormente com a genotipagem ou identificação dos alelos de um determinado loco (DeWoody *et al.*, 2006). A não-amplificação de certos alelos, devido a substituições, inserções ou deleções no sítio de anelamento dos *primers*, fenômeno amplamente conhecido como alelos nulos (Callen *et*

*al.*, 1993), leva a uma superestimativa de indivíduos homozigotos. Outro problema que ocorre principalmente com os locos dinucleotídeos extensos é a produção de um padrão de bandas denominadas “*stutter*”, isto é, os alelos não aparecem como uma banda discreta, mas como uma série de bandas, o que torna difícil a genotipagem. Isto provavelmente ocorre devido ao deslizamento ou “*slippage*” da *Taq* polimerase durante a PCR (Schlotterer & Tautz, 1992; Hauge & Lit, 1993). Muitas vezes podem ser observados casos em que os alelos menores são amplificados intensamente em relação aos alelos de maior comprimento. Este fenômeno ocorre devido à competição entre os alelos (Banks *et al.*, 1999) e assim como ocorre com os alelos nulos, muitos genótipos são interpretados como sendo homozigotos, já que o alelo menor é super-representado.

Outro grande inconveniente dos microssatélites é o fato de que precisam ser isolados das espécies a serem examinadas pela primeira vez, pois são usualmente encontrados em regiões não-codificantes, onde a taxa de substituição nucleotídica é maior do que nas porções codificantes do genoma (Zane *et al.*, 2002). Porém, existem casos em que graças à conservação das seqüências flanqueadoras de locos microssatélites, *primers* construídos para uma determinada espécie, são eficientes também para amplificação via PCR de espécies relacionadas (Rico *et al.*, 1996; Presa & Guyomard, 1996; O’Connell *et al.*, 1998; Moreira, 1999).

Entretanto, várias estratégias alternativas de isolamento de microssatélites vêm sendo desenvolvidas (Zane *et al.*, 2002), de maneira a

reduzir o tempo, esforço e capital investido, além de aumentar significativamente o rendimento do trabalho. Uma técnica alternativa bastante simples e eficiente, denominada PIMA (*PCR Isolation of Microsatellites Arrays*) (Lunt *et al.*, 1999) é baseada na amplificação por RAPD (*Ramdon Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990; Welsh & McClelland, 1990), com a utilização de *primers* de seqüência arbitrária. PIMA foi inspirada em outras metodologias anteriores que também utilizavam marcadores RAPD com posterior hibridação *Southern* das bandas com sondas para microssatélites (Cifarelli *et al.*, 1995; Richardson *et al.*, 1995), onde foi possível observar a abundância de regiões com seqüências repetitivas existentes nos *amplicons* de RAPD.

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos no sentido de se isolar e caracterizar locos microssatélites, principalmente para as espécies marinhas de grande interesse comercial, como os salmonídeos (Estoup *et al.*, 1993a; Zheng *et al.*, 1995; Pfeiffer *et al.*, 1997; Banks *et al.*, 1999). Contudo, no Brasil existem poucos registros de seqüências microssatélites isoladas de peixes de água doce. (Tabela 1).

**Tabela 1:** Relação dos locos microssatélites descritos para espécies brasileiras de peixes de água doce.

<b>Espécie</b>	<b>Distribuição</b>	<b>Nº locos isolados</b>	<b>Referência Bibliográfica</b>
<i>Piaractus mesopotamicus</i>	B. Amazônica, do Orinoco, Paraná-Paraguai	8	Calcagnotto <i>et al.</i> (2001)
<i>Prochilodus lineatus</i>	B. Paraguai	1	Hatanaka <i>et al.</i> (2002)
<i>Brycon opalinus</i>	B. Paraíba do Sul	7	Barroso <i>et al.</i> (2003)
<i>Arapaima gigas</i>	Bacia Amazônica	14	Farias <i>et al.</i> (2003)
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	Bacia Amazônica	14	Beheregaray <i>et al.</i> (2004a)
<i>Nannostomus unifasciatus</i>	Bacia Amazônica	9	Beheregaray <i>et al.</i> (2004b)
<i>Eigenmannia</i> sp. 2	Região Neotropical	9	Moysés <i>et al.</i> (2005)
<i>Pseudoplatystoma corruscans</i>	B. do Prata e do São Francisco	5	Revaldaves <i>et al.</i> (2005)
<i>Prochilodus argenteus</i>	B. São Francisco	18	Hatanaka <i>et al.</i> (2006); Barbosa <i>et al.</i> (2006)
<i>Prochilodus costatus</i>	B. São Francisco	6	Carvalho-Costa <i>et al.</i> (2006)
<i>Brycon hilarii</i>	B. Paraguai	7	Sanches & Galetti (2006)
<i>Carnegiella marthae</i>	B. do Rio Negro e Alto Orinoco	7	Beheregaray <i>et al.</i> (2006)
<i>Leporinus macrocephalus</i>	B. Paraguai	8	Morelli <i>et al.</i> (2007)

O isolamento e caracterização de seqüências microssatélites, apesar de escassos ou quase inexistentes no Brasil, são extremamente úteis e importantes principalmente para estudos de conservação da ictiofauna, já que são eficazes na detecção de variabilidade intra e interpopulacional e,

portanto, na identificação de unidades populacionais ou significativamente evolutivas.

---

# OBJETIVOS

---

### 3. OBJETIVOS

Tendo em vista a importância econômica e, principalmente, os casos de ameaças a algumas espécies do gênero *Brycon*, além da escassez de informações sobre a biologia e estrutura populacional desses peixes, o objetivo geral do presente estudo foi:

- ✓ Acessar a variação genética da espécie *Brycon hilarii* por meio de marcadores microssatélites e fornecer subsídios para programas de conservação desse importante recurso pesqueiro.

Para tanto os objetivos específicos foram:

- ✓ Isolar e caracterizar microssatélites de *Brycon hilarii*, assim como suas seqüências flanqueadoras por meio da metodologia PIMA, visando disponibilizar sondas potencialmente úteis aos estudos relacionados ao manejo da pesca, piscicultura e conservação desta e outras espécies do grupo.
- ✓ Analisar a distribuição da diversidade genética dentro e entre amostras de *B. hilarii* provenientes de diferentes locais de coleta da sub-Bacia do Rio Miranda, região de Bonito (MS).

Desta forma, pretendeu-se tentar responder as seguintes questões:

- ✓ Ocorre subdivisão de populações na espécie de peixe *Brycon hilarii*, a despeito de ser uma espécie migradora com potencial para se deslocar a grandes distâncias e formar populações genéticas únicas?
- ✓ Durante o período reprodutivo os peixes geneticamente mais próximos se reúnem em grandes cardumes sugerindo a ocorrência de "homing"?
- ✓ Cardumes reprodutivos representam uma única população genética?

---

# MATERIAL E MÉTODOS

---

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 - Espécie estudada e locais de coleta

Distribuída por toda a bacia do Paraguai, *Brycon hilarii* (Bryconinae, Characidae), popularmente conhecida como piraputanga, é uma espécie de peixe migrador de grande importância comercial pela elevada qualidade de sua carne. Destaca-se também como um dos peixes mais apreciados tanto para a pesca esportiva e para a observação sub-aquática, já que apresenta uma notável combinação de cores (Figura 1).



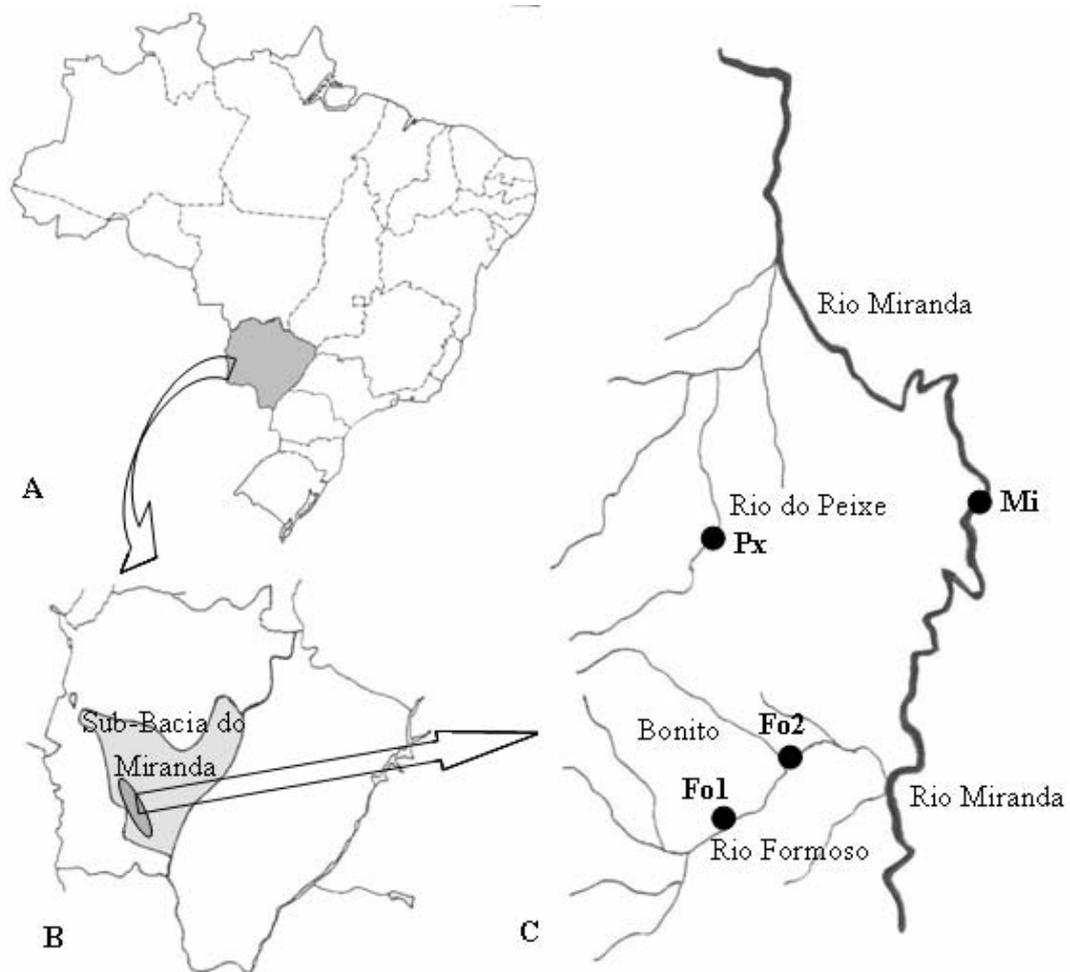
**Figura 1:** Exemplar da espécie *Brycon hilarii* em observação sub-aquática no Rio Formoso (Bonito – MS)

Foram coletados 180 exemplares de *Brycon hilarii* em quatro localidades da sub-bacia do Miranda (Bacia do Rio Paraguai), compreendendo o Rio Miranda (calha principal da sub-bacia) e dois tributários diferentes localizados próximos ao município de Bonito, o Rio Formoso e o Rio do Peixe (Figura 2; Tabela 2). Duas localidades estão situadas no Rio Formoso. Uma delas é a localidade “Fo1”, uma porção mais

a montante, na Ilha do Padre, local de intensa atividade turística. Mais a jusante está a localidade "Fo2", que ao contrário do local anterior trata-se de uma propriedade particular (Fazenda Estância dos Rios), sem atividade turística. A localidade "Px", no Rio do Peixe, está situada em uma propriedade particular, fazenda Santa Júlia. Na calha principal do Rio Miranda, a localidade "Mi" está situada em um pesqueiro, onde os peixes recebem alimentação artificial diariamente pelas cevas.

As coletas foram efetuadas em diferentes períodos do ano, em época de chuvas e seca. A fase de reprodução destes peixes se dá no período de chuvas quando a vazão das águas é grande, o que pode variar entre setembro a fevereiro. Após esta fase chega o momento de alimentação e ganho energético dos peixes até que se inicie novamente o próximo período de reprodução. No entanto, definir exatamente o momento da subida dos cardumes para a reprodução, é uma tarefa bastante difícil. Somente a coleta de 09/2004 na localidade Mi foi efetuada no exato momento da subida de um grande cardume de *B. hilarii* para a reprodução. Por este motivo, os indivíduos capturados nesta localidade foram analisados separadamente em duas amostragens, "Mi1" (09/1999, 09/2003) e "Mi2" (09/2004) representando os peixes durante a piracema, já que se trata de uma grande oportunidade de analisar a estrutura genética dos grandes cardumes que migram às cabeceiras durante a época reprodutiva em relação aos peixes residentes durante a época não-reprodutiva.

O Rio Miranda é um local de pesca intensiva e percorre 542 km de sua nascente até sua foz no Rio Paraguai. É um dos rios da Bacia do Paraguai que recebe as maiores cargas poluidoras (SEMA/MS, 1994). Por outro lado, seus tributários que nascem na Serra da Bodoquena e cortam a extensão do município de Bonito (MS), possuem águas cristalinas que compõem um cenário de extrema beleza e, por isso, são bastante procurados por turistas de todo mundo.



**Figura 2:** Locais de Coleta. A: Mapa do Brasil, destacando-se o Estado do Mato Grosso do Sul (MS). B: Estado do MS, a parte em cinza corresponde à Sub-Bacia do Rio Miranda (Bacia do Paraguai). C: Localidades, Fo1) Rio Formoso/Ilha do Padre; Fo2) Rio Formoso/Fazenda Estância dos Rios; Mi) Rio Miranda; Px) Rio do Peixe/Fazenda Sta. Júlia.

**Tabela 2:** Dados sobre as amostras de *Brycon hilarii*

<b>Localidade</b>	<b>Localização Geográfica</b>	<b>Época da coleta</b>	<b>N</b>
Fo1 – Rio Formoso/Ilha do Padre	21°07'S/ 56°10'W	09/1999, 02/2000 e 09/2000	28
Fo2 – Rio Formoso/Fazenda Estância dos Rios	21°4'37"S/56°21'44"W	09/1999 e 02/2000	24
Px – Rio do Peixe/Fazenda Santa Júlia	20°51'45"S/56°30'51"W	09/1999, 02/2000 e 09/2003	37
Mi1 – Rio Miranda	20°43'26"S/56°8'4"W	09/1999, 09/2003	29
Mi2 – Rio Miranda/cardume reprodutivo	20°43'26"S/56°8'4"W	09/2004	62
Total			180

Os peixes foram capturados por meio de anzol e marcados por meio de linhas de nylon amarradas na base da nadadeira dorsal. Amostras sanguíneas foram colhidas a partir do pedúnculo caudal com a utilização de seringas hipodérmicas contendo EDTA 0,5 M (Figura 3), posteriormente foram estocadas em freezer -20° C até o momento da extração do DNA. Posteriormente, os peixes eram devolvidos ao local de origem.



**Figura 3:** Coleta de amostra sanguínea de um exemplar de *B. hilarii*

## **4.2. Extração de DNA genômico**

Para cada tipo de tecido, sangue ou nadadeira, foi utilizada uma metodologia conforme descrito nos próximos itens.

