

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS
NATURAIS

ALLINE BRAGA SILVA

**Estrutura genética populacional de *Prochilodus
costatus* Valenciennes 1850 (Characiformes,
Prochilodontidae) no Alto São Francisco**

SÃO CARLOS, SP

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Estrutura genética populacional de *Prochilodus costatus* Valenciennes 1850 (Characiformes, Prochilodontidae) no Alto São Francisco

Alline Braga Silva

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências com área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior

SÃO CARLOS, SP

2011

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

S586eg

Silva, Aline Braga.

Estrutura genética populacional de *Prochilodus costatus* Valenciennes 1850 (Characiformes, Prochilodontidae) no Alto São Francisco / Aline Braga Silva. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
48 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Ecologia. 2. Variação (Genética). 3. Microsatélites. 4. Peixe. 5. Conservação. I. Título.

CDD: 574.5 (20ª)

Alline Braga Silva

**Estrutura genética populacional de *Prochilodus costatus* Valenciennes 1850
(Characiformes, Prochilodontidae) no Alto São Francisco**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 14 de fevereiro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Presidente

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior
(Orientador)

1º Examinador

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama
PPGGEV/UFSCar

2º Examinador

Prof. Dr. Fausto Foresti
UNESP/Botucatu-SP

Aos meus pais, pelas “sem razões do amor”

“Tudo nos concita a buscar uma outra relação da sociedade com a natureza, onde a justiça social e a sustentabilidade ecológica se façam por meio da liberdade, onde todos tenham direitos iguais para afirmarem a sua diferença. Que a diversidade biológica e a cultural, na igualdade e na diferença, sejam vistas como os maiores patrimônios da humanidade!”

Carlos Walter Porto-Gonçalves

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, por ser o meu suporte, minha base. Por sempre estar presente em momentos felizes e tristes. Por acreditar em mim, em momentos que nem eu mesma acreditava. E principalmente, pelo amor incondicional.

Ao meu namorado, Esteban, pelo amor, carinho, companheirismo e paciência. Obrigada por fazer parte da minha vida.

Ao meu orientador Pedro Manoel Galetti Jr, pela oportunidade concedida para o desenvolvimento do meu mestrado, pela confiança e orientação.

Aos meus colegas de laboratório, Aline, Carol e Karol, Savana, Niara, Felfys, Bruno e Bruno, Renatinha, Camila e Camilla, Karen, Eliana, Carla, Melina e Josi, pela grande ajuda nos afazeres do laboratório e por tornarem o cotidiano mais divertido.

Aos meus amigos, Fernanda, Ivy, Soneca, Mona, Carol e Savana, por compartilharem as angústias do mestrado e pela vontade contagiante de querer realizar algo significativo na vida.

Ao Gallo e Piau, pelas coletas de campo.

A todos aqueles que me fizeram apaixonar pela vida, pela diversidade, pela evolução e pela conservação, com seus ensinamentos e entusiasmo.

Ao CNPq e à FAPESP, pelas bolsas concedidas no primeiro e no segundo ano de mestrado, respectivamente.

RESUMO

Estudos de estruturação populacional são ferramentas importantes para a conservação de espécies e podem auxiliar nas decisões para criação, manejo e reestruturação de unidades de conservação. Pesquisas realizadas com peixes migradores de água doce já constataram a organização de metapopulações em espécies dos gêneros *Prochilodus* e *Brycon*, sugerindo que os tributários onde ocorre a reprodução dos indivíduos podem ter um papel fundamental nessa estruturação. Além disso, o comportamento de *homing*, que se caracteriza pelo retorno dos indivíduos ao lugar onde nasceram para se reproduzir, já foi relatado para o gênero *Prochilodus*. Esse comportamento promove uma restrição no fluxo gênico, que pode acarretar em estruturação populacional. Por outro lado, um estudo prévio em *Prochilodus costatus* não foi capaz de detectar estruturação populacional, quando foram comparadas três localidades a jusante à barragem de Três Marias (MG). Entretanto, a ideia de que tributários podem conter populações genéticas diferenciadas ainda precisa ser testada. Nesse contexto, investigamos a estrutura genética populacional de *P. costatus* na região das nascentes do rio São Francisco, onde atualmente se discute a ampliação do Parque Nacional da Serra da Canastra. Utilizamos dez locos microssatélites para realizar os estudos em três tributários do Alto São Francisco. Utilizamos o índice de fixação (F_{ST}) e AMOVA para verificar a diferenciação genética entre as subpopulações previamente definidas e testes de atribuição para verificar quantas populações existem. Os resultados obtidos evidenciaram uma alta diversidade intrapopulacional, baixa diversidade entre as subpopulações e a existência de apenas um grupo populacional. Dessa forma, as medidas conservacionistas para essa espécie devem considerar uma alta variabilidade em um modelo de população não estruturada.

Palavras-chave: Variação genética. Microssatélites. Peixe. Conservação.

ABSTRACT

Studies of population structuring are important tools for the conservation of species and can assist in decisions for the creation, management and restructuring of conservation units. Recent researches conducted with freshwater migratory fish have demonstrated the organization of metapopulations in species of the genus *Prochilodus* and *Brycon*, suggesting that the tributaries where the individuals reproduce have a key role in this structuring. Furthermore, the homing behavior, characterized by the return of individuals to their birthplace to breed, has been reported for the genus *Prochilodus*. This behavior restricts gene flow, which can lead to population structuring. Moreover, a previous study in *Prochilodus costatus* was not able to detect population structuring when comparing three sites downstream the dam of Três Marias (MG). However, the idea that tributaries may contain different genetic populations remains to be tested. In this context, we investigated the population genetic structure of *P. costatus* in the region of the headwaters of the São Francisco river, where the extension of the protected area “Parque Nacional da Serra da Canastra” is discussed. We used ten microsatellite loci to conduct the studies in three tributaries of the Upper São Francisco. We use the fixation index (FST) and AMOVA to verify the genetic differentiation between subpopulations previously defined and assignment tests to see how many people there. The results showed a high diversity within subpopulations, low diversity among subpopulations and the existence of only one population group. Thus, the conservation policies for this species should consider a high variability in a single and large population model.