### **4.2.1. Extração de DNA genômico a partir de amostras sanguíneas**

Para a extração de DNA do sangue, foi utilizada a metodologia de Lahiri & Nurnberger (1991), com algumas modificações:

- 1) Colocar 25  $\mu$ L de sangue em tubo de 1,5 mL contendo 150  $\mu$ L de EDTA (0,5 M).
- 2) Misturar vigorosamente por 30 a 40 segundos.
- 3) Centrifugar por 7 minutos a 5000 rpm para separação das células e do plasma.
- 4) Retirar o sobrenadante com cuidado para não retirar o pellet, e adicionar 500  $\mu$ L de TTKM 1 para lise das hemácias. Misturar vigorosamente.
- 5) Centrifugar por 7 minutos a 5000 rpm e descartar o sobrenadante.
- 6) Lavar o precipitado em 500  $\mu$ L de TTKM 1 e centrifugar por 2 minutos.
- 7) Descartar o sobrenadante e lavar em 500  $\mu$ L de TKM 1. Centrifugar por 2 minutos.
- 8) Descartar o sobrenadante, adicionar 200  $\mu$ L de TKM 2, 20  $\mu$ L de SDS 10% e ressuspender até dissolver por completo, misturando vigorosamente por 3 minutos.
- 9) Incubar a 65° C por 15 minutos.

- 10) Adicionar 50  $\mu$ L de NaCl 5 M e misturar vigorosamente por 3 minutos.
  - 11) Centrifugar a 13.000 rpm por 10 minutos, recuperar o sobrenadante e passar para um novo tubo.
  - 12) Adicionar 600  $\mu$ L de etanol (100%) gelado. Inverter o tubo (mexer) para o DNA precipitar. Centrifugar por 10 minutos a 13.000 rpm.
  - 13) Descartar o sobrenadante, adicionar 500  $\mu$ L de etanol (70%) gelado e centrifugar por 2 minutos.
  - 14) Descartar o sobrenadante com cuidado e inverter o tubo sobre um papel absorvente até secar totalmente.
  - 15) Ressuspender em 50  $\mu$ L de TE.
- Soluções:
    - TTKM 1: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 2 mM; Triton X - 100 0,25%.
    - TKM 1: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 2 mM.
    - TKM 2: Tris-HCl 10 mM pH 7,6; MgCl<sub>2</sub> 10 mM; EDTA 2 mM; NaCl 100mM.
    - TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8

#### **4.2.2. Extração de DNA genômico a partir de amostras de tecidos sólidos**

Para a extração do DNA das amostras de nadadeiras foi utilizada a metodologia de Aljanabi & Martinez (1997), com algumas modificações:

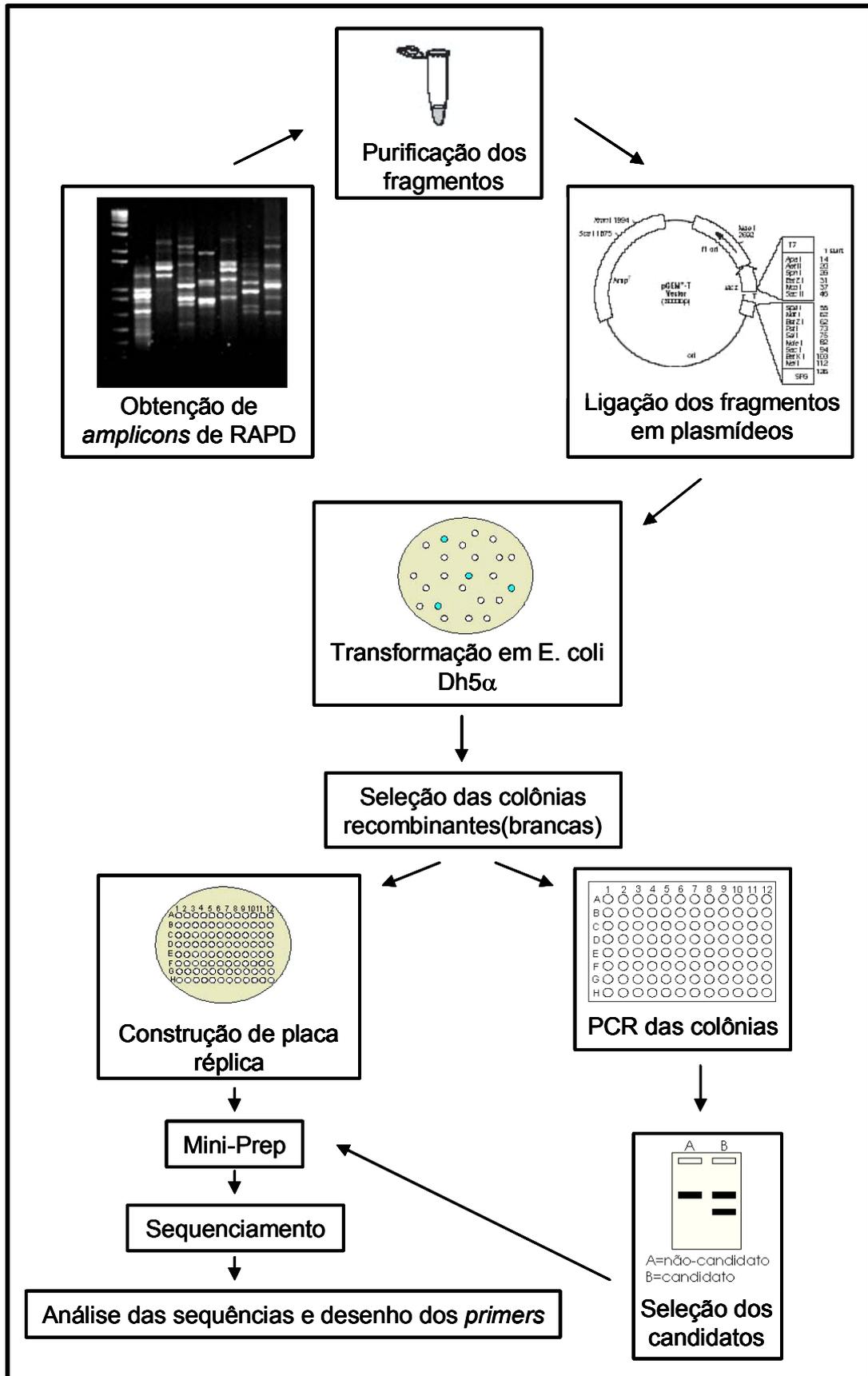
- 1) Para cerca de 50-100 mg do tecido acrescentar 400  $\mu$ L de tampão salino (NaCl 0,4 M; Tris-HCl 100 mM pH 8,0 e EDTA 2 mM pH 8,0).

- 2) Adicionar 80  $\mu\text{L}$  de SDS 20% e 16  $\mu\text{L}$  de Proteinase K (20 mg/mL) e misturar bem.
- 3) Incubar as amostras a 55-65° C durante o tempo (1-4 h) necessário para que fiquem bem digeridas, e a mistura fique bem homogeneizada.
- 4) Adicionar 300 $\mu\text{L}$  de NaCl 6 M e misturar bem.
- 5) Centrifugar por 30 minutos a 10000 rpm
- 6) Recuperar o sobrenadante, transferindo-no para um novo tubo.
- 7) Adicionar igual volume de isopropanol e misturar bem.
- 8) Incubar as amostras a -20° C por 1 hora.
- 9) Centrifugar por 20 minutos a 10000 rpm
- 10) Lavar o pellet com 300  $\mu\text{L}$  de etanol 70%
- 11) Centrifugar por 5 minutos, descartar o sobrenadante e deixar secar.
- 12) Ressuspender em 100-300  $\mu\text{L}$  de TE e adicionar 10-20  $\mu\text{L}$  Rnase (20 mg/mL).

A quantificação e verificação da qualidade do DNA das amostras foram analisadas, após a eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

#### 4.3. Isolamento de Microssatélites - PIMA (*"PCR Isolation Microsatellite Arrays"*) (Lunt *et al.*, 1999)

Para a prospecção dos microssatélites foi utilizada a metodologia PIMA descrita por Lunt *et al.* (1999), que é baseada em um enriquecimento de fragmentos RAPD seguido pelo isolamento por meio da PCR com *primers repeat-específicos*. Os principais passos estão resumidamente explicados no esquema da Figura 4.



**Figura 4:** Esquema resumido evidenciando as principais etapas da metodologia PIMA

#### 4.3.1. Obtenção dos *amplicons* de RAPD

Inicialmente foram realizados alguns testes visando ajustar as condições da RAPD-PCR, variando-se as concentrações dos componentes da reação e as temperaturas de anelamento. A reação foi padronizada de 100 ng de DNA, 5 pmol de *primer*, tampão de reação 1 x (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3), Mg Cl<sub>2</sub> 3 mM, 125 µM de cada dNTP, 2 U de *Taq* polimerase em um volume final de 50 µL. Um controle negativo, ou seja, sem a presença de DNA, sempre foi utilizado para cada conjunto de reações, com a função de averiguar a presença accidental de contaminações. O programa para amplificação inicia com uma desnaturação inicial de 5 minutos a 94° C, seguida de 45 ciclos com temperatura de desnaturação de 94° C (1 min), temperatura de pareamento de 37° C (1 min) e temperatura de extensão de 72° C (2 min) e uma extensão final de 5 minutos a 72° C, em um termociclador MJ Research modelo PT100 de 96 amostras.

Uma única amostra de *B. hilarii* foi utilizada para a obtenção dos fragmentos de RAPD. Um total de 13 *primers* foi testado para selecionar aqueles que produzissem o maior número de fragmentos (Tabela 3).

**Tabela 3:** Seqüência dos *primers* de RAPD testados.

<b>Primer</b>	<b>Seqüência (5' - 3')</b>
A	GTG AGG CGT C
B	CAT TCG AGC C
C	CCC GCT ACA C
E	AAC GCG TCG G
OPP-13	GGA GTG CCT C
OPP-18	GGC TTG GCC T
OPK-19	CAC AGG CGG A
1	GGT GCG GGA A
2	GTT TCG CTC C
3	GTA GAC CCG T
4	AAG AGC CCG T
5	AAC GCG CAA C
6	CCC GTC AGC A

#### 4.3.2. Purificação e clonagem dos *amplicons* RAPD

Os produtos da RAPD-PCR obtidos foram purificados com o kit “Wizard PCR Preps DNA Purification System” (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

Para ligação dos insertos, foi utilizado o kit de ligação pGEM-T Easy System (Promega), que permite a seleção dos recombinantes pelo sistema azul/branco. Este sistema se resume à capacidade da bactéria hospedeira produzir a enzima  $\beta$ -galactosidase que faz a quebra do substrato X-Gal, produzindo colônias azuis em placas indicadoras contendo IPTG e X-Gal. A

enzima, produto do gene *lac Z*, pode ser separada em dois domínios –  $\alpha$ -fragmento (localizado no vetor) e  $\omega$ -fragmento (no DNA da bactéria hospedeira). Os dois fragmentos interagem para formar a  $\beta$ -galactosidase funcional, processo conhecido como  $\alpha$ -complementação. Se o inserto de interesse é ligado ao vetor, esta ligação se dá em um sítio localizado dentro do  $\alpha$ -fragmento, interrompendo assim sua seqüência codificante. Conseqüentemente, não ocorre a  $\alpha$ -complementação e as bactérias não podem quebrar o X-Gal conferindo assim às colônias recombinantes a cor branca ([http://www.promega.com/guides/dna\\_guide/dna\\_guide.pdf](http://www.promega.com/guides/dna_guide/dna_guide.pdf)).

A transformação por choque térmico foi realizada com células competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ , que posteriormente foram crescidas em placas contendo meio de cultura Lura-Bertani (LB) ágar e ampicilina (100  $\mu$ g/mL) e cresceram em estufa a 37° C *overnight*.

Cada colônia recombinante (branca) foi transferida a uma placa LB ágar réplica (ampicilina 100  $\mu$ g/mL) e a 1 poço dos 96 existentes em placas de crescimento (*mega-titer plate* – *Applied Biosystem*), contendo 1mL de meio líquido *Circle Grow* e ampicilina (100  $\mu$ g/ml). Foram selecionadas colônias até que se completassem os 96 poços da placa de crescimento. Efetuou-se o crescimento *overnight* a 37° C das colônias de ambas as placas, sendo que a placa de crescimento foi mantida em agitação.

### 4.3.3. PCR das colônias

Após o crescimento *overnight*, foram realizadas amplificações por PCR diretamente das colônias em placas próprias para termociclador também com capacidade de 96 amostras (*micro-titer plate thermal cyclers* – *Applied Biosystem*), utilizando os *primers* do vetor - M13 Forward [5'-d(GTAAAACGACGGCCAGT)-3'] e M13 Reverse [5'-d(GGAAACAGCTATGACCCATG)-3'], juntamente com o *primer repeat*-específico, ou seja, flanqueador de seqüências repetitivas (5'TGTGGCGGCCGC(TG)<sub>8</sub>V-3') conforme descrito por Lunt *et al.* (1999) para a metodologia PIMA. Cada reação deve conter tampão padrão de reação 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada dNTP, 5 pmol de cada um dos *primers*, 1 U de *Taq DNA polymerase* e o DNA molde transferido com um replicador (96 pinos) em um volume final de 20 µL. O programa para amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 94° C por 5 minutos, 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95° C (40 s), temperatura de hibridação de 55° C (40 s) e temperatura de extensão de 72° C (1,0 min), e uma extensão final de 10 minutos a 72° C.

Em seguida, após análise em gel de agarose 1%, as amostras que apresentaram uma banda adicional foram selecionadas para sequenciamento, pois uma banda refere-se ao fragmento amplificado pelos *primers* do vetor e a outra ao produto de amplificação do *primer repeat*-específico, indicando assim a presença de uma provável seqüência repetitiva. A partir dessas colônias positivas foram realizadas mini-

preparações para purificação dos plasmídeos para então, serem seqüenciados.

#### **4.3.4. Mini-prep**

As mini-preparações foram realizadas segundo Sambrook *et al.* (1989) com algumas adaptações:

- 1) Após crescer as bactérias selecionadas em meio líquido em tubos de 50 mL a 37° C *overnight* com agitação, transferir o conteúdo enchendo um tubo de 2 mL e centrifugar por 30 segundos. Descartar o sobrenadante e repetir esse processo com todo o conteúdo.
- 2) Adicionar 400 µL da solução I (0,4 mg/mL RNAase, 10 M Tris-HCl, 0,004 M EDTA) e agitar o tubo.
- 3) Adicionar 400 µL da solução II (0,2 M NaOH, SDS 1%) e mexer o tubo até que o conteúdo fique bem viscoso.
- 4) Acrescentar 400 µL da solução III (3 M acetato de potássio, ácido acético 11,5%), mexer o tubo e centrifugar por 5 minutos.
- 5) Transferir o sobrenadante para um novo tubo contendo 800µL de isopropanol 100% e incubar à temperatura ambiente por 10 minutos.
- 6) Centrifugar durante 10 minutos e descartar o sobrenadante.
- 7) Adicionar 200 µL de etanol 70%, centrifugar por 5 minutos e descartar o sobrenadante.

- 8) Acrescentar 200  $\mu$ L de etanol 100%, centrifugar por 5 minutos e descartar o sobrenadante.
- 9) Secar na estufa 37° C.
- 10) Adicionar 20  $\mu$ L de água deionizada ao pellet contido no tubo.

#### **4.3.5. Seqüenciamento**

Para cada amostra, foram realizadas duas reações de seqüenciamento, uma com o *primer M13 Forward* e outra com o *M13 Reverse*, de modo que nenhuma informação fosse perdida no caso de seqüências muito grandes.

Os fragmentos de interesse foram seqüenciados com a utilização do kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing<sup>TM</sup>* (Perkin Elmer) em um seqüenciador automático *ABI 377* (Applied Biosystems, Inc.) pertencente ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, de responsabilidade do prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

#### **4.3.6. Análise das seqüências e desenho dos *primers***

Em cada uma das seqüências obtidas, foi realizada a busca por microssatélites. Para tanto, consideramos seqüências microssatélites quando o número de repetições foi maior do que 10 para *repeats* mononucleotídeos, 6 para dinucleotídeos, 4 para trinucleotídeos, e maior do que 3 para tetra, penta e hexanucleotídeos (Stalling *et al.*, 1991; Estoup *et al.*, 1993b).

Dentre esses, ainda os classificamos como perfeitos aqueles em que as repetições são ininterruptas, ao contrário dos imperfeitos, que apresentam interrupções entre as unidades repetitivas e, os compostos, constituídos por mais de um *repeat* (Tassanakajon *et al.*, 1998).

As seqüências repetitivas foram buscadas com a utilização do programa *Tandem Repeats Finder* (Benson, 1999) disponível na Internet (<http://c3.biomath.mssm.edu/trf.html>), e também visualmente. Para os fragmentos que continham microssatélites, foi efetuado primeiramente o alinhamento das seqüências respectivas ao sequenciamento com o *primer* M13 *Forward* e com o *primer Reverse*, por meio do programa *Multalin* (Corpet, 1988) disponível na internet (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>). A partir da seqüência consenso é que foi desenhado o *primer* com a utilização do programa computacional *GeneRunner* (*Hastings Softwares, INC, Hastings, NY, USP*).

#### **4.4. Amplificação dos microssatélites**

As reações de PCR foram testadas, variando-se as concentrações dos componentes ( $MgCl_2$ , DNA, dNTP, *primer*, *Taq*) e a temperatura de anelamento, de forma que foram otimizadas para cada um dos *primers* confeccionados.

Para todos os *primers* testados uma reação foi padronizada com sucesso: 100 ng do DNA molde, tampão de reação 1x (50 mM KCl, 10 mM Tris pH 8,3), 1,5 mM  $MgCl_2$ , 5 pmol de cada *primer* (*Foward* e *Reverse*),

200 mM de cada dNTP e 1 U *Taq DNA Polymerase*. O programa da reação consistiu de um passo de desnaturação inicial de 94° C seguido de 35 ciclos de 94° C de desnaturação por 1 minuto, anelamento 56° C por 1 minuto, 1 minuto de extensão a 72° C e um passo adicional de extensão final a 72° C por 20 minutos.

#### **4.5. Exame do perfil polimórfico dos locos em gel de poliacrilamida**

Tendo a reação já otimizada, um total de dez amostras de DNA foi amplificado para a análise do perfil polimórfico dos locos selecionados, com o intuito de verificar quais eram polimórficos, e conseqüentemente candidatos para a futura análise populacional.

O exame do polimorfismo de cada loco foi efetuado em gel de poliacrilamida não-desnaturante 7 %, já que confere um maior poder de separação das bandas, o que não pode ser observado em gel de agarose. Os géis de poliacrilamida foram corados com nitrato de prata, de acordo com o protocolo de Comincini *et al.* (1995), como descrito abaixo.

- 1) Pré-tratar a placa com o gel por 20 minutos mergulhada em uma solução fixadora (10% etanol e 10% ácido acético). Não descartar a solução.
- 2) Lavar a placa mergulhando-a em água destilada por 1,5 minuto.
- 3) Manter a placa durante 3 minutos em um recipiente contendo uma solução de oxidação (ácido nítrico 1%).

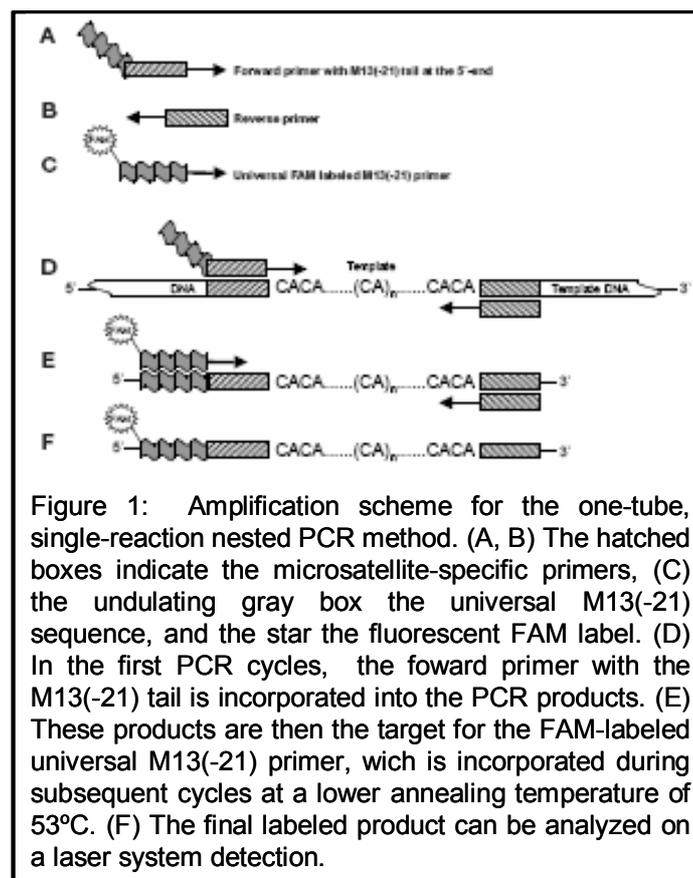
- 4) Lavar novamente mergulhada em água destilada por 1,5 minuto.
- 5) Impregnação: manter a placa submersa na solução de impregnação (nitrato de prata 0,1%, 2mL de formaldeído 0,05 %) durante 30 minutos.
- 6) Lavar novamente com água destilada por 30 segundos.
- 7) Revelação: colocar a placa mergulhada em uma solução de revelação (carbonato de sódio anidro 0,74%, formaldeído 0,05% e solução de tiosulfato de sódio pentahidratado a 200 mg/mL 0,5%)
- 8) Deixar a placa submersa na solução de fixação descrita no item "1" deste protocolo por 5 minutos.

#### **4.6. A genotipagem**

Inicialmente, a genotipagem estava sendo realizada em gel de poliacrilamida. Porém, apesar de se tratar de uma metodologia módica, é bastante trabalhosa, demorada e não muito confiável no caso de locos de microssatélites do tipo dinucleotídeos. Em trabalhos, onde um grande número de indivíduos deve ser genotipado e/ou vários locos são utilizados, essas dificuldades tornam-se ainda mais acentuadas.

Assim, foi realizado um experimento onde foi testado um método descrito por Schuelke (2000), denominado "*one-tube, single-reaction nested PCR method*". É um procedimento mais econômico para fragmentos de PCR marcados com fluorescência, permitindo assim a realização da genotipagem mais, rápida em seqüenciador. As reações de PCR são realizadas com a utilização de 3 *primers*: 1) seqüência específica do *primer foward* do loco a

ser amplificado com uma fusão em seu final 5' de uma seqüência universal M13(-21); 2) a seqüência específica do *primer reverse*; 3) o *primer* universal M13(-21) marcado com fluorescência. De acordo com o autor, durante os primeiros ciclos o *primer forward* com a cauda M13(-21) é incorporado e acumula-se no produto de PCR, até que seja esgotado. A temperatura de anelamento é então reduzida para facilitar o anelamento do *primer* universal M13(-21) marcado, que assume a posição de *primer forward* e incorpora a marcação fluorescente no produto de PCR (Figura 5).



**Figura 5:** Figura retirada de Schuelke (2000)

Um dos locos aqui prospectado, um dinucleotídeo perfeito (GT)<sub>13</sub> denominado Bh5, foi utilizado para testar a eficiência do método. No sentido de comparar os resultados obtidos com este método, os mesmos indivíduos foram genotipados pela metodologia convencional onde um do *primers* foi marcado fluorescentemente (Smith *et al.*, 1986).

O *primer* Bh5 *forward* foi construído com a fusão da seqüência universal M13 (-21) de 18bp (5'-TGT AAA ACG ACG GCC AGT Bh5 F -3') em seu final 5'. E o *primer* de seqüência universal M13 (-21) foi construído marcado com NED (NED-TGT AAA ACG ACG GCC AGT-3'), que será denominado aqui de NED-M13(-21). Além do *primer reverse* do loco Bh5 (Bh5 R) que foi confeccionado com sua seqüência original, sem marcação fluorescente.

As reações foram padronizadas e sutilmente modificadas a partir do que foi originalmente proposto por Schuelke (2000). Cada PCR continha 8 pmol dos *primers* NED-M13(-21) e Bh5 R, 2 pmol do Bh5 F em um volume final de 15µL (tampão de reação 10X, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 50 ng DNA molde, 1U *Taq* polimerase). As condições de amplificação foram: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C (30 s), 56°C (45s), 72°C (45 s), e posteriormente 12 ciclos de 94°C (30 s), 53°C (45s), 72° C (45 s), com uma extensão final de 72° (10 minutos).

Os fragmentos foram analisados em um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer) pertencente ao laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, de responsabilidade do prof. Dr. Flávio

Henrique da Silva. O tamanho dos alelos foi determinado com base no tamanho padrão conferido pelo GeneScan-500 (Rox) e os genótipos foram obtidos usando o GENESCAN 3.1 e o GENOTYPER 2.5 (PE Applied Biosystems).

#### **4.7. Análises estatísticas**

Os locos que se apresentaram polimórficos foram selecionados para a caracterização polimórfica (número de alelos, heterozigosidades esperada e observada, equilíbrio de Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação). Para tanto, foram utilizados 30 indivíduos de *B. hilarii* provenientes do Rio Miranda, além de ao menos duas amostras de outras cinco espécies do gênero, *B. orthotaenia* (antes denominado *B. lundii*), *B. orbignyanus*, *B. falcatus* (anteriormente chamado *B. brevicauda*), *B. cephalus* e *B. insignis*. Após a caracterização, foi iniciada a análise da variabilidade e da diferenciação populacional, onde foram genotipados e analisados todos os 180 exemplares capturados nas 4 localidades.

##### **4.7.1. Caracterização da variabilidade genética**

Dados sobre o número e frequência de alelos, heterozigosidades esperadas e observadas foram obtidas por meio do programa Genepop 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). A verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg, que parte da hipótese nula da união aleatória de gametas, foi efetuada por um teste análogo ao teste exato de Fisher (Guo & Thompson, 1992) e os

valores de P foram estimados pelo método de cadeia de Markov-Monte Carlo disponível neste mesmo software.

Ainda utilizando o Genepop, foi verificada a presença de desequilíbrio de ligação. O programa cria tabelas de contingência para cada par de locos, realiza um teste de probabilidade (ou teste exato de Fisher) para cada tabela e pela cadeia de Markov são estimados os valores de P que indicam se as frequências genotípicas entre os dois locos são independentes.

Valores de diversidade gênica (Nei, 1987) e da riqueza alélica (Petit *et al.*, 1998) foram obtidos por meio do programa FSTAT (Goudet, 1995). Ao contrário dos valores de heterozigosidade e do número de alelos, a diversidade gênica e a riqueza alélica são parâmetros independentes do tamanho amostral, por isso, podem ser comparados mesmo entre amostras de diferentes tamanhos.

Estimativas do coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) (Weir & Cockerham, 1984) foram calculadas com a utilização do FSTAT. A fim de verificar se os valores de  $F_{IS}$  diferiram significativamente de zero, populações de genótipos foram re-criadas randomicamente pelo programa, partindo da hipótese nula de união aleatória de gametas. Foi calculado o  $F_{IS}$  para cada uma destas populações (distribuição nula). A proporção de valores de  $F_{IS}$  presentes nesta distribuição que foram maiores que o valor observado ( $P_L$ ) nos indica se há ou não um déficit de heterozigotos. Ao contrário, a proporção de valores de  $F_{IS}$  menores que o valor observado ( $P_S$ ) nos indica se há excesso de heterozigotos.

Os níveis de significância críticos para os testes múltiplos foram corrigidos seguindo o procedimento de Bonferroni seqüencial (Rice, 1989).

#### **4.7.2. Diferenciação genética entre as populações**

A existência de diferenciação significativa quanto à distribuição gênica e genotípica entre as populações foi verificada com a utilização do software Genepop 3.4 (Raymond & Rousset, 1995). Para se testar a hipótese nula de que a “distribuição alélica ou genotípica é idêntica entre as populações”, tabelas de contingência são construídas e no caso da diferenciação gênica, é utilizado o teste exato de Fisher e para a diferenciação genotípica o teste G (Goudet *et al.*, 1996) é utilizado, e os valores de P estimados pela cadeia de Markov.

A diferenciação genética entre as populações também foi estimada por meio do  $F_{ST}$  (Weir & Cockerham, 1984). O  $F_{ST}$  assume o modelo de mutação de alelos infinitos ou IAM (*Infinite Alleles Mutation*) (Kimura & Crow, 1964), o qual considera que cada mutação sempre cria um novo alelo a uma determinada taxa de mutação  $\mu$  e conseqüentemente não admite homoplasia. Os valores de  $F_{ST}$  foram calculados com a utilização do FSTAT. A significância dos valores obtidos foi testada por um procedimento de permutação (intervalo de confiança 95% e 10000 réplicas) implementado no programa.

Foi utilizado somente o  $F_{ST}$ , pois além de ser o índice mais utilizado para estimar a distância genética entre populações de peixes (O’Connell &

Wright, 1997), é o mais indicado em estudos que contenham amostras de tamanho moderado a pequeno (menor que 50) e utilize menos do que 10 locos, e também, quando o número de migrantes é alto, o que torna a migração um fator mais importante do que as mutações (Gaggiotti *et al.*, 1999). Os valores de P estimados para estes testes múltiplos foram ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial (Rice, 1989).

A estrutura populacional baseada nos genótipos dos indivíduos foi examinada usando o procedimento Bayesiano modelo-baseado, implementado no software Structure 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Por meio deste programa é possível a determinação do número de populações genéticas (K) com base nos genótipos fornecidos (X) sem que sejam dadas informações prévias sobre os locais de origem dos indivíduos analisados. Essas populações são *clusters* com distintas frequências alélicas. Simultaneamente é realizado um *assignment test* onde os indivíduos são direcionados probabilisticamente a um ou a mais de um *cluster* quando as populações são geneticamente misturadas. Por meio da cadeia de Markov-Monte Carlo (período de *burn-in* 20.000, 50.000 réplicas) foram testados modelos com K=1, 2, 3, 4 e 5 populações, replicados por três vezes, assumindo o “modelo de mistura” e com “frequências alélicas correlacionadas”.