Keywords: Genetic variation. Microsatellites. Fish. Conservation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regiões fisiográficas da bacia do rio São Francisco.....	9
Figura 2. <i>Prochilodus costatus</i> (curimatá-pioa).....	13
Figura 3. Pontos de coleta na região das nascentes do rio São Francisco.....	20
Figura 4. Trecho do rio Samburá.....	21
Figura 5. Gel de agarose 1% para análise da qualidade do DNA.....	23
Figura 6. Esquema de reação de amplificação com o uso da cauda universal M13. Adaptado de Schuelke (2000).	24
Figura 7. Gel de agarose 1% com DNA microssatélite amplificado.....	25
Figura 8. Gráfico de barras obtido pelo <i>Structure</i> representando uma população estruturada, com k=5	27
Figura 9. Gráfico de barras obtido pelo <i>Structure</i> representando uma população não estruturada, com k = 5	27
Figura 10. Gráfico de barras obtido pelo <i>Structure</i> com k=2, representando a população não estruturada de <i>Prochilodus costatus</i>	36
Figura 11. Gráfico de barras obtido pelo <i>Structure</i> com k=6, representando a população não estruturada de <i>Prochilodus costatus</i>	36
Figura 12. Resultados das estimativas de $\ln(P(X K))$ versus o número de populações K	37
Figura 13. Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno <i>et</i> <i>al.</i> (2005).	37
Figura 14. Distribuição da frequência alélica para cada loco utilizada na escolha do modelo mutacional.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Quantidade de indivíduos coletados por período em cada ponto de coleta ...	21
Tabela 2. Dados microssatélites para cada localidade amostrada de <i>Prochilodus costatus</i> em dezembro de 2009.....	30
Tabela 3. Dados microssatélites para cada localidade amostrada de <i>Prochilodus costatus</i> em março de 2010	31
Tabela 4. Valores de F_{st} (abaixo da diagonal) e de p (acima da diagonal) entre os pares de subpopulações de <i>Prochilodus costatus</i>	34
Tabela 5. Sumário dos resultados de atribuição dos indivíduos à sua própria subpopulação ou à outra.	35

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. Bacia do Rio São Francisco	9
1.2. Migração reprodutiva em peixes do São Francisco	11
1.3. O gênero <i>Prochilodus</i> , com ênfase em <i>Prochilodus costatus</i>	12
1.4. Estudos de estrutura populacional em peixes migradores neotropicais.....	13
1.5. Marcadores microssatélites	15
2. HIPÓTESE	18
3. OBJETIVOS	19
4. MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1. Área de estudo e amostragem dos indivíduos.....	20
4.2. Extração e quantificação de DNA.....	22
4.3. Amplificações dos locos microssatélites e genotipagem	23
4.4. Análise dos dados	25
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
5.1. Diversidade genética intrapopulacional e eventos demográficos	29
5.2. Desequilíbrio de ligação e desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg	32
5.3. Estrutura populacional	33
5.4. Implicações para a conservação.....	38
6. CONCLUSÕES.....	39
7. REFERÊNCIAS	40
APÊNDICE A - Modelo mutacional para cada loco.....	46
ANEXO A – Descrição dos 10 locos microssatélites utilizados	48

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bacia do Rio São Francisco

A bacia do rio São Francisco possui uma área de drenagem de 639.219 Km², que corresponde a cerca de 7,5% do território nacional. Abrange 503 municípios e sete Unidades da Federação: Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Goiás e Distrito Federal. Essa bacia está dividida em quatro regiões fisiográficas: Alto, Médio, Submédio e Baixo São Francisco (Figura 1) (BRASIL, 2004).



Figura 1. Regiões fisiográficas da bacia do rio São Francisco.
Fonte: BRASIL, 2004.

O Alto São Francisco compreende o trecho entre a nascente até a confluência do rio Jequitaiá (MG), sendo caracterizado por águas rápidas, frias e oxigenadas. O Médio São Francisco se estende desde a confluência do rio Jequitaiá até a barragem de Sobradinho (BA/PE). Nessa região, apresenta-se como um rio de planalto, tendo, portanto, menor velocidade e sendo sujeito a grandes cheias. O Submédio se estende desde a barragem de Sobradinho a Belo Monte (AL). Esse trecho está praticamente barrado pelas represas de Sobradinho e Paulo Afonso. Por fim, o Baixo São Francisco compreende o trecho de Belo Monte à foz. É um trecho de planície, mais lento e sob influência marinha (BRASIL, 2003; PAIVA, 1982).

Até 2003, acreditava-se que a nascente do rio São Francisco situava-se na região da Serra da Canastra, no município de São Roque de Minas, MG. Entretanto, no estudo realizado por Silva *et al.* (2003), constatou-se que a verdadeira nascente do rio São Francisco é o rio Samburá, devido à sua maior área geográfica, maior extensão e maior vazão, quando comparado com o trecho localizado em São Roque de Minas. Dessa forma, o rio Samburá passou a ser considerado como a nascente geográfica, enquanto o trecho do rio São Francisco na Serra da Canastra tornou-se sua nascente histórica.

Com esse fato surgiu uma nova discussão: a determinação da área de abrangência do Parque Nacional da Serra da Canastra (que abrange apenas a nascente histórica). Novas propostas foram sugeridas para que os limites do parque fossem ampliados para a região da bacia do rio Samburá. No entanto, o conflito se acentuou em 2007, visto que a Comissão do Meio Ambiente da Câmara Federal aprovou os Projetos de Lei 1.517/2007 e 1.448/2007, que cortam os limites do parque em 48 mil hectares e tornam parte da unidade de proteção integral em área de proteção ambiental (APA). Essa discussão mostra-se relevante devido ao papel dos tributários na reprodução de peixes migratórios. Os afluentes são as principais rotas migratórias desses animais no período da piracema e os mais importantes para a reposição dos cardumes na bacia do São Francisco (SATO; GODINHO, 2004). Diante disso, estudos que indiquem a importância dos tributários do São Francisco podem ser fundamentais na determinação da área de abrangência do parque.