---

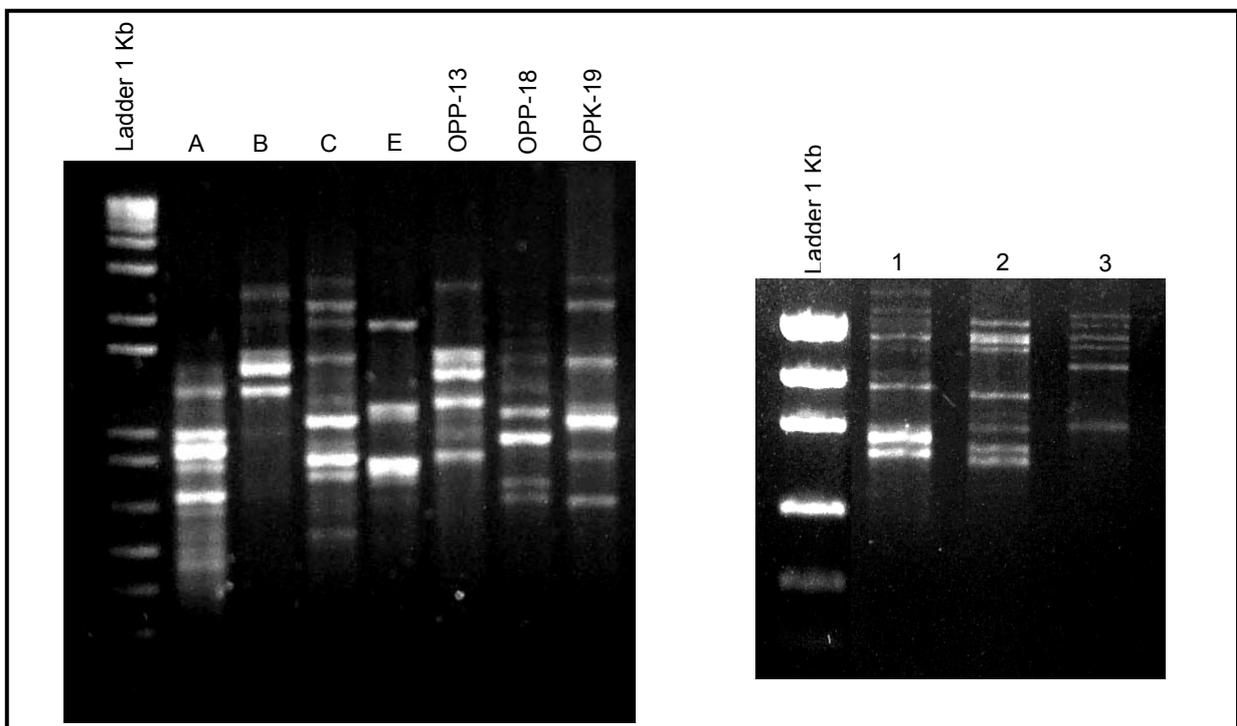
# RESULTADOS

---

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Prospecção dos microssatélites

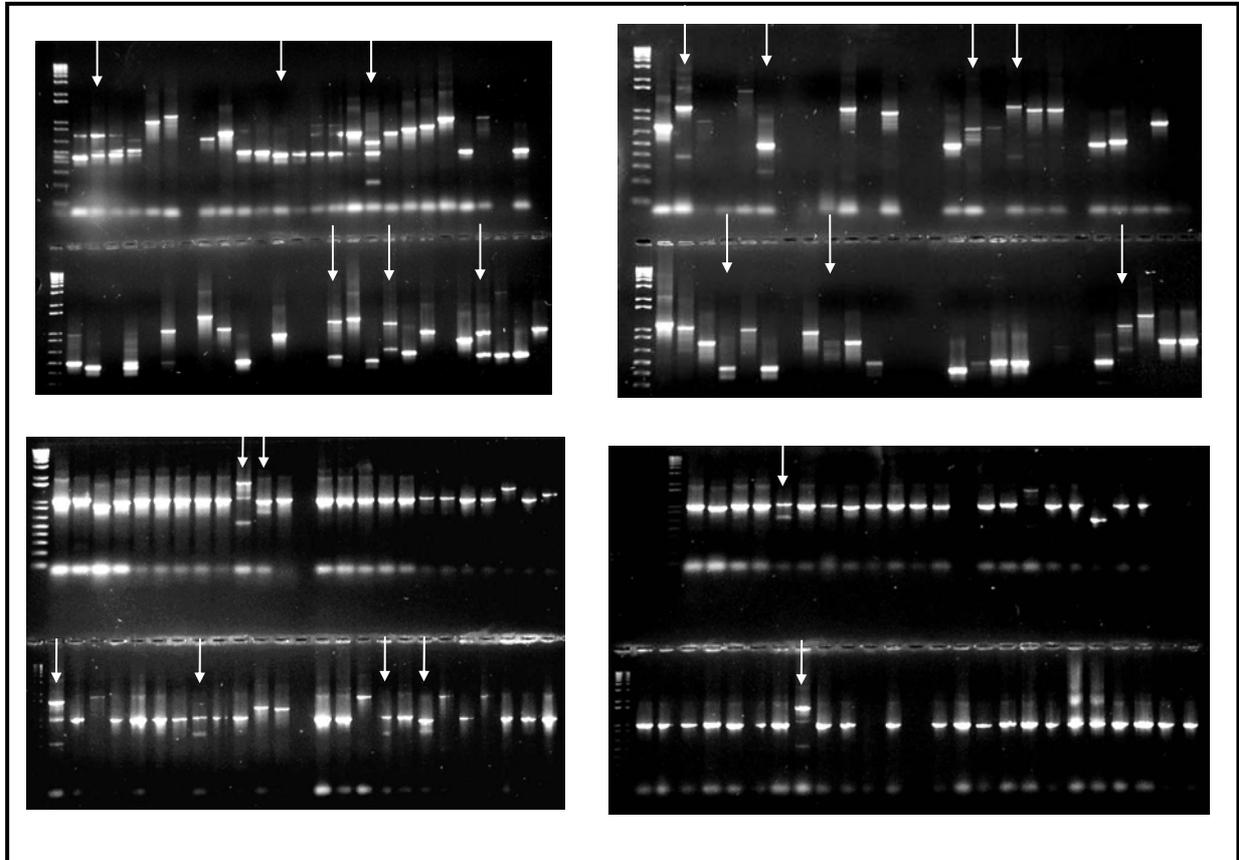
A partir dos treze *primers* decâmeros de RAPD (Tabela 3) testados, dez foram selecionados, pois apresentaram um grande número de fragmentos amplificados (Figura 6).



**Figura 6:** Produto da RAPD-PCR com a utilização dos *primers* A, B, C, E, OPP-13, OPP18, OPK-19, 1, 2 e 3.

Depois de purificados e ligados aos plasmídeos, foram realizadas PCR de 1056 colônias recombinantes com os *primers* do vetor e o *repeat*-específico. Destas reações um total de 86 amostras (8,15 %) apresentaram uma banda adicional (Figura 7), indicando a presença de uma possível

sequência repetitiva. Após as mini-preparações para a obtenção dos plasmídeos, todas essas amostras foram seqüenciadas.



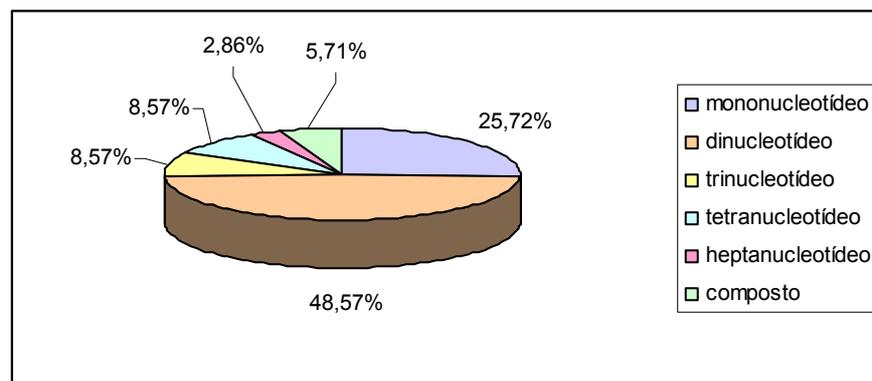
**Figura 7:** Géis de agarose (1%) após eletroforese, evidenciando os produtos da amplificação, a partir das colônias recombinantes obtidas, com a utilização dos *primers* dos vetores (*pUC/M13 Forward e Reverse*) e do *primer repeat*-específico. As setas indicam as amostras que apresentaram uma banda extra, sendo assim selecionadas para posterior seqüenciamento.

Aproximadamente 41% das 86 seqüências analisadas continham microssatélites. Foram encontrados trinta e cinco microssatélites (Tabela 4), sendo a grande maioria composta de dinucleotídeos (48,57%) (Figura 8). A maior parte das repetições dinucleotídicas foi do tipo (GT)<sub>n</sub>. Uma quantidade considerável de *repeats* mononucleotídeos (25,72%) foi detectada. Foram

detectadas ainda, em menores quantidades, seqüências trinucleotídicas, tetranucleotídicas, um heptanucleotídeo, além de microssatélites compostos.

**Tabela 4:** Relação dos microssatélites encontrados em *Brycon hilarii*

Unidade repetitiva	Nº	Porcentagem	Nº Perfeitos	Nº Imperfeitos
Mononucleotídeo	9	25,72	9	-
Dinucleotídeo	17	48,57	6 (35,29%)	11 (64,71%)
Trinucleotídeos	3	8,57	3	-
Tetranucleotídeo	3	8,57	3	-
Heptanucleotídeo	1	2,86	1	-
Composto	2	5,71	-	2
Total	35	100	22(62,857%)	13 (37,143%)



**Figura 8:** Relação e distribuição dos diferentes tipos de microssatélites encontrados em *Brycon hilarii*

Não foi possível a construção de *primers* para todos os microssatélites prospectados, pois alguns estavam localizados nas porções finais das seqüências ou as seqüências flanqueadoras não possuíam

qualidade confiável. Foram desenhados *primers* para dezessete locos (Tabela 5). Após a padronização das condições das reações de PCR para cada loco, a análise do polimorfismo dos mesmos indicou que dez locos mostraram-se polimórficos.

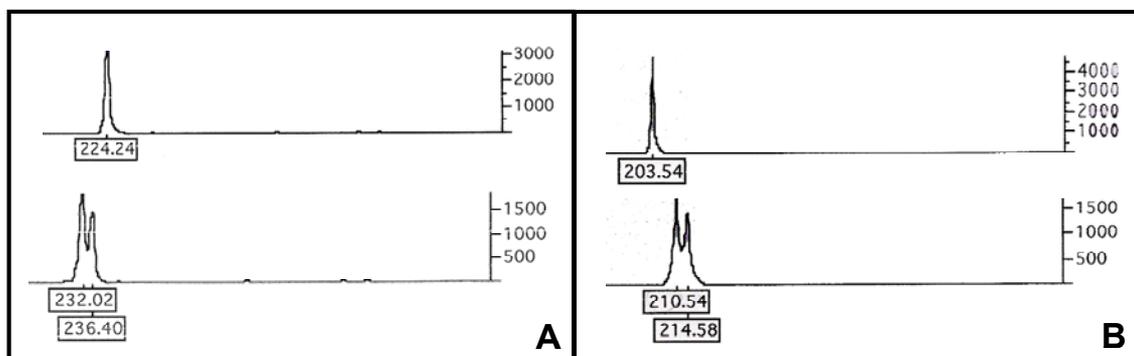
**Tabela 5:** Características dos 17 locos isolados de *Brycon hilarii*

Loco	Unidade Repetitiva	Tamanho do fragmento (pb)	Presença de polimorfismo
Bh1	(AT) <sub>7</sub>	215	Sim
Bh2*	(GT) <sub>5</sub> TT(GT) <sub>5</sub>	235	-
Bh3	(GT) <sub>7</sub>	200	Sim
Bh4	(GT) <sub>3</sub> TT(GT) <sub>4</sub>	206	Não
Bh5	(GT) <sub>13</sub>	224	Sim
Bh6	(GT) <sub>14</sub>	184	Sim
Bh7	(GT) <sub>5</sub> TT(GT) <sub>3</sub>	194	Não
Bh8	(GAT) <sub>5</sub>	177	Sim
Bh9	(GT) <sub>4</sub> TT(GT) <sub>4</sub>	175	Não
Bh10*	(TA) <sub>4</sub> C(TA) <sub>3</sub>	229	-
Bh11	(GCAGTTA) <sub>3</sub>	219	Não
Bh12*	(GCTA) <sub>4</sub>	190	-
Bh13	(AT) <sub>7</sub>	155	Sim
Bh14	(TTA) <sub>8</sub>	148	Sim
Bh15	(ATTT) <sub>5</sub>	130	Sim
Bh16	(TAA) <sub>8</sub>	140	Sim
Bh17	(GTTT) <sub>2</sub> (GGTTT)(GTTT) <sub>2</sub> (GGTTT) <sub>3</sub>	170	Sim

\* locos sem resultado satisfatório

## 5.2. Genotipagem dos exemplares de *Brycon hilarii*

O método "one-tube, single-reaction nested PCR method" descrito por Schuelke (2000), utilizado inicialmente como teste na amplificação do loco de microssatélite Bh5 (GT)<sub>13</sub> demonstrou resultados bastante satisfatórios. Como pode ser observado na Figura 9, o padrão obtido de intensidade dos picos são comparáveis com aqueles produzidos pelo método convencional de genotipagem. No entanto, o tamanho dos alelos produzido entre os dois procedimentos é obviamente diferente já que no método de Schuelke (2000) o *primer Forward* é maior, pois contém a cauda M13(-21) em seu final 5'. Desta forma, todos os indivíduos a serem analisados em determinado trabalho, devem ser genotipados por um mesmo método.



**Figura 9:** Análise comparativa do produto da amplificação do loco Bh5 produzido em 2 exemplares de *Brycon hilarii* através A) método de Schuelke (2000) de genotipagem e B) metodologia convencional com um dos *primers* do loco marcado fluorescentemente. A intensidade do sinal pode ser observado ao lado direito

Visto que os resultados obtidos por meio da metodologia testada foram positivos, e ainda visando a redução de custo e o rendimento do trabalho, este método foi adotado para a caracterização dos locos e genotipagem dos indivíduos para a análise populacional.

### **5.3. Caracterização dos locos microssatélites prospectados**

Foi possível a caracterização de sete dos dez locos polimórficos pré-existentes, pois três deles (Bh1, Bh3, Bh14), apesar de serem polimórficos apresentando acima de dois alelos, o padrão obtido na PCR foi bastante confuso. Uma amostra que ora amplificava, em outra PCR já não mais amplificava. Além disso, apresentaram um pobre desempenho em PCR, com bandas muito fracas. Para estes locos um maior esforço de padronização foi despendido, sem nenhum resultado.

Os sete locos que foram caracterizados em uma amostra de trinta indivíduos de *Brycon hilarii* revelaram uma substancial variação genética (Tabela 6). Juntos produziram um total de 39 alelos diferentes, variando de 3 a 8 alelos por loco, com uma média de 5,57. A heterozigosidade esperada variou de 0,31 (Bh16) a 0,81 (Bh17), enquanto a observada variou de 0,27 (Bh16) a 0,83 (Bh13 e Bh17).

Somente o loco Bh6, não se mostrou sob as expectativas de Hardy-Weinberg ( $P=0,03$ ). Este loco demonstrou uma significativa deficiência de heterozigotos. Dos 21 pares de locos analisados quanto ao desequilíbrio genotípico, dois (Bh8 x Bh13, Bh6 x Bh17) apresentaram valores significativos

e podem estar ligados ( $P=0,032$  e  $P=0,007$ , respectivamente). Porém, após a correção de Bonferroni seqüencial o loco Bh6 se mostra em equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P=0,21$ ) e os dois pares de locos (Bh8 x Bh13, Bh6 x Bh17) não demonstraram estar em desequilíbrio genotípico ( $P=0,67$  e  $P=0,15$ , respectivamente). Os dados estão apresentados na tabela 6 sem considerar a correção de Bonferroni, já que foram assim publicados (ver Sanches & Galetti, 2006).

Os *primers* utilizados na amplificação das 5 outras espécies de *Brycon*, produziram alelos de tamanhos esperados. No entanto, nem todos os locos foram polimórficos para essas espécies. Inclusive, no caso de *B. falcatus*, nenhum dos locos exibiu um perfil polimórfico. Vale ressaltar que a qualidade dos DNAs dessas espécies estava bastante comprometida, já que estavam estocados a muitos anos em nosso laboratório. E ainda, foram utilizados dois indivíduos de cada espécie, porém muitas vezes somente um único produziu algum produto de PCR.

**Tabela 6:** Caracterização de sete locos microssatélites de *Brycon hilarii*. Número de alelos ( $N_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e valor de significância, ajustado pela correção de Bonferroni sequencial, para equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P_{HW}$ ). Números de Acesso no GenBank: DQ408242- DQ408248.

Loco	Seqüência dos <i>primers</i> (5'-3')	Unidade Repetitiva	$N_a$	Amplitude (bp)	$H_o/H_e$	$P_{HW}$	Amplificação heteróloga/ amplitude (bp)				
							<i>Brycon orthotaenia</i>	<i>Brycon orbignyanus</i>	<i>Brycon falcatus</i>	<i>Brycon cephalus</i>	<i>Brycon insignis</i>
Bh5	F: CTCCACTCATACCGGCACT R: ACATCTGGCATTAGGCATAG	(CA) <sub>13</sub>	7	204-220	0.76/0.81	0.63	214-220	204-208	-	216-218	218
Bh6	F: GCGTTGCGTGTGTATGTAA R: AGAGGTGTCCACAAAGTTTT	(CA) <sub>14</sub>	6	160-184	0.57/0.67	0.03*	164-180	172-172	-	180-184	172-208
Bh8	F: CCATGGCTCAACACAGATAT R: TGTACGAATCCTGAAATGCT	(GAT) <sub>5</sub>	8	127-196	0.77/0.76	0.21	185	181-187	176	189-198	186-189
Bh13	F: AGCAATTTAAGCAAGTGAAG R: GCGTCGGAGCAGTAGTTATA	(AT) <sub>7</sub>	5	120-160	0.83/0.78	0.65	135-143	148-152	168	158	158
Bh15	F: GAGAGCATTGTCAGGATTTA R: ACTAATGACTGCTACTGCGG	(ATTT) <sub>5</sub>	3	130-142	0.53/0.53	1	138	138	-	130-150	130
Bh16	F: CCTCCAATGAAAACAGTGCG R: ACGACTTAGCCACCCACCCT	(TAA) <sub>8</sub>	3	141-147	0.27/0.31	0.10	144-153	144-150	144	141	141
Bh17	F: GTCAGCACTCAGCACATAGC R: AGAGAGCCTGAAAGTGAGTC	(GTTT) <sub>4</sub> (GGTTT) <sub>3</sub>	7	152-212	0.83/0.81	0.82	-	226	105	220-228	214-219

#### **5.4. Análise da variabilidade genética intrapopulacional**

Considerando que não houve diferenças significativas entre as análises realizadas separadamente para os períodos de seca e de chuvas nas localidades amostradas, exceto para a amostra Mi2 (dados não apresentados), os exemplares de cada localidade foram agrupados, melhorando a representação amostral dos locais estudados.

Uma considerável variabilidade genética foi observada entre os 180 exemplares de *B. hilarii* distribuídos entre as cinco amostras. Nenhum dos pares de locos demonstrou estar em desequilíbrio de ligação (Tabela 7), indicando que não são ligados, e conseqüentemente são independentes.

**Tabela 7:** Probabilidades da ocorrência de desequilíbrio de ligação (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) entre os sete locos de *B. hilarii*, considerando-se as cinco amostras conjuntamente.

Par de locos	P
Bh5 X Bh6	0,296
Bh5 X Bh8	0,996
Bh6 X Bh8	0,251
Bh5 X Bh13	0,868
Bh6 X Bh13	0,639
Bh8 X Bh13	0,272
Bh5 X Bh15	0,993
Bh6 X Bh15	0,951
Bh8 X Bh15	0,833
Bh13 X Bh15	0,407
Bh5 X Bh16	0,252
Bh6 X Bh16	0,606
Bh8 X Bh16	0,681
Bh13 X Bh16	0,994
Bh15 X Bh16	0,287
Bh5 X Bh17	0,796
Bh6 X Bh17	0,124
Bh8 X Bh17	0,883
Bh13 X Bh17	0,565
Bh15 X Bh17	0,987
Bh16 X Bh17	0,958

Dois locos, Bh6 e Bh13, não se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg em algumas das localidades (Tabela 9). Este resultado foi também evidenciado pelos valores de  $F_{IS}$  significativamente diferentes de zero ( $P_L$ ), indicando um déficit significativo de heterozigotos.

Um total de 57 alelos foi identificado, variando de 37 a 45 alelos por amostra (média de 41,4 alelos por amostra) (Tabela 8). O número total de alelos por loco variou de 4 (Bh16) a 11 (Bh8 e Bh17), com uma média de 8,14 alelos por loco. Para cada população foi encontrado um mínimo de 2 alelos a um máximo de 9 alelos por loco, com uma média de 5,91 alelos por loco por população. Foram detectados 10 alelos exclusivos, pelo menos 1 em cada localidade, estando a maioria (5) entre os indivíduos da amostra Mi2.

A riqueza alélica variou de 2,0 (Bh15/Fo1) a 8,36 (Bh17/Px) (Tabela 9). A heterozigosidade observada variou de 0,21 (Bh6/Mi1) a 0,85 (Bh17/Mi1) e a heterozigosidade esperada de 0,28 (Bh16/Fo2) a 0,86 (Bh17/Px e Mi1) (Tabela 9). A diversidade gênica foi observada desde 0,285 (Bh16/Fo2) a 0,866 (Bh17/Px). No entanto, com base nestes parâmetros, o teste de Kruskal-Wallis não identificou nenhuma diferença significativa entre as amostras.

**Tabela 8:** Freqüência e número total ( $N_a$ ) dos alelos e número de alelos privados ( $N_{ap}$ ) detectados com sete locos de microssatélites em 5 amostras de *B. hilarii*.

Loco	Alelo	Freqüências alélicas				
		Fo1	Fo2	Px	Mi1	Mi2
Bh5	200	0,000	0,000	0,000	0,019	0,009
	204	0,259	0,271	0,300	0,296	0,207
	206	0,130	0,083	0,086	0,074	0,086
	210	0,000	0,000	0,057	0,019	0,095
	212	0,037	0,042	0,029	0,019	0,026
	214	0,389	0,354	0,243	0,278	0,267
	216	0,130	0,167	0,214	0,204	0,267
	218	0,037	0,021	0,029	0,074	0,034
	220	0,000	0,063	0,043	0,019	0,009
	222*	0,019	0,000	0,000	0,000	0,000
	$N_a$		7	7	8	9
$N_{ap}$		1	0	0	0	0
Bh6	160	0,060	0,125	0,029	0,000	0,035
	164	0,000	0,000	0,043	0,000	0,061
	166	0,020	0,000	0,000	0,017	0,000
	170	0,080	0,000	0,000	0,034	0,000
	172	0,420	0,521	0,600	0,483	0,649
	178	0,120	0,083	0,071	0,017	0,088
	180	0,040	0,125	0,043	0,103	0,018
	182*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009
	184	0,260	0,146	0,214	0,345	0,140
	$N_a$		7	5	6	6
$N_{ap}$		0	0	0	0	1
Bh8	127*	0,000	0,000	0,000	0,018	0,000
	130	0,000	0,021	0,000	0,018	0,017
	133*	0,000	0,021	0,000	0,000	0,000
	136	0,446	0,396	0,528	0,411	0,383
	142	0,054	0,000	0,014	0,000	0,000
	178	0,054	0,063	0,014	0,054	0,000
	187	0,036	0,000	0,028	0,054	0,042
	190	0,143	0,188	0,208	0,143	0,192
	193	0,054	0,062	0,083	0,089	0,025
	196	0,214	0,250	0,125	0,214	0,142
	202*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,200
$N_a$		7	7	7	8	7
$N_{ap}$		0	1	0	1	1
Bh13	118*	0,083	0,000	0,000	0,000	0,000
	120	0,063	0,196	0,122	0,179	0,074
	146	0,104	0,174	0,176	0,143	0,156
	150	0,458	0,217	0,203	0,196	0,254
	156	0,250	0,087	0,351	0,339	0,377

	158	0,042	0,326	0,149	0,143	0,139
	N <sub>a</sub>	6	5	5	5	5
	N <sub>ap</sub>	1	0	0	0	0
	130	0,370	0,432	0,288	0,404	0,425
	134*	0,000	0,000	0,045	0,000	0,000
Bh15	138	0,000	0,023	0,030	0,000	0,008
	142	0,630	0,545	0,591	0,558	0,542
	146*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025
	150	0,000	0,000	0,045	0,038	0,000
	N <sub>a</sub>	2	3	5	3	4
	N <sub>ap</sub>	0	0	1	0	1
	141	0,071	0,045	0,111	0,093	0,068
Bh16	144	0,690	0,841	0,708	0,759	0,763
	147	0,238	0,114	0,167	0,148	0,161
	150	0,000	0,000	0,014	0,000	0,008
	N <sub>a</sub>	3	3	4	3	4
	N <sub>ap</sub>	0	0	0	0	0
	148	0,158	0,130	0,162	0,148	0,098
	152	0,263	0,196	0,203	0,148	0,141
	160	0,000	0,000	0,041	0,019	0,000
	164	0,211	0,174	0,149	0,130	0,228
	168	0,132	0,087	0,068	0,074	0,087
Bh17	172	0,132	0,065	0,081	0,111	0,152
	176	0,000	0,000	0,014	0,000	0,033
	184*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011
	196	0,053	0,326	0,189	0,259	0,000
	208	0,053	0,022	0,095	0,111	0,239
	212*	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011
	N <sub>a</sub>	7	7	9	8	9
	N <sub>ap</sub>	0	0	0	0	2
	N <sub>a</sub> total por local	39	37	44	42	45
	N <sub>a</sub> médio por loco/local	5,57	5,29	6,29	6,00	6,43
	N <sub>ap</sub> total por local	2	1	1	1	5

---

\*alelos exclusivos

**Tabela 9:** Número de indivíduos analisados (N), número de alelos ( $N_a$ ), riqueza alélica ( $R_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_E$ ), coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) e diversidade gênica (DG) referente à análise de *B. hilarii* amostrados em quatro localidades.  $P_{HW}$  é o valor da significância para teste de Hardy-Weinberg.  $P_L$  e  $P_S$  são, respectivamente, as probabilidades dos valores de  $F_{IS}$  serem significativamente maiores ou menores que zero (10000 randomizações). Os valores de P foram ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial.

	<b>N</b>	<b><math>R_a</math></b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_E</math></b>	<b><math>P_{HW}</math></b>	<b><math>F_{IS}</math></b>	<b><math>P_L</math></b>	<b><math>P_S</math></b>	<b>DG</b>
<b><u>Fo1</u></b>									
Bh5	27	6,54	0,81	0,76	0,718	-0,075	0,841	0,314	0,76
Bh6	25	6,69	0,36	0,74	0,003*	0,522	0,048*	1,000	0,75
Bh8	28	6,81	0,82	0,74	0,222	-0,116	0,946	0,182	0,74
Bh13	24	5,95	0,42	0,72	0,040*	0,426	0,050*	1,000	0,73
Bh15	27	2,00	0,44	0,47	1	0,066	0,557	0,716	0,48
Bh16	21	3,00	0,33	0,47	0,147	0,300	0,087	0,978	0,48
Bh17	19	7,00	0,47	0,84	0,138	0,445	0,056	1,000	0,85
Média	24,4	5,43	0,52	0,68	0,000*	0,233	0,007*	1,000	0,68
<b><u>Fo2</u></b>									
Bh5	24	6,74	0,75	0,78	0,515	0,035	0,480	0,727	0,78
Bh6	24	5,00	0,42	0,68	0,152	0,396	0,056	1,000	0,69
Bh8	24	6,57	0,71	0,75	0,502	0,060	0,380	0,780	0,75
Bh13	23	5,00	0,43	0,79	0,003*	0,453	0,079	1,000	0,79
Bh15	22	2,86	0,36	0,53	0,186	0,316	0,100	0,975	0,53
Bh16	22	2,98	0,27	0,28	0,431	0,042	0,446	0,729	0,29
Bh17	23	6,82	0,69	0,81	0,469	0,148	0,100	0,969	0,82
Média	23,1	5,14	0,52	0,66	0,000*	0,216	0,007*	1,000	0,66
<b><u>Px</u></b>									
Bh5	35	7,45	0,57	0,80	0,226	0,291	0,105	1,000	0,81
Bh6	35	5,60	0,49	0,59	0,551	0,183	0,062	0,980	0,59
Bh8	36	5,83	0,67	0,66	0,958	-0,005	0,607	0,586	0,66
Bh13	37	5,00	0,65	0,78	0,440	0,168	0,729	0,991	0,78
Bh15	33	4,68	0,63	0,57	0,177	-0,115	0,880	0,230	0,57
Bh16	36	3,53	0,33	0,46	0,062	0,285	0,31	0,998	0,47
Bh17	37	8,36	0,78	0,86	0,360	0,095	0,137	0,923	0,87
Média	35,5	5,78	0,59	0,67	0,006*	0,131	0,007*	1,000	0,68
<b><u>Mi1</u></b>									
Bh5	27	7,80	0,74	0,79	0,796	0,071	0,301	0,85	0,80
Bh6	29	5,19	0,21	0,65	0,000*	0,684	0,049*	1,00	0,65
Bh8	28	7,30	0,79	0,76	0,733	-0,029	0,720	0,49	0,76
Bh13	28	5,00	0,68	0,79	0,106	0,141	0,120	0,94	0,79
Bh15	26	2,93	0,73	0,54	0,081	-0,377	0,994	0,70	0,53

Bh16	27	2,30	0,33	0,40	0,205	0,170	0,210	0,91	0,40
Bh17	27	7,70	0,85	0,86	0,681	0,007	0,540	0,65	0,86
Média	27,4	5,46	0,62	0,68	0,000*	0,097	0,01*	0,99	0,68
<b><i>Mi2</i></b>									
Bh5	58	7,13	0,69	0,80	0,123	0,142	0,520	0,99	0,80
Bh6	57	5,63	0,42	0,55	0,21	0,237	0,116	1,00	0,55
Bh8	60	6,07	0,82	0,76	0,743	-0,075	0,883	0,19	0,76
Bh13	61	4,97	0,56	0,75	0,08	0,259	0,081	1,00	0,75
Bh15	60	3,00	0,53	0,53	0,210	-0,007	0,554	0,55	0,53
Bh16	59	3,28	0,31	0,39	0,49	0,221	0,927	0,99	0,39
Bh17	46	7,61	0,80	0,84	0,594	0,041	0,274	0,84	0,84
Média	57,3	5,38	0,59	0,66	0,035*	0,108	0,007*	1,00	0,66

### 5.5. Análise da estrutura genética populacional de *B. hilarii*

Foi observada uma significativa diferenciação gênica em seis das dez comparações entre as amostras, indicando que a distribuição dos alelos é significativamente diferente entre essas amostras (Tabela 10). Por outro lado, a distribuição genotípica revelou ser significativamente diferente entre o cardume em migração reprodutiva (Mi2) e todas as outras amostragens (Tabela 10). Este resultado foi também revelado pelo índice de fixação, com baixos, porém significativos valores de  $F_{ST}$  (Tabela 11). Portanto, somente os peixes que migravam no Rio Miranda durante o período reprodutivo foram geneticamente diferentes de todos aqueles das outras amostras, incluindo os capturados no mesmo local da rota migratória do cardume em questão.

**Tabela 10:** Valores de P (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) referentes à análise de diferenciação gênica (diagonal acima) e genotípica (diagonal abaixo) entre cinco amostragens de *Brycon hilarii*.

	Diferenciação gênica (P)	Diferenciação genotípica (P)
Fo1 x Fo2	0,009*	0,201
Fo1 x Px	0,040*	0,299
Fo1 x Mi1	0,130	0,168
Fo1 x Mi2	0,000*	0,000*
Fo2 x Px	0,129	0,141
Fo2 x Mi1	0,100	0,284
Fo2 x Mi2	0,000*	0,000*
Px x Mi1	0,657	0,829
Px x Mi2	0,000*	0,000*
Mi1 x Mi2	0,000*	0,000*

**Tabela 11:** Valores de  $F_{ST}$  e valores de P (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) entre 5 amostragens de *B. hilarii*.