1.2. Migração reprodutiva em peixes do São Francisco

A fauna de peixes do rio São Francisco é composta por cerca de 150 espécies (SATO; GODINHO,1999), sendo que 8% migram para se reproduzir. Dessas, sete espécies são migrantes de longa distância, sendo elas *Brycon opalinus*, *Salminus franciscanus*, *Leporinus elongatus*, *Prochilodus costatus*, *Prochilodus argenteus*, *Conorhynchus conirotris* e *Pseudoplatystoma corruscans*. Esses peixes apresentam desovas totais - desovam apenas uma vez em um período reprodutivo - e são iteróparos, ou seja, estão aptos para desovar novamente por pelo menos mais alguns anos (SATO; GODINHO, 2004).

Segundo Petrere (1985), espécies migradoras neotropicais, geralmente apresentam ampla área de vida, com sítios de desova e de crescimento separados por aproximadamente 1000 km. Entretanto, para *P. argenteus*, Godinho e Kynard (2006) documentaram um deslocamento que variou de 1 a 127 km. Ainda, em seu trabalho, os autores observaram que indivíduos de *P. argenteus* apresentaram áreas de vida pequena (menor que 26 km) e grande (maior que 53 km), o que refletiu no padrão dualístico de migração dos peixes: residentes e migradores. Alguns peixes residentes apresentaram deslocamento de apenas 1 km e, portanto, possuíam o mesmo sítio para desova e alimentação. Entretanto, a maioria dos peixes foram migradores, utilizando diferentes sítios para desova e forrageio.

De acordo com o modelo convencional, proposto por Godoy (1959) e Bonetto (1963), a história de vida das espécies migradoras de peixes neotropicais apresenta três sítios: sítio de desova, berçário e sítio de alimentação. Os peixes se deslocam até o canal principal do rio ou até seus afluentes para desovar. Sua migração é um fenômeno cíclico e é mais pronunciada de outubro a fevereiro, durante a estação chuvosa. Nesse período, o nível da água tende a subir, as temperaturas são mais elevadas e os dias são mais longos (SATO; GODINHO, 2004). Depois de os adultos se reproduzirem no curso principal do rio ou em seus tributários, os ovos e as larvas são carregados para a jusante. Transportados pelas inundações, chegam às lagoas marginais, que oferecem bom habitat para os jovens, com abundante alimento vivo (fitoplâncton, zooplâncton e outros micro-organismos) e relativamente altas temperaturas (HARVEY;

CAROSFELD, 2004). Sob essas condições o crescimento é rápido e, em poucas semanas, os jovens estão prontos para repovoar o rio.

Para a bacia do rio São Francisco, Godinho e Pompeu (2003) propuseram um modelo mais complexo, incluindo o sítio de refúgio. De acordo com os autores, os indivíduos jovens migram das lagoas marginais para ribeirões de primeira ordem, onde permanecem até atingirem a maturidade. O possível fator para os peixes se deslocarem para esses habitats é a fuga da predação, pois os tributários de primeira ordem apresentam menos predadores que o rio principal. Em seu trabalho, Godinho e Pompeu (2003) sugerem que o modelo proposto suporta a história de vida de três das sete espécies migradoras do São Francisco, sendo elas *L. obtusidens*, *S. franciscanus* e *P. costatus*. Para essas espécies, os autores verificaram uma quantidade significativa de indivíduos abaixo do tamanho de maturidade sexual presentes em afluentes de pequena ordem.

1.3. O gênero *Prochilodus*, com ênfase em *Prochilodus costatus*

Os peixes da família Prochilodontidae estão distribuídos em três gêneros e 21 espécies válidas, ocorrendo na maioria das grandes bacias sul-americanas (CASTRO; VARI, 2004).

O gênero *Prochilodus* possui 13 espécies reconhecidas e três delas, *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides*, estão presentes na bacia do Rio São Francisco (CASTRO; VARI, 2003). As duas primeiras são migratórias e estão entre os recursos pesqueiros mais importantes nessa bacia (PAIVA, 1983). Além da sua importância econômica, também possuem um importante papel ecológico na ciclagem de nutrientes dos rios, por possuírem hábito alimentar iliófago, ou seja, se alimentam principalmente de perifiton e de detritos (FLECKER, 1996).

P. costatus (curimatá-pioa) (Figura 2) é uma espécie endêmica da bacia do rio São Francisco e uma provável migrante a longa distância. Assim como as demais espécies migratórias dessa bacia, é iterópara e apresenta desova total (SATO ;

GODINHO, 2004). Pode atingir a massa corpórea de 6 kg, o que contribui para seu importante papel econômico na região.



Figura 2. *Prochilodus costatus* (curimatá-pioa).

Para o gênero *Prochilodus*, já foi relatado o comportamento de *homing* (GODINHO; KYNARD, 2006), que se caracteriza pelo retorno dos indivíduos ao lugar onde nasceram para se reproduzirem (GERKING, 1959), reduzindo, portanto, o fluxo gênico dentro da população (HATANAKA *et al.*, 2006). Esse comportamento pode propiciar a ocorrência de estruturação genética em suas populações.

1.4. Estudos de estrutura populacional em peixes migradores neotropicais

O estudo das estruturas populacionais por meio de técnicas moleculares tem sido útil tanto no estudo de populações exploradas comercialmente (ou seja, abundantes, mas com riscos populacionais devido à grande superexploração) como nas espécies já ameaçadas de extinção (SOLÉ-CAVA; CUNHA, no prelo). As implicações das análises populacionais para estudos de conservação são muito importantes: se uma espécie ameaçada, que ocupa uma determinada área, apresenta-se estruturada, então a estratégia de conservação deve procurar preservar a diversidade da espécie em toda a sua distribuição, pois podem já existir adaptações locais que se perderiam no caso das populações serem misturadas ou extintas. Por outro lado, se a espécie é homogênea ao longo de toda a área de ocorrência, então é viável concentrar sua proteção em apenas

uma área, usando indivíduos dessa área para recolonização das outras quando necessário (HAIG, 1998). Devido a essa grande importância para a conservação, vários estudos já foram realizados com o intuito de verificar a estrutura populacional em peixes migradores neotropicais.