	$F_{ST}$	P
Fo1 x Fo2	0,0160	0,210
Fo1 x Px	0,0075	0,052
Fo1 x Mi1	0,0048	0,070
Fo1 x Mi2	0,0196	0,040*
Fo2 x Px	0,0083	0,135
Fo2 x Mi1	0,0001	0,220
Fo2 x Mi2	0,0302	0,035*
Px x Mi1	-0,0062	0,765
Px x Mi2	0,0091	0,048*
Mi1 x Mi2	0,0151	0,045*

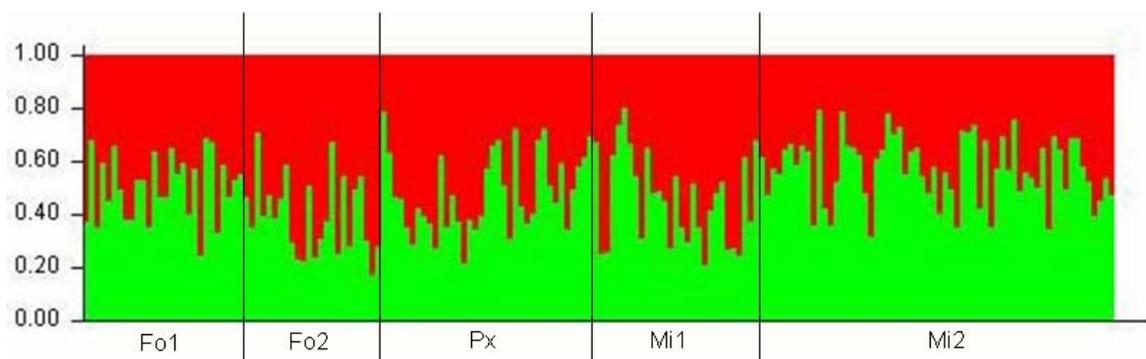
Quando os genótipos dos 180 exemplares, independentes do local de origem, foram fornecidos à análise Bayesiana implementada no programa Structure 2.1, foi encontrada uma grande probabilidade que indica a existência de 2 populações genéticas de *B. hilarii* ( $K=2$ ,  $P(K/X)=0,99$ , Tabela 12) no sistema estudado. O *assignment test* mostrou que o cardume reprodutivo é geneticamente mais homogêneo. Aproximadamente 75% dos indivíduos deste cardume apresentaram maior grau de parentesco com um dos *clusters* (verde, Figura 10), em contraste com somente 42% dos indivíduos das outras amostras que foram direcionados a este mesmo *cluster*. Este resultado corrobora com a distância genética significativa, demonstrada pelo  $F_{ST}$ , entre este cardume e as demais amostragens. Além disso, a Figura 10 sugere que as duas populações parecem coexistir por todas as localidades e que possivelmente ocorre fluxo gênico entre elas.

Os mesmos resultados foram obtidos quando os locos Bh6 e Bh13, os quais se mostraram em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, foram excluídos da análise da estrutura populacional de *B. hilarii* (dados não apresentados).

**Tabela 12:** Probabilidade,  $P(K/X)$ , para cada um dos possíveis modelos populacionais testados ( $K=1, 2, 3, 4,$  e  $5$  populações) pelo software *Structure* (*burn-in* 20.000, 50.000 réplicas) para *B. hilarii* amostrados na sub-bacia do Rio Miranda (Bonito – MS/ Brazil).

K	<i>Estimated -ln</i>	
	<i>Probability of Data</i>	P (K/X)
1	-3407.6	2.25 E-05
2	-3396.9	0.999977
3	-3475.4	8.088 E-35
4	-3475.9	4.906 E-35
5	-3801.7	1.576 E-176

**Figura 10:** Gráfico com mais alto valor de probabilidade para  $K=2$ , resultante da análise de agrupamento não-orientado realizada pelo software *Structure* (*burn-in* 20.000, 50.000 réplicas). Cada indivíduo de *B. hilarii* está representado por uma linha ou barra vertical cuja cor indica o coeficiente de parentesco (escala à esquerda) para os dois *clusters* alternativos, *cluster* verde e *cluster* vermelho.



---

# DISCUSSÃO

---

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. Aplicação de metodologias alternativas na prospecção e genotipagem dos locos microssatélites em *Brycon hilarii*

Dentre os marcadores moleculares atualmente disponíveis, os microssatélites estão entre os mais utilizados (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). Isto porque apresentam inúmeras vantagens já bem conhecidas como, por exemplo, seu alto caráter polimórfico, além de serem co-dominantes, abundantes e dispersos por todo o genoma (DeWoody & Avise, 2000; O'Reilly & Wright, 1995). Somado a isso, podem ser facilmente analisados por PCR utilizando-se pequenas quantidades de DNA. Uma das maiores dificuldades que poderia comprometer o uso de tais marcadores é o tempo, trabalho e dinheiro gastos com métodos de isolamento desses *repeats* e suas respectivas seqüências flanqueadoras (O'Connell & Wright, 1997). Com o intuito de diminuir principalmente o custo é que optamos em testar a metodologia PIMA (Lunt *et al.*, 1999) para prospecção das seqüências microssatélites de *Brycon hilarii*.

Lunt *et al.* (1999), quando descreveram a técnica, compararam-na com a metodologia padrão que usa hibridização radioativa e uma biblioteca genômica, a partir de *Gadus morhua*. Os autores encontraram que as amostras obtidas por PIMA continham duas vezes mais microssatélites do que aquelas identificadas por hibridização do método tradicional. Ou seja, PIMA tem a habilidade de detectar menos falsos positivos.

O desenvolvimento da metodologia é simples, porém requer bastante trabalho e tempo, como qualquer um dentre outros procedimentos para isolamento de microssatélites. No presente trabalho, aproximadamente 8,15% das colônias analisadas pela PCR foram selecionadas para sequenciamento, pois eram candidatas potenciais em conterem seqüências repetitivas. Em aproximadamente 41% das seqüências analisadas foram encontradas seqüências microssatélites. Apesar de não ter sido realizado o isolamento com a utilização de qualquer outra metodologia e que a quantidade de microssatélites varia entre as espécies, essa percentagem pode ser comparável com aquelas obtidas por meio de outros métodos (O'Reilly *et al.*, 2000; Zane *et al.*, 2002; Bester *et al.*, 2004; Spies *et al.*, 2005).

Atualmente existe uma gama enorme de estratégias para o isolamento de microssatélites e suas seqüências flanqueadoras (Zane *et al.*, 2002) e os microssatélites ou SSRs (*simple sequence repeats*) (Tautz & Renz, 1984; Tautz, 1989) vêm sendo isolados e caracterizados para uma grande variedade de peixes e intensamente aplicados em estudos de genética de populações, análise de parentesco e mapeamento genômico (O'Connell & Wright, 1997).

A amplificação (PCR) dos locos de microssatélites é realizada com os pares de *primers* pré-definidos, os fragmentos são analisados, após eletroforese, diretamente em gel de poliacrilamida, uma metodologia módica, porém bastante trabalhosa e demorada. Uma outra opção é a

detecção de fluorescência em seqüenciadores automáticos, onde um *primer* deve ser marcado com uma das quatro diferentes marcas fluorescentes (Smith *et al.*, 1986). Essa metodologia, por ser bastante fácil e rápida, vem sendo bastante utilizada, apesar de ser bastante cara visto que para cada loco de microssatélite analisado, um *primer* marcado com fluoróforo deve ser adquirido. O custo aumenta substancialmente se um grande número de locos deve ser analisado, como é o caso dos grandes projetos de mapeamento em fina escala (Schuelke, 2000).

Visando um maior rendimento e a redução do custo e do trabalho, é que a metodologia de Schuelke (2000) foi aplicada neste estudo. Algumas modificações importantes foram estabelecidas, as quais provavelmente tornaram este método ainda mais barato. O teste realizado com o loco Bh5 demonstrou que os produtos obtidos por ambos os métodos de genotipagem, foram igualmente consistentes (Figura 9). Porém, como os tamanhos dos alelos produzidos pelos dois métodos são diferentes, é aconselhável que se opte por somente uma metodologia de genotipagem. Uma grande vantagem é que, por exemplo, no caso de laboratórios em que são desenvolvidos trabalhos com diversos tipos de organismos e os mesmos devem ser inspecionados utilizando-se muitos locos, com a utilização desta metodologia um único *primer* marcado M13(-21) é requerido e pode ser utilizado para qualquer loco ou organismo. Ou ainda, mais de um *primer* pode ser adquirido com diferentes fluoróforos, de modo que diferentes locos possam ser analisados conjuntamente para cada indivíduo.

Assim, para o desenvolvimento deste estudo, os métodos aplicados durante as diferentes etapas, foram avaliados de modo que os recursos fossem otimizados. Alternativas como estas, que venham a contornar desperdícios e possibilitar a otimização dos recursos disponíveis, são sempre bem recebidas.

## 6.2. Caracterização dos locos microssatélites de *Brycon hilarii*

Apesar da grande quantidade de trabalhos que são publicados referentes ao isolamento e caracterização de seqüências microssatélites, frente a enorme diversidade de espécies de peixes de água doce brasileiras, existem ainda poucos registros disponíveis (Calcagnotto *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2003; Beheregaray *et al.*, 2004a e 2004b; Beheregaray *et al.*, 2006; Moysés *et al.*, 2005; Revaldaves *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2002 e 2006; Barbosa *et al.*, 2006; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Morelli *et al.*, 2007).

No presente estudo foram caracterizados sete locos de *Brycon hilarii*, esta espécie de grande importância ecológica e econômica para as regiões onde habitam. Dentre estes, 3 são dinucleotídeos, 2 trinucleotídeos, 1 tetranucleotídeo e 1 composto tetra e pentanucleotídeo (Tabela 6). Os *primers* desenhados para todos esses locos produziram ampliações bastante consistentes.

Devido aos diversos problemas envolvidos com os locos de microssatélites dinucleotídeos, muitos pesquisadores vêm investindo cada vez mais na prospecção e utilização dos tri e tetranucleotídicos (O'Reilly *et al.*, 2000). Uma forma de amenizar tal demérito é utilizar aqueles dinucleotídeos de menor comprimento, ou seja, com menos unidades repetitivas (O'Connell & Wright, 1997). Os locos dinucleotídeos prospectados no presente estudo apresentaram um pequeno número de unidades repetitivas (máximo de 15 unidades repetitivas), para os quais não foi

observado padrão “*stutter*” ou “*shadow bands*” (Schlotterer & Tautz, 1992; Hauge & Litt, 1993) e os alelos foram facilmente identificados, inclusive em géis de poliacrilamida.

Os locos isolados revelaram uma moderada variação genética entre os 30 exemplares de *B. hilarii* utilizados para a caracterização. Foi detectado um número relativamente pequeno de alelos, variando de 3 a 8 alelos por loco e uma média de 5,57 alelos por loco. O nível de heterozigosidade observada variou de 27% a 83%, com uma média de 66%. Esta variação é bastante similar com aquelas obtidas para peixes de água doce (Calcagnotto *et al.*, 2001; Farias *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2003; Carvalho-Costa *et al.*, 2006). Em uma revisão onde foram comparadas as variações de microssatélites de peixes que vivem em diferentes ambientes, para os peixes de água doce também foram encontrados valores médios muito similares aos detectados aqui, de 7,5 alelos por loco e 0,46 de heterozigosidade esperada (DeWoody & Avise, 2000).

O reduzido número de alelos, que está relacionado ao pequeno número de *repeats* contido em cada loco, pode muitas vezes se constituir em uma grande vantagem, pois diminui possíveis erros de *scoring* de alelos (O’Reilly *et al.*, 2000). Microssatélites com níveis muito altos de variabilidade não são ferramentas ideais para estudos que comparam a diversidade genética entre populações (O’Connell & Wright, 1997). Além disso, altos níveis de diversidade alélica podem tornar o marcador insensível na detecção de *bottlenecks* severos (O’Connell & Wright, 1997).

Apenas o loco Bh6 não se enquadrou sob o equilíbrio de Hardy-Weinberg, apresentando um déficit de heterozigotos. Apesar de se tratar de um forte indício da ocorrência de alelos nulos, já que nenhum outro loco mostrou-se sob essa condição, esse resultado pode ser mudado depois que mais exemplares forem analisados. O desequilíbrio de ligação detectado para os pares de locos Bh8 X Bh13 e Bh6 X Bh17, pode estar indicando a possibilidade de que os mesmos estejam ligados.

Os *primers* foram também utilizados para a amplificação de outras 5 espécies do gênero: *Brycon orthotaenia*, *B. orbignyanus*, *B. falcatus*, *B. cephalus*, *B. insignis*. A amplificação heteróloga produziu alelos com tamanhos esperados, sem a necessidade de esforço adicional para novas padronizações das reações de PCR. Esse resultado é bastante promissor, pois como foi dito anteriormente, algumas espécies do gênero, incluindo *B. insignis* e *B. orbignyanus*, encontram-se ameaçadas de extinção, e desta forma, esses *primers* são valiosos para avaliação da variabilidade genética dessas espécies.

Portanto, neste estudo foram isolados 7 locos de microssatélites polimórficos de *Brycon hilarii* que produzem amplificações bastante consistentes, podendo ser analisados em gel de poliacrilamida, sem que se necessite de grandes demandas financeiras. Estas características os tornam ferramentas potencialmente úteis para estudos de populações naturais ou de cativeiro tanto para a espécie quanto para outras espécies do gênero.

### **6.3. A variabilidade genética populacional de *Brycon hilarii***

Os locos de microssatélites isolados no presente estudo produziram uma considerável variação genética dentro das amostras de *Brycon hilarii* da sub-bacia do Rio Miranda. Por estas e outras habilidades já conhecidas é que estes marcadores são extremamente utilizados em estudos sobre o monitoramento da variabilidade genética de populações naturais de peixes (O'Connell & Wright, 1997; O'Reilly *et al.*, 2000; Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Os locos Bh6 e Bh13 não se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg, apresentando em algumas das amostras significativos déficits de heterozigotos conforme demonstrado pelos valores de  $F_{IS}$ . Casos como estes são comumente encontrados em estudos com populações de peixes (De Leon *et al.*, 1997; Salgueiro *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006; Narum *et al.*, 2006). Autores apontam como os possíveis responsáveis pelo déficit de heterozigotos a ocorrência de alelos nulos, efeito de Wahlund, cruzamento não-aleatório, endocruzamento ou erro amostral (De Leon *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001). Determinar a causa do déficit de heterozigotos é praticamente impossível, pois é bastante difícil prever como as populações ocorrem no ambiente natural. Assim, o déficit de heterozigotos não pode ser explicado por uma única hipótese, mas a combinação de vários fatores possivelmente esteja colaborando para este resultado.

O número de alelos detectados entre as amostras de *B. hilarii* analisadas foi relativamente pequeno (variação de 2 a 9 alelos por loco por

amostra, média de 5,91), o que já era esperado frente ao reduzido número de *repeats* dos locos analisados. Porém, o mesmo não pode ser dito a respeito da heterozigosidade, onde foi obtida uma proporção média de 57% de heterozigotos por amostra. Em termos comparativos, não existem muitos trabalhos que utilizam os marcadores microssatélites para acessar a estrutura genética populacional de espécies de peixes migradores de rios brasileiros. Para a espécie *Prochilodus argenteus*, da bacia do Rio São Francisco, foi verificado que cada loco utilizado produziu uma média de 6,96 alelos por amostra, similarmente ao que foi observado no presente estudo (Hatanaka *et al.*, 2006). Por outro lado, os autores encontraram uma baixa proporção média de heterozigotos observados (27%) e frente a isto, discutiram sobre a possibilidade da ocorrência de alelos nulos (Hatanaka *et al.*, 2006). Em contraste, no estudo desenvolvido com *Brycon opalinus* foi identificado um valor médio alto de 11,48 alelos por loco por amostra e de maneira bastante similar, uma proporção média de 56% de heterozigotos por amostra (Barroso *et al.*, 2005). Esses valores de número de alelos e de heterozigosidade são comparáveis àqueles obtidos para peixes de água doce ( $N_a=7,5$ ;  $H=0,46$ ) (ver revisão DeWoody & Avise, 2000).

#### **6.4. A estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* e sua importância para programas de conservação**

O entendimento da estrutura genética de populações naturais é imprescindível na tomada de decisões prudentes para o manejo e conservação dos recursos genéticos disponíveis (Laikre *et al.*, 2005). Entretanto, delimitar os limites dessas unidades populacionais é uma tarefa bastante difícil (Carvalho & Hauser, 1994). Muitos pesquisadores têm demonstrado o grande potencial dos marcadores microssatélites na determinação da estrutura genética de diversas espécies de peixes (Estoup *et al.*, 1993a; Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Narum *et al.*, 2004; Hatanaka *et al.*, 2006).

Os marcadores microssatélites utilizados no presente estudo não revelaram uma diferenciação significativa entre as localidades. Considerando todos os diferentes parâmetros da diversidade genética (riqueza alélica, heterozigosidade, diversidade gênica), não foi verificada nenhuma diferença significativa entre as amostras analisadas. Somente a distribuição alélica foi significativamente heterogênea em casos isolados (Fo1xFo2 e Fo1xPx).

Entretanto, o  $F_{ST}$  e os testes de distribuição gênica e genotípica evidenciaram uma significativa diferenciação do cardume reprodutivo coletado no Rio Miranda (Mi2) em relação a todas as outras amostras, inclusive Mi1. Ou seja, os exemplares que compõem este cardume reprodutivo são geneticamente diferenciados daqueles de todas as outras amostras. Cabe lembrar aqui que 50% dos alelos privados detectados no

presente estudo pertenceram aos 62 indivíduos do cardume reprodutivo, enquanto que o restante está disperso entre os 118 peixes remanescentes das outras amostras. Este fato pode também estar contribuindo com a unicidade deste cardume.

A divergência genética do cardume reprodutivo é uma informação valiosíssima visto que amostras de cardumes em migração reprodutiva representam a estrutura genética real das populações de peixes (Laikre et al., 2005).

Na literatura existem vários relatos sobre a diferenciação ou estruturação populacional, principalmente em escala espacial, encontrada para peixes dentro um mesmo sistema hidrográfico (Hassanien et al., 2004; Yamamoto et al., 2004; Wirth & Bernatchez, 2001). Embora em menor intensidade, casos de estruturação populacional também têm sido relatados para peixes brasileiros de água doce (Sivasundar et al., 2001; Almeida et al., 2003), como por exemplo, a diferenciação encontrada entre diferentes locais de amostragem para as espécies *Prochilodus argenteus* (Hatanaka & Galetti, 2003; Hatanaka et al., 2006) e *Brycon orthotaenia* (Wasko & Galetti, 2002) da Bacia do São Francisco. No caso da espécie *Brycon opalinus*, endêmica da Bacia do Paraíba do Sul, análises do DNA mitocondrial e dos marcadores microssatélites revelaram também uma diferenciação populacional na bacia (Hilsdorf et al., 2002; Barroso et al., 2005). Em um estudo anterior com *B. hilarii*, marcadores RAPD identificaram diferenciações significativas entre amostras coletadas nos mesmos locais do atual trabalho

(Sanchez & Galetti, *in press*). Além disso, foram detectadas também diferenças entre diferentes épocas de coleta, embora essas diferenças não tenham sido corroboradas no presente estudo.

Entretanto, não existem informações sobre a composição genética dos grandes cardumes formados pelos nossos peixes migradores durante o período reprodutivo, embora seja uma abordagem crescente nos estudos populacionais de salmonídeos (Laikre *et al.* 2005). Narum *et al.* (2004) encontraram uma complexa estrutura genética populacional em *Oncorhynchus mykiss* da sub-bacia do rio Walla Walla (USA). Os autores encontraram diferenciações entre locais de coleta e entre as duas formas que vivem simpatricamente, a forma residente e anádroma. Também entre os clupeídeos, em um estudo com o arenque (*Clupea harengus*) do Mar Báltico foi identificada uma diferenciação em escala espacial e temporal (Jorgensen *et al.*, 2005). A diferenciação espacial foi significativamente relacionada com as divergências ambientais particulares de cada local (salinidade e a temperatura de superfície). A diferenciação temporal foi atribuída à amostragem sobre diferentes "spawning waves" (ondas reprodutivas), isto é, grupos geneticamente diferenciados de indivíduos que se reproduzem no mesmo local, em diferentes períodos de tempo, porém com alguma sobreposição.

No entanto, ao contrário do ocorre com os salmonídeos, existem pouquíssimas informações a respeito da biologia, em especial da biologia reprodutiva, de nossas espécies. Estas informações juntamente com os

dados genéticos poderiam auxiliar no entendimento de como essas populações mantêm-se geneticamente diferenciadas. Em contrapartida, o rápido desenvolvimento das análises estatísticas para dados moleculares vem auxiliando e possibilitando um exame mais minucioso nos diversos campos de investigações genéticas (Paetkau *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 2000).

A análise dos genótipos de *B. hilarii* por meio do programa Structure detectou, com uma probabilidade de 99,99% a existência de 2 populações no sistema estudado (Tabela 12). O *assignment test* demonstrou que estas duas populações encontram-se distribuídas pelas localidades e que existe mistura entre ambas (Figura 10). Este resultado tornou clara a não diferenciação genética observada entre as diferentes localidades. Mas, considerando o cardume reprodutivo, os indivíduos são aparentemente mais homogêneos entre si, porém ainda existe mistura (75% dos indivíduos desta amostragem apresentaram maior porcentagem de pertencer a um dos *clusters*, representado pela cor verde na Figura 10). Este fato poderia explicar ainda a significativa, porém baixa divergência ( $F_{ST}$  variando de 0,0092 a 0,0302) entre esses peixes e aqueles das outras amostras.

Existe uma grande quantidade de trabalhos que encontram diferenciações genéticas significativas entre populações de peixes, porém com baixos valores de  $F_{ST}$  (Wirth & Bernatchez, 2001; Hatanaka *et al.*, 2006;). Geralmente, esta “fraca” diferenciação é detectada para espécies de peixes potencialmente vágéis que apresentam grande abundância, com

ampla distribuição e que não possuem barreiras visíveis ao fluxo gênico (Jorgensen *et al.*, 2006), como ocorre em *Brycon hilarii*. Tem sido muito discutido ultimamente qual seria a magnitude de  $F_{ST}$  que deveria refletir uma significativa diferenciação entre populações (Laikre *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2005). Laikre *et al.* (2005) alertam que, sob o contexto da conservação, é mais aconselhável considerar a existência de subdivisões populacionais do que tratar uma série de populações distintas como uma única população panmítica, o que poderia resultar em depleção da variação genética.

A detecção de divergência genética acompanhada de fluxo gênico entre diferentes formas reprodutivas simpátricas de espécies de salmões e trutas é bastante comum (Peterson *et al.*, 2001; Narum *et al.*, 2004). O fluxo gênico desempenha um importante papel para a manutenção dessas espécies já que distribui variação genética entre essas diferentes formas reprodutivas (Narum *et al.*, 2004).

Primeiramente, o simples fato de ter sido detectada uma diferenciação significativa entre amostras de *B. hilarii* indica que os peixes deste sistema não formam uma única população panmítica. Para que possa existir mais do que uma população dentro de um sistema contínuo de águas, os peixes que aí habitam devem se organizar em unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas, de forma a manter sua integridade genética. Mesmo que tenha sido observada uma sobreposição entre essas unidades, esta não é suficiente para homogeneizar suas frequências alélicas.

A estruturação genética de *B. hilarii* pode estar sendo mantida por um fenômeno similar às ondas reprodutivas referidas por Jorgensen *et al.* (2005) ou por um comportamento de *homing* frequentemente observado em salmonídeos (Ryman, 1983). Novos estudos em escala temporal e espacial poderão ajudar a esclarecer essa questão.

Segundo Laikre *et al.* (2005), uma unidade populacional básica representa um grupo de indivíduos geneticamente mais homogêneos que se reproduzem aleatoriamente (ou próximo à aleatoriedade) em um particular sítio. É importantíssima a detecção dessas unidades já que representam a estrutura genética real das populações de peixes. Segundo estes autores, diferentes tipos de estruturação genética populacional têm sido detectados, variando desde populações distintas, ocorrência de mudanças genéticas contínuas através do espaço, até casos onde não existe diferenciação. A fundamental diferença entre esses tipos é determinada pelo grau de isolamento e/ou fluxo gênico entre cada unidade populacional.

Antes e depois do período reprodutivo, os peixes de uma determinada população local podem ocupar outros territórios, o que não tem relevância para a estrutura genética da população. Porém, o conhecimento do padrão de distribuição espacial dos peixes durante a fase de forrageamento também é muito importante, pois pode ser crucial no entendimento da biologia e no desenvolvimento de programas de manejo para as espécies.

Assim, os dados obtidos sobre a estrutura genética de *B. hilarii* constituem ferramentas de extrema importância por fornecerem subsídios para o entendimento do comportamento e biologia desses peixes, para programas de manejo de pesca e conservação da espécie.

---

# CONCLUSÕES

---

## 7. CONCLUSÕES

- ✓ Os sete locos de microssatélites prospectados para *Brycon hilarii* no presente estudo foram eficazes na detecção da variabilidade genética das populações estudadas e na amplificação heteróloga de outras espécies do gênero: *Brycon orthotaenia*, *B. orbignyanus*, *B. falcatus*, *B. cephalus*, *B. insignis*.
- ✓ As análises estatísticas dos dados evidenciaram a existência de pelo menos duas populações genéticas de *Brycon hilarii* na extensão amostrada, a despeito de ser uma espécie potencialmente vágil, coexistindo pelos aproximados 350 km de variados ambientes dentro deste curso de água.
- ✓ O cardume reprodutivo, o qual foi significativamente diferente das outras amostras, possivelmente representa uma unidade populacional reunindo indivíduos geneticamente mais semelhantes garantindo a sua integridade genética.
- ✓ Com esses resultados torna-se clara a necessidade de estudos sobre a estrutura genética dos grandes cardumes reprodutivos de espécies de peixes migradoras com o intuito de entender como é e/ou como se mantém a distribuição da diversidade genética dessas espécies no ambiente natural.

- ✓ Este conhecimento possibilita o entendimento da biologia dessas espécies e pode auxiliar na tomada de decisões sobre o manejo e conservação das mesmas.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALJANABI, S. M. & MARTINEZ, I. (1997). Universal and rapid SALT-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25 (22): 4694-693.
- ALMEIDA, F. S.; SODRÉ, L. M. K.; CONTEL, E. P. B. (2003). Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, 26: 301-305.
- BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165.
- BANKS, M.A., BLOUIN, M.S., BALDWIN, B.A., RASHBROOK, V.K., FITZGERALD, H.A., BLANKENSHIP, S.M., HEDGECOCK, D. (1999). Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Heredity*, 90(2): 281-288.
- BARBOSA, A. C. D. R.; CORRÊA, T. C.; GALZERANI, F.; GALETTI, P. M.; HATANAKA, T. (2006) Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes*, 6 (3): 936-938.
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. (2003). Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon*

- opalinus* (Curvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Notes*, 3: 297-298.
- BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, 247: 51-65.
- BATISTA, J. S. & ALVES-GOMES, J. A. (2006). Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, 5 (4): 723-740.
- BEHEREGARAY, L. B.; MÖLLER, L. M.; SCHWARTZ, T. S.; CHAO, N. L.; CACCONE, A. (2004a). Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Molecular Ecology Notes*, 4: 330-332.
- BEHEREGARAY, L. B.; SCHWARTZ, T. S.; MÖLLER, L. M.; CALL, D.; CHAO, N. L.; CACCONE, A. (2004b). A set of microsatellite DNA markers for the one-lined pencilfish *Nannostomus unifasciatus*, an Amazonian flooded forest fish. *Molecular Ecology Notes*, 4: 333-335.
- BEHEREGARAY, L. B.; PIGGOTT, M.; CHAO, N. L.; CACCONE, A. (2006). Development and characterization of microsatellite markers for the Amazonian blackwing hatchefish, *Carnegiella marthae* (Teleostei, Gasteropelecidae). *Molecular Ecology Notes*, 6 (3): 787-788.

- BENSON, G. (1999). Tandem repeats finder: a program to analyse DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27 (2): 573-580.
- BESTER, A. E.; RUHAM, S.; D'AMATO, M. E. (2004). Isolation and characterization of microsatellite markers in the South African abalone (*Haliotis midae*). *Molecular Ecology Notes*, 4: 618-619.
- BOGGIANI, P. C. & COIMBRA, A. M. (1995). Quaternary Limestones of the Pantanal Area, Brazil. *An. Acad. Bras. Ci.*, 67 (3): 343-349.
- BORBA, M. R.; FRACALLOSSI, D. M.; PEZZATO, L. E.; MENOYO, D.; BAUTISTA, J. M. (2003). Growth, lipogenesis and body composition of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) fingerlings fed different dietary protein and lipid concentrations. *Aquatic Living Resources*, 16: 362-369.
- BRAGA, R. A. (1982). Depleção aparente do matrinxã, *Brycon hilarii*, em pesqueiros do Rio São Francisco, Brasil. *B Téc DNOCS*, 40: 175-180.
- BRITSKI, H. A. (1972). Peixes de água doce do estado de São Paulo – sistemática. In: *Poluição e Piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura. p. 79-108.
- BRITSKI, H. A.; SATO, Y.; ROSA, A. B. S. (1988). *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias* (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco). 3ª ed. Minas Gerais, Ministério da Irrigação – CODEVASF. p.115.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. (1999). *Peixes do Pantanal*. EMBRAPA. Brasília.

- BUSSING, W. A. (1993). Fish communities and environmental characteristics of a tropical rain forest river in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 36 (3): 791-809.
- CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DeSALLE, R. (2001). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1: 245-247.
- CALLEN, D. F.; THOMPSON, A. D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H. A.; RICHARDS, R. I.; MULLEY, J. C.; SUTHERLAND, G. R. (1993). Incidence and origin of null alleles in the (AC)<sub>n</sub> microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 52: 922-927.
- CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. (2006). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology Notes*, 6 (2): 818-819
- CARVALHO, G. R. & HAUSER, L. (1994). Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.*, 4: 326-350.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. (1990). *Moojenichthys* Miranda-Ribeiro (Pisces: Osthariophysi: Characidae), a phylogenetic reappraisal and redescription. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 103 (3): 525-542.
- CECCARELLI, P. S. & SENHORINI, J. A. (1996). *Brycon* – Viabilização da produção de alevinos. *Panorama da Aqüicultura*, maio/junho: 10-11.