Wasko e Galetti Jr (2002) examinaram a variabilidade genética em *Brycon opalinus* (citado como *B. lundii*), coletadas em duas regiões à jusante da represa de Três Marias, no rio São Francisco. Para isso utilizaram marcadores RAPD e constataram a existência de dois grandes grupos geneticamente diferenciados, sugerindo um modelo de estruturação populacional nesses peixes.

Sanches e Galetti Jr (2007) também utilizaram RAPD para verificar a existência de estruturação populacional de *Brycon hilarii* na bacia do rio Paraguai e observaram a ocorrência de unidades reprodutivas geneticamente diferenciadas, sugerindo estruturação populacional.

Pereira *et al.* (2009) utilizaram marcadores microssatélites para estudar populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, um peixe migrador da bacia dos rios Paraná-Paraguai e encontraram diferenças significativas entre as populações analisadas, indicando estruturação populacional.

Calcagnoto e DeSalle (2009) estudaram populações de *Piractus mesopotamicus* (pacu) nos rios Cuiabá e Paranapanema, da bacia Paraná-Paraguai. Eles utilizaram marcadores microssatélites e encontraram pequenas diferenças genéticas entre suas populações, sugerindo que as mesmas devem ser consideradas nos programas de conservação.

Almeida *et al.* (2003) utilizaram marcadores RAPD para estudar populações de *Pimelodus maculatus* (mandi-amarelo), um peixe migrador da bacia do Paraná e não encontraram diferenças significativas entre as populações analisadas na sub-bacia do Tietê, sugerindo alta homogeneidade genética entre as populações. Porém, na sub-bacia do Paranapanema, os autores encontraram significativa estruturação entre os peixes do alto rio Paranapanema em relação aos peixes do médio e baixo rio Paranapanema. No entanto, no mesmo estudo não foi encontrada diferenciação entre as populações do baixo e do médio rio Paranapanema.

O peixe migrador *Prochilodus argenteus* foi estudado por Hatanaka *et al.* (2006) na bacia do rio São Francisco, em duas regiões: região imediatamente à jusante da represa de Três Marias e à jusante da confluência com o rio Abaeté. Os autores encontraram um grande número de alelos exclusivos e grande variabilidade genética entre os peixes coletados na região mais distante da barragem, sugerindo a existência de diferentes unidades reprodutivas.

Uma possível explicação para a formação de subpopulações em populações de peixes migradores é o comportamento de *homing*. Estudos realizados com radiotelemetria apresentaram indícios de que esse comportamento realmente ocorre para indivíduos de ambos os sexos em *P. argenteus* (GODINHO; KYNARD, 2006) e em *P. corruscans* (GODINHO *et al.*, 2007). Além disso, trabalhos com marcação e recaptura também indicaram o mesmo comportamento em *P. lineatus* (GODOY 1959, 1975). Somando essas conclusões às encontradas no trabalho desenvolvido com *P. argenteus*, Godinho e Kynard (2006) inferiram que o comportamento de *homing* é uma característica do gênero *Prochilodus*.

Apesar de esse comportamento restringir o fluxo gênico, um estudo realizado com *P. lineatus* na bacia do rio Paraná indicou uma única população com elevado fluxo gênico (REVALDAVES *et al.*, 1997). Carvalho-Costa *et al.* (2008) também não encontraram evidências de estruturação populacional para mais uma espécie congênere: *P. costatus*. Os autores utilizaram marcadores microssatélites para verificar a estrutura populacional dessa espécie em três pontos à jusante da represa de Três Marias. A área de estudo foi semelhante àquela em que se identificou estruturação genética em *P. argenteus* (HATANAKA *et al.*, 2006). Diante disso, percebe-se a necessidade de realizar mais estudos nesse gênero.

1.5. Marcadores microssatélites

Marcadores microssatélites, ou sequências simples repetidas em *tandem* (SSR), são sequências curtas (de 1 a 6 pb) repetidas em série encontradas em todos os genomas procarióticos e eucarióticos estudados até hoje, cuja variabilidade no número de repetições é responsável pelo alto polimorfismo observado nesses marcadores

moleculares (ZANE *et al.*, 2002). Para estudos de estruturação populacional, esses marcadores têm sido amplamente utilizados (FERNANDES-MATIOLI; ALMEIDA-TOLEDO, 2000). Isso porque os mesmos apresentam características que possibilitam o estudo adequado em nível de variação genética da população, tais como padrão codominante, facilidade de serem amplificados por PCR, altas taxas de mutação, com elevado polimorfismo.

O padrão codominante refere-se ao fato de ser possível reconhecer os indivíduos heterozigotos na análise eletroforética. Este atributo permite fazer inferências consistentes sobre níveis de variabilidade genética, endogamia, fluxo gênico e diferenciação genética entre populações.

As mutações em regiões de microssatélites ocorrem em taxas significativamente mais altas que as observadas para substituições de bases, sendo frequentemente da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} eventos por loco por gameta por geração (ZANE *et al.*, 2002). Essas altas taxas de mutação proporcionam um alto polimorfismo, o que nos permite estudar eventos evolutivamente recentes. Por outro lado, alelos que são idênticos por estado (tamanho) necessariamente não serão idênticos por descendência (homoplasia), o que pode confundir as relações de parentesco e de estrutura populacional geográfica (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

Até poucos anos atrás, microssatélites eram considerados marcadores neutros, que não sofrem pressões seletivas (ELLEGREN, 2004). Entretanto, existem evidências de locos de microssatélites que estão posicionados em regiões codificadoras (formados geralmente por unidades repetitivas com três pares de bases), além de outros locos posicionados próximos à DNA não repetitivo que codifica proteínas (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Porém, eles são relativamente raros em DNA codificante, variando entre 7-10% em plantas superiores (VARSHNEY *et al.*, 2002) e entre 9-15% em vertebrados (VAN LITH; VAN ZUTPHEN, 1996).

Visto que a maioria dos marcadores microssatélites é neutra, um fator a ser considerado com o devido cuidado é o uso dos mesmos para o cálculo da variabilidade genética populacional e consequentes sugestões para conservação. Isso porque a variabilidade dos locos neutros pode não representar a variabilidade genômica. Para testar a potencial limitação da correlação entre variabilidade microssatélite e variabilidade genômica, Vali *et al.* (2008) estimaram o grau de diversidade nucleotídica

em regiões não codificantes de oito populações distintas não carnívoras, por meio do sequenciamento de 10 íntrons em 20 indivíduos de cada população. Também genotiparam de 10 a 27 locos microssatélites dos mesmos indivíduos e calcularam as heterozigosidades médias. Eles encontraram uma correlação positiva não perfeita ($r^2 = 0,70$) entre as heterozigosidades dos marcadores microssatélites e a diversidade nucleotídica em nível de população. Entretanto, em nível de indivíduos, não foi encontrada correlação significativa. Diante desses resultados, os autores concluíram que a heterozigosidade dos marcadores microssatélites podem subestimar ou superestimar de forma significativa diferenças na diversidade nucleotídica de populações carnívoras.

2. HIPÓTESE

Dado que o comportamento de *homing* já foi documentado para o gênero *Prochilodus*, esperamos que a população de *P. costatus* se encontre estruturada em subpopulações nos tributários do Alto São Francisco.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Verificar a ocorrência de estrutura genética na população de *Prochilodus costatus* na região do Alto São Francisco.
- 3.2. Fornecer subsídios para a determinação de unidades de manejo a serem conservadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Área de estudo e amostragem dos indivíduos

Realizamos este estudo no Alto São Francisco, na região de suas nascentes. As coletas ocorreram nos meses de dezembro de 2009 e março de 2010, período reprodutivo da espécie, em três pontos, contidos nos seguintes tributários: rio Samburá, rio do Peixe e rio São Francisco (Figura 3).

O rio do Peixe é um afluente do rio Santo Antônio, que por sua vez deságua no rio Samburá (Figura 4). O trecho do rio São Francisco anterior à confluência com o rio Samburá é um afluente deste, já que o rio Samburá é a sua verdadeira nascente geográfica. Na confluência de ambos os rios, o Samburá possui calha mais larga e maior vazão que a do São Francisco (SILVA *et al*, 2003).

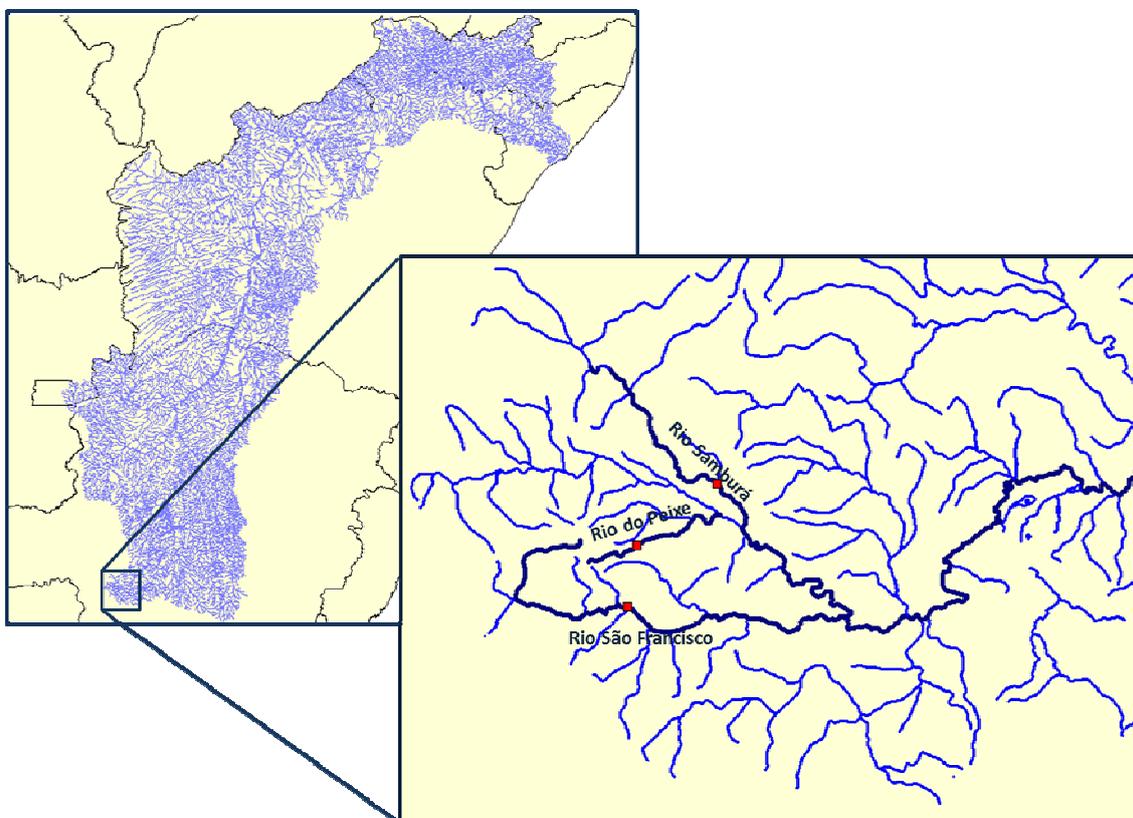


Figura 3. Pontos de coleta na região das nascentes do rio São Francisco.



Figura 4. Trecho do rio Samburá. Foto: Orlando Moreira.

Como a migração reprodutiva pode ocorrer por cardumes distintos nos dois períodos amostrados, cada coleta foi considerada uma subpopulação, totalizando 6 subpopulações. Amostramos 167 indivíduos e os identificamos por meio da chave de identificação de Castro e Vari (2004). A Tabela 1 fornece a distribuição da quantidade de indivíduos nos pontos de coleta e nos meses amostrados.

Tabela 1. Quantidade de indivíduos coletados por período em cada ponto de coleta

Sítio de coleta	Dezembro de 2009	Março de 2010
Rio Samburá	32	20
Rio do Peixe	33	33
Rio São Francisco	25	24

4.2. Extração e quantificação de DNA

Extraímos o DNA a partir de fragmentos de nadadeira caudal, armazenados em álcool 100%, seguindo o método de Aljanabi e Martinez (1997), com modificações.

O princípio da extração de DNA se fundamenta em dois passos principais:

- a) Ruptura e digestão das membranas celulares: a ruptura ocorre pelo acréscimo de detergente, que promove a emulsão dos lipídeos contidos nas membranas, e pela adição de solução salina, que provoca a ruptura das membranas devido à diferença de pressão osmótica. Já a digestão ocorre pela adição de proteinases.
- b) Precipitação do DNA: ocorre devido à adição de sais e álcool gelado, que diminuem a solubilidade da solução, ocasionando a precipitação do DNA.

É claro que mais passos estão inclusos no método de extração, como a lavagem do DNA e a obtenção do *pellet* por meio da centrifugação, e por isso a descrição detalhada do procedimento segue abaixo.

Picotamos aproximadamente 50 mg de tecido (nadadeira) em 300 μ L de solução tampão salino pH= 8,0 (NaCl 0,4 mol/L; TrisHCl 10 mmol/L e EDTA 2 mmol/L). Em seguida, adicionamos 60 μ L de SDS 10% e 8 μ L de Proteinase K 20 mg/mL. Incubamos as amostras a 55°C por aproximadamente 12 h. Após esse prazo, adicionamos 300 μ L de NaCl 6 mol/L, agitamos as amostras em vortex por 30 s à velocidade máxima e as centrifugamos por 30 min a 13.000 rpm em microcentrífuga. Então, transferimos o sobrenadante para outro tubo. Adicionamos um volume igual de isopropanol gelado e, em seguida, agitamos vagarosamente as amostras. O *pellet* foi lavado duas vezes: primeiro com etanol 100% e depois com etanol 70% e colocamos as amostras para secarem em estufa a 37°C por 1 h. Após a secagem, ressuspendemos o *pellet* com 50 μ L de água milli-Q autoclavada.

Verificamos a qualidade do DNA extraído em gel de agarose 1% (Figura 5) e o quantificamos em biofotômetro.

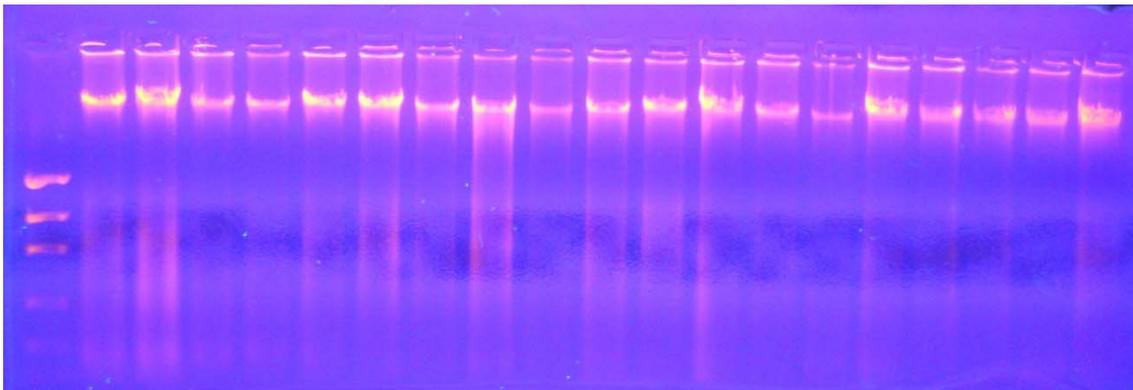


Figura 5. Gel de agarose 1% para análise da qualidade do DNA.

4.3. Amplificações dos locos microssatélites e genotipagem

Utilizamos dez locos microssatélites para caracterizar as subpopulações, sendo seis homólogos (Pcos03, Pcos04, Pcos14, Pcos17, Pcos18 e Pcos20), descritos por Carvalho-Costa *et al.* (2006) e quatro heterólogos (Par10, Par12, Par80 e Par83), descritos para *P. argenteus* por Barbosa *et al.* (2006) e Barbosa *et al.* (2008). A descrição dos locos pode encontra-se no Anexo A.

Com o intuito de diminuir os gastos nas reações de amplificação, seguimos o protocolo de Schuelke (2000) (Figura 6), no qual um terceiro primer é adicionado à reação: a cauda universal M13 de 18 pb marcada com um fluoróforo, não sendo necessário marcar os primers específicos. Esse protocolo pode ser explicado da seguinte forma:

- a) Três primers são utilizados na reação de amplificação: os primers específicos que flanqueiam a região microssatélite (*forward* e *reverse*) e uma cauda universal M13 de 18 pb marcada com um fluoróforo. Um dos primers específicos deve estar acrescido com a cauda M13 sem a marcação.
- b) Na primeira etapa da reação, utiliza-se a temperatura de anelamento dos primers específicos, para que o fragmento de interesse possa ser amplificado. Como a cauda M13 está adicionada a um dos primers específicos, uma região complementar à mesma será produzida durante os ciclos de amplificação.
- c) Na segunda etapa, utiliza-se a temperatura de anelamento da cauda M13, para que essa possa se anelar ao seu fragmento complementar, resultando, portanto,

em fragmentos microssatélites acrescidos da cauda M13 marcada com fluoróforo.

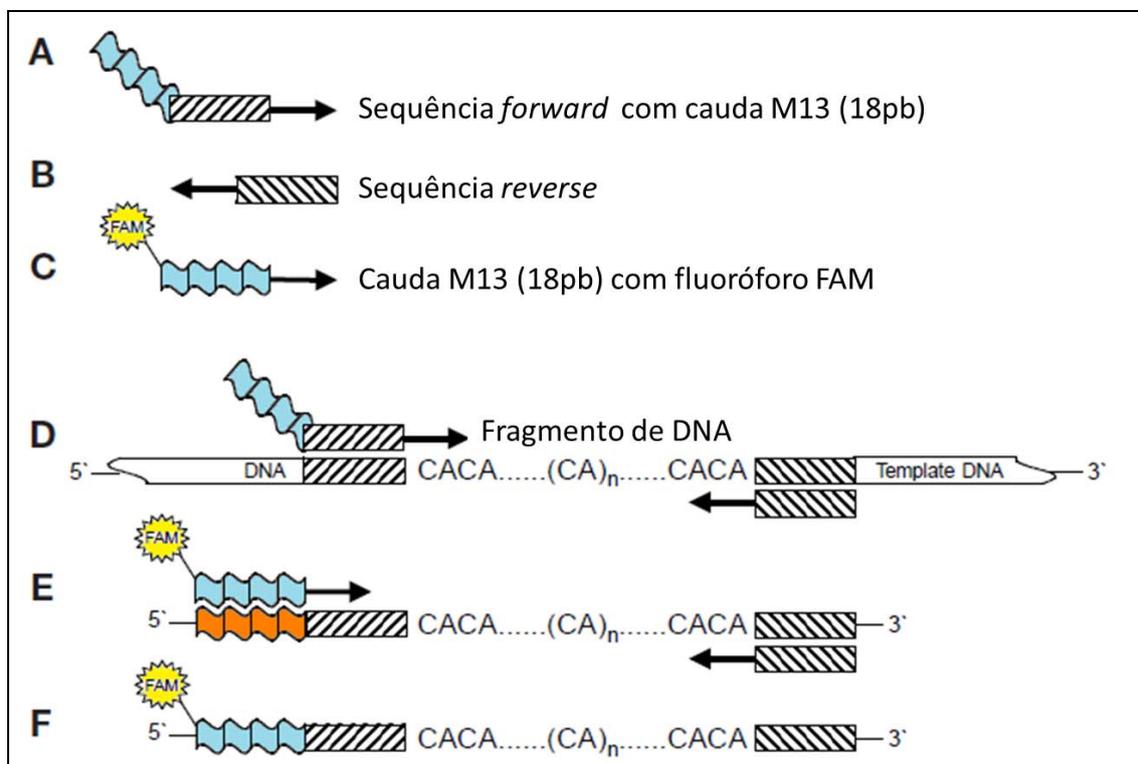


Figura 6. Esquema de reação de amplificação com o uso da cauda universal M13. A. Primer *forward* acrescido da cauda M13. B. Primer *reverse*. C. Cauda M13 marcada com fluoróforo. D. Anelamento dos primers específicos às regiões flanqueadoras do microssatélite, com posterior amplificação. E. Anelamento da cauda M13 à sua sequência complementar. F. DNA microssatélite amplificado adicionado da cauda M13 marcada com fluoróforo.

Fonte: Adaptado de Schuelke (2000).

Conduzimos as amplificações em volume final de 10 μ L, contendo 100 ng de DNA, 0,4 μ mol/L do primer *forward*, 0,1 μ mol/L do primer *reverse* e 5 μ L de Go Taq® (mix pronto com cloreto de magnésio, Taq, DNTPs nas concentrações do fabricante). O programa para a amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s à temperatura de *annealing* de cada loco, 45 s a 72°C; mais 8 ciclos adicionais iniciando a 94°C por 30 s, 45 s à temperatura de *annealing* do primer M13 marcado (53°C), 45 s a 72°C, finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 10 min.

Após a amplificação, 2 μ L de cada amostra foram aplicados a gel de agarose 1% sob voltagem constante de 100 V (Figura 7). Os fragmentos amplificados

foram genotipados em sequenciador automático. O tamanho dos alelos foi determinado por meio do programa Fragment Profiler.

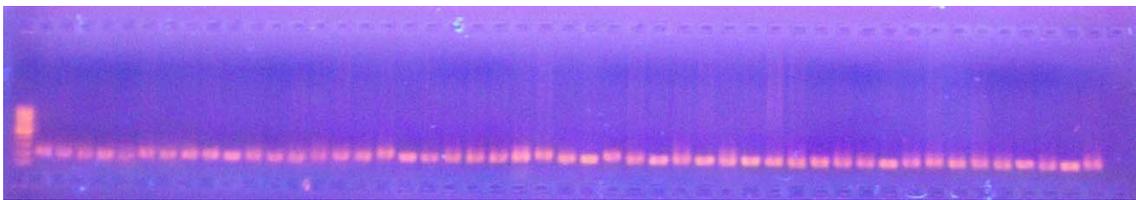


Figura 7. Gel de agarose 1% com DNA microssatélite amplificado.

4.4. Análise dos dados

Para analisar a variabilidade intrapopulacional, utilizamos o número de alelos (N_a), os valores da heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o) e a riqueza alélica (R_a). Os três primeiros parâmetros foram obtidos no programa GenAlex6 (PEAKALL; SMOUSE, 2006) e o último foi calculado no FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Comparamos a heterozigosidade esperada entre as seis subpopulações, utilizando o teste t para amostras independentes, realizado no Bioestat 3.0 (AYRES *et al.* 2003). Porém, para que essa análise estatística pudesse ser realizada, normalizamos os valores de H_e para cada loco, utilizando a transformação arcseno (ARCHIE, 1985).

Para o cálculo de eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e desequilíbrios de ligação entre os pares de locos utilizamos o programa Genepop (RAYMOND; ROUSSET, 1995). As estimativas para o desvio de HWE e deficiência de heterozigotos foram obtidas pelo algoritmo Cadeia de Markov-MonteCarlo (MCMC). A correção sequencial de Bonferroni foi utilizada para corrigir os intervalos de significância. Ainda, os desvios puderam ser analisados pelo cálculo do índice de endocruzamento F_{IS} , juntamente com os valores de p para o excesso (P_L) e para o déficit de heterozigotos (P_S). F_{IS} é a correlação de genes dentro de indivíduos dentro de populações (WRIGHT, 1951, 1965). Essa estatística descreve a intensidade e o sinal do desvio ao equilíbrio. É positivo quando existe uma deficiência de heterozigotos na população. Quando F_{IS} é negativo, existe um excesso de heterozigotos. A hipótese nula nesse tipo de análise é a de que o loco analisado encontra-se em

equilíbrio. Para verificar se os valores de F_{IS} são significativos, observamos os valores de P_L , para F_{IS} positivos, e de P_S , para F_{IS} negativos. Se os valores de p são inferiores a 0,05, significa que existe uma probabilidade de equívoco inferior a 5% ao rejeitar a hipótese nula. Para verificar a presença de alelos nulos, utilizamos o software Micro-Checker (OOSTERHOUT *et al.*, 2004)

Para análise de estrutura populacional, calculamos o índice de fixação de Wright (F_{ST}) no FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001), para verificar a diferenciação genética entre as subpopulações definidas *a priori*. Realizamos também a Análise de Variância Molecular (AMOVA) no Arlequin (EXCOFFIER *et al.*, 2005), para verificar a partição da variância entre e dentro das subpopulações. Utilizamos o teste de atribuição do GenAlex para verificar a validade dos grupos populacionais previamente definidos e, por fim, efetuamos uma análise de agrupamento bayesiana no software Structure 3.3 (PRITCHARD *et al.*, 2000) para inferir, sem informação *a priori*, o número mais provável de subpopulações.

O índice F_{ST} é definido como a correlação entre gametas tirados ao acaso da mesma subpopulação em relação ao total (WRIGHT, 1951, 1965). Um alto valor de F_{ST} indica que há baixa variação genética em uma população local em relação à população total, enquanto que valores pequenos indicam muita variação local em relação ao total (TEMPLETON, 2006). Embora haja muitas críticas a respeito da estimativa de fluxo gênico a partir desse índice, ele ainda é um bom indicador de estruturação populacional (NEIGEL, 2002).

Já o programa Structure 3.3 (PRITCHARD, 2000) utiliza o método bayesiano de agrupamento, juntamente com o algoritmo MCMC. A análise para a inferência do número de populações tem como premissas o equilíbrio de Hardy-Weinberg e a ausência de desequilíbrio de ligação dentro das populações. Testes de atribuição são realizados, para que cada indivíduo seja assignado a diferentes grupos independentemente. A partir desses testes, o número de populações (K) é definido de forma que os desequilíbrios de HWE e de ligação sejam mínimos. Após as análises, o programa nos fornece gráficos de barra que variam entre dois extremos: a representação de uma população estruturada (Figura 8) e de uma população não estruturada (Figura 9). Podemos interpretar esses gráficos da seguinte forma: cada cor representa uma população e finas barras verticais representam os indivíduos. Em uma população

estruturada, os indivíduos têm uma probabilidade elevada de pertencer a apenas uma das populações, enquanto que em uma população não estruturada, os indivíduos possuem probabilidades semelhantes de pertencer a qualquer uma dessas populações.



Figura 8. Gráfico de barras obtido pelo *Structure* representando uma população estruturada, com $k=5$. Os indivíduos são representados por barras verticais e as populações por distintas cores.

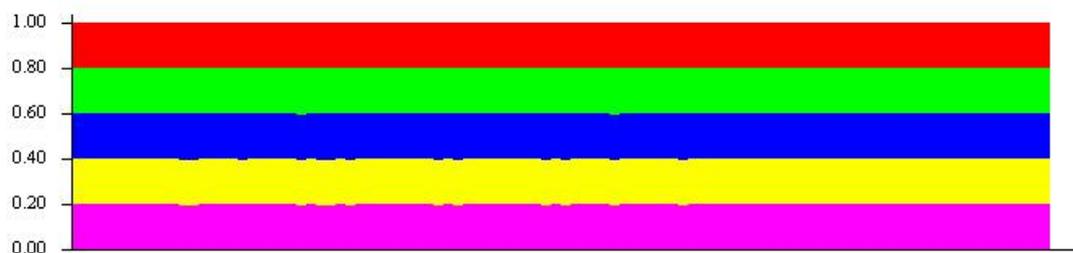


Figura 9. Gráfico de barras obtido pelo *Structure* representando uma população não estruturada, com $k=5$. Cada indivíduo, representado por uma barra vertical, possui a mesma probabilidade de pertencer a qualquer uma das populações, representadas pelas distintas cores.

Ao realizarmos as análises no *Structure*, estimamos o número de populações (K) utilizando o modelo *admixture*, que é apropriado para populações que apresentaram ou ainda apresentam fluxo gênico em taxas suficientes para que os indivíduos possam ter ancestrais de mais de uma população. Também utilizamos o modelo de alelos correlacionados, que pressupõe que as populações divergiram de um ancestral comum e que as diferenças em suas frequências alélicas são o resultado de deriva que ocorreu desde sua divergência (MARTIEN *et al.*, 2007). Realizamos 6 corridas independentes de 2.000.000 gerações de MCMC e 500.000 gerações de *burn-in*, variando K de 1 a 6. Para determinar o número real de populações, escolhemos o valor de K que maximiza a probabilidade de os dados pertencerem ao número estimado de populações, que, de acordo com Pritchard (2000), equivale ao maior valor de $\text{Ln}(P(X|K))$ (probabilidade de observar os dados (X) condicionada ao número de populações (K)). Porém, segundo Evanno *et al.* (2005), a estimativa $\text{Ln}(P(X|K))$ não fornece um número correto de grupos (K) na maioria dos casos em que a dispersão entre

as populações não é homogênea. Por isso, como sugerem os autores, utilizamos uma estatística fundamentada no delta K, que se baseia na taxa de mudança no $\ln(P(X|K))$ entre sucessivos valores de K.

Para verificarmos a existência de eventos demográficos