- CHAPMAN, L. J.; CHAPMAN, C. A.; BRAZEAU, D. A.; McLAUGHLIN, B.; JORDAN, M. (1999). Papyrus swamps, hypoxia, and faunal diversification: variation among populations of *Barbus neumayeri*. *Journal of Fish Biology*, 54: 310-327.
- CIFARELLI, R. A.; GALLITELLI, M.; CELLINI, F. (1995). Random amplified hybridization microsatellites (RAHM): isolation of a new class of microsatellite-containing DNA clones. *Nucleic Acids Research*, 23: 3802-3803.
- COMINCINI, S.; LEONE, P.; REDAELLI, L.; DE GIULI, L.; ZHANG, Y.; FERRETI, L. (1995). Characterization of bovine microsatellites by Silver staining. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 112: 415-420.
- CORPET, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Research*, 16 (22): 10881-10890.
- DANIELSDOTTIR, A. K.; MARTEINSDOTTIR, G.; ARNASON, F.; GUDJONSSON, S. (1997). Genetic structure of wild and reared Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in Iceland. *Journal of Marine Science*, 54: 986-997.
- DE LEÓN, F. J. G.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. (1997). Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1785). *Molecular Ecology*, 6: 51-62.
- DERGAM, J. A.; SUZUKI, H. I.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L. F.; JÚLIO JR, H. F.; GIULIANO-CAETANO, L.; BLACK IV, W. (1998). Molecular

- biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçú, Tibagi, and Paraná Rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21 (4): 493-496.
- DERGAM, J. A.; PAIVA, S. R.; SCHAEFFER, C. E.; GODINHO, A. L.; VIEIRA, F. (2002). Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25 (4): 379-387.
- DE WOODY, J. A.; AVISE, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.
- DEWOODY, J.; NASON, J. D.; HIPKINS, V. D. (2006). Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. *Molecular Ecology Notes*, 6 (4): 951-957.
- ESTOUP, A., PRESA, P., KRIEG, F., VAIMAN, D., GUYOMARD, R. (1993a). (CT)<sub>n</sub> and (GT)<sub>n</sub> microsatellite: a new class of genetic markers for *Salmo trutta* L. (brown trout). *Heredity*, 71: 488-496.
- ESTOUP, A.; SOLIGNAC, M.; HARRY, M.; CORNUT, J. M. (1993b). Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Research*, 21: 1427-1431.
- EIZIRIK, E. (1996). Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilian Journal of Genetics*, 19 (4-Suppl.): 23-29.

- FARIA, C. A. (1994). Propagação artificial de piabanha (*Brycon insignis*) na seção de hidrobiologia e aqüicultura de Paraibuna – CESP. I *Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon*. p. 09-15.
- FARIAS, I. P.; HRBEK, T.; BRINKMANN, H.; SAMPAIO, I.; MEYER, A. (2003). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3 (1): 128-130.
- FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D. (1996). *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. EMBRAPA - CENARGEM, 2ª edição, Brasília (DF).
- FIELD, D. & WILLS, C. (1996). Long, polymorphic microsatellites in simple organisms. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 263: 209-215.
- FROEHLICH, O. (1999). Muito mais que alimento. In: *Nos Jardins Submersos da Bodoquena: guia para identificação de plantas aquáticas de Bonito e região*. Ed. UFMS. Campo Grande – MS. p. 105.
- GAGGIOTTI, E. O.; LANGE, O.; RASSMAN, K.; GLIDDON, C. (1999). A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513-1520.
- GERY, J. (1977). *Characoids of the world*. Neptune City. T. F. H. Publication. p. 672.

- GODOY, M. P. (1975). *Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu*. Vol. IV. Piracicaba, SP. Ed. Franciscana. p. 631-846.
- GOUDET, J. (1995). FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DEMEUS, T.; ROUSSET, F. (1996). Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144: 1933-1940.
- GOULDING, M. (1980). *The fishes and the forest: explorations in Amazonian natural history*. University of California Press, Berkeley. 280 p.
- GUO, S. W. & THOMPSON, W. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.
- HANCOCK, J. M. (1995). The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 1038-1047.
- HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; OBEIDA; A.; ITRIBY, H. (2004) Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research*, 35: 587-593.
- HATANAKA T.; SILVA F. H.; GALETTI P. M. (2002). A polymorphic telomeric-like sequence microsatellite in the neotropical fish *Prochilodus*. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 98: 308-310.
- HATANAKA, T. & GALETTI Jr., P. M. (2003). RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (1): 19-25.
- HATANAKA, T.; SILVA, F. H.; GALETTI, P. M. (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus*

- (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 153-159.
- HAUGE, W. Y. & LITT, M. (1993). A study of origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by PCR. *Human Molecular Genetics*, 2: 411-415.
- HILSDORF, A. W. S. (1997). Biologia Molecular: Uma realidade para a Aqüicultura. *Panorama da Aqüicultura (janeiro/fevereiro)*. p. 10-12.
- HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; KRIEGER, M. H.; KRIEGER, J. E. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture*, 214: 81-91.
- HORN, M. H. (1997). Evidence for dispersal of fig seeds by the fruit-eating characid fish *Brycon guatemalensis* Regan in a Costa Rican tropical rain forest. *Oecologia*, 109: 259-264.
- HOWES, G. (1982). Review of the genus *Brycon* (Teleostei, Characoidei). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*, 43 (1): 1-47.
- JARNE, P. & LAGODA, P. J. L. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends en Ecology and Evolution*, 11: 424-429.
- JORGENSEN, H. B. H.; HANSEN, M. M.; BEKKEVOLD, D.; RUZZANTE, D. E.; LOESCHCKE, V. (2005). Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14: 3219-3234.

- KIMURA, M. & CROW, F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.
- KIMURA, M. & OHTA, T. (1978). Stepwise mutation model and the distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 75: 2868-2872.
- KRAMER, D. L., (1978). Terrestrial group spawning of *Brycon petrosus* (Pisces: Characidae) in Panama. *Copeia* (3): 536-537.
- LAHIRI, D. K. & NURNBERGER, J. I. Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Research* (19): 5444.
- LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio* 34 (2): 111-119.
- LEUZZI, M. S. P.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M. L.; SODRÉ, L. M. K. (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27 (3): 355-362.
- LEVINSON, G. & GUTMAN, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 4: 203-221.
- LIMA, F. C. T. & CASTRO, R. M. C. (2000). *Brycon vermelha*, a new species of characid fish from the Rio Mucuri, a coastal river of eastern Brazil

- (Ostariophysi: Characiformes). *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, 11 (2):155-162.
- LIMA, F. C. T. (2001). *Revisão taxonômica do gênero Brycon Muller & Troschel, 1844, dos rios da América do Sul Cisandina (Pisces, Ostariophysi, Characiformes, Characidae)*. Dissertação de Mestrado. USP.
- LIMA, F. C. T. (2003). Subfamily Bryconinae (Characins, tetras). In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris Jr, C. J.(Eds.). *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Ed EDIPUCRS. Porto Alegre, RS. 742p.
- LITT, M. & LUTY, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet*, 44: 397-401.
- LUNT, D.H., HUTCHINSON, W.F., CARVALHO, G.R. (1999). An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Mol. Ecol.* 8: 891-894.
- MARGARIDO, V. P.; GALETTI, P. M. (1996). Chromosomes studies in fish of the genus *Brycon* (Characiformes, Characidae, Bryconinae). *Cytobios*, 85: 219-228.
- MARGARIDO, V. P.; GALETTI, P. M. (1999). Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). *Genetics and Molecular Biology*, 22: 357-361.

- MENDONÇA, J. O. J. & MELO, J. S. C. (1994). Introdução. *I Seminário sobre Criação de Espécies do Gênero Brycon*. p. 1.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. (2004). Lista Nacional das espécies de invertebrados aquáticos e peixes ameaçadas de extinção. *Diário Oficial da União, seção 1*: 136-142.
- MOREIRA, H.L.M. (1999). *Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (Oreochromis niloticus) estimadas por microssatélite*. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MORELLI, K. A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2007). Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes, Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 7 (1): 32-34.
- MOYSÉS, C. B.; MOCKFORD, S.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; WRIGHT, J. M. (2005). Nine polymorphic microsatellite loci in the Neotropical electric eel *Eigenmannia* (Teleostei: Gymnotiformes). *Molecular Ecology Notes*, 5: 7-9.
- NARUM, S. R.; CONTOR, C.; TALBOT, A.; POWELL, M. S. (2004). Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, U. S. A. *Journal of Fish Biology*, 65: 471-488.

- NARUM, S. R.; BOE, S.; MORAN, P.; POWELL, M. (2006). Small-scale genetic structure and variation in steelhead of the Grande Ronde River, Oregon, USA. *Transactions of American Fisheries Society*, 135: 979-986.
- NEI, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NESBO, C. L.; MAGNHAGEN, C.; JAKOBSEN, K. S. (1998). Genetic differentiation among stationary and anadromous perch (*Perca fluviatilis*) in the Baltic Sea. *Hereditas*, 129: 241-249.
- O'CONNELL, M. & WRIGHT, J. M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 331-363.
- O'CONNELL, M.; DILLON, M. C.; WRIGHT, J. M. (1998). Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Mol. Ecol.*, 7: 357-363.
- O'REILLY, P. T. & WRIGHT, J. M. (1995). The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. *Journal of Fish Biology*, 47: 29-55.
- O'REILLY, P. T.; CANINO, M. F.; BAILEY, K. M.; BENTZEN, P. (2000). Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye Pollock and other gadoids. *Journal of Fish Biology*, 50: 1074-1086.
- OVENDEN, J. R.; SALINI, J.; O'CONNOR, S.; STREET, R. (2004). Pronounced genetic population structure in a potentially vagile fish species

- (*Pristipomoides multidens*, Teleostei; Perciformes; Lutjanidae) from the East Indies Triangle. *Molecular Ecology*, 13: 1991-1999.
- PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. (1995). Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354.
- PETTERSSON, J. C. E.; HANSEN, M. M.; BOHLIN, T. (2001). Does dispersal from landlocked trout explain the coexistence of resident and migratory trout females in a small stream? *Journal of Fish Biology*, 58: 487-495.
- PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844-855.
- PFEIFFER, A., OLIVIERI, A. M., MORGANTE, M. (1997). Identification and characterization of microsatellites in Norway spruce (*Picea abies* k.). *Genome* 40: 411-419.
- PORTUGAL, L. P. S. (1990). *Revisão sistemática do gênero Triportheus Cope (Teleostei, Characiformes, Characidae)*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências de São Paulo.
- PRESA, P. & GUYOMARD, R. (1996). Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *J. Fish Biol.*, 49: 1326-1329.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotypic data. *Genetic*, 155: 945-959.

- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- REVALDAVES, E.; PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 5: 463-465.
- RICE, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- RICHARDSON, T.; CATO, S.; RAMSER, J.; KAHL, G.; WEISING, K. (1995). Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*, 23: 3498-3799.
- RICO, C., RICO, I., HEWITT, G. (1996). 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. Biol. Sci.(series B)*, 263: 549-557.
- RYMAN, N. (1983). Patterns of distribution of biochemical genetic variation in salmonids: Differences between species. *Aquaculture*, 33: 1-21.
- SABINO, J. & I. SAZIMA, 1999. Association between fruit-eating fish and foraging monkeys in western Brazil. *Ichthyological Explorations of Freshwaters*, 10 (4): 309-312.
- SAKAMOTO, T., DANZMANN, R. G.; GHARBI, K.; HOWARD, P.; OZAKI, A.; KHOO, S. K.; WORAM, R. A.; OKAMOTO, N.; FERGUSON, M. M.; HOLM, L. E.; GUYOMARD, R.; HOYHEIM, B. (2000). A Microsatellite Linkage

- Map of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) Characterized by Large Sex-Specific Differences in Recombination Rates. *Genetics*, 155: 1331-1345.
- SALGUEIRO, P.; CARVALHO, G.; COLLARES-PEREIRA, M. J.; COELHO, M. M. (2003). Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaecypris hispânica* in Portugal: implications for conservation. *Biological Conservation*, 109: 47-56.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- SANCHES, A. & GALETTI, P. M. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1045-1046.
- SANCHES, A & GALETTI, P. M. (*in press*). Genetic evidence of population substructuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii*. *Brazilian Journal of Biology*.
- SCHLOTTERER, C. & TAUTZ, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215.
- SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.
- SEMA/MS – Secretaria de Estado de Meio Ambiente/Mato Grosso do Sul. Centro de Controle Ambiental. (1994). *Relatório sobre a implantação da rede básica de monitoramento da qualidade das águas da bacia do Alto Paraguai*. Campo Grande, MS,. p. 35.

- SHAW, P. W.; TURAN, C.; WRIGHT, J. M.; O'CONNELL, M.; CARVALHO, G. R. (1999). Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Clupea harengus*), with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analyses. *Heredity*, 83: 490-499.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fish (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American Rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417.
- SMITH, G. P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science*, 191: 528-535.
- SMITH, L. M.; SANDERS, J. Z.; KAISER, R. J.; HUGHES, P.; DODD, C.; CONNELL, C. R.; HEINER, C.; KENT, S. B. H.; HOOD, L. E. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321: 674-679.
- SPIES, I. B.; BRASIER, D. J.; O'REILLY, P. T. L.; SEAMONS, T. R.; BENTZEN, P. (2005). Development and characterization of novel tetra-, tri-, and dinucleotide microsatellite markers in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Ecology Notes*, 5: 278-281.
- SPRECHER, C. J.; PUERS, C.; LINS, A.M.; SCHUMM, J.W. (1996). General Approach to Analysis of Polymorphic Short Tandem Repeat Loci. *Biotechniques*, 20: 266-276.

- STALLING, R. L.; FORD, A. F.; NELSON, D.; TORNEY, D. C.; HILDEBRAND, C. E.; MOYSIS, R. K. (1991). Evolution and distribution of (GT)<sub>n</sub> repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10: 807-815.
- TASSANAKAJON, A.; TIPTAWONNUKUL, A.; SUPUNGUL, P.; VICHIEEN, R. (1998). Isolation and characterization of microsatellite markers in the black tiger prawn *Penaeus monodon*. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7 (1): 55-61.
- TAUTZ, D. & RENZ, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.*, 12: 4126-4138.
- TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6364-6471.
- TAYLOR, M. I. & VERHEYEN, E. (2001). Microsatellite data reveals weak population substructuring in *Copadichromis* sp. "virginalis kajose", a demersal cichlid from Lake Malawi, Africa. *Journal of Fish Biology*, 59: 593-604.
- UJ, A. (1990). *Etude comparative de l'osteologie cranienne dos poissons de la famille des Characidae et son importance phylogenetique*. Tese de Doutorado. Faculté des Sciences de l'Université de Genève.
- WASKO, A. P. & GALETTI, P. M. (2002). RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474 (1-3):131-137.

- WASKO, A. P. & GALETTI, P. M. (2003). PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of variability in fishes of the genus *Brycon*. *J. Appl. Ichthyol.*, 19: 109-113.
- WEIR, B. S. & COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- WEITZMAN, S. H. (1960). The phylogenetic relationships of *Triportheus*, a genus of South America Characidae fishes. *Stanf. Ichth. Bull.*, 7 (4): 239-243.
- WELSH, J. & MCCLELLAND, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. Á.; TINGEY, S. V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- WIRTH, T. & BERNATCHEZ, L. (2001). Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature*, 409 (22): 1037-1040.
- XU, Z.; PRIMAVERA, J. H.; DE LA PENA, L. D.; PETIT, P.; BELAK, J.; ALCIVAR-WARREN, A. (2001). Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 199: 13-40.
- YAMAMOTO, S.; MORITA, K.; KOIZUME, I.; MAEKAWA, K. (2004) Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conservation Genetics*, 5: 529-538.

- ZANATA, A. M. 2000. Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Müller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes). Doctoral Thesis. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 358p.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.
- ZHENG, W., STACEY, N.E., COFFIN, J., STROBECK, C. (1995). Isolation and characterization of microsatellite loci in the goldfish *Carassius auratus*. *Mol. Ecol.*, 4: 791-792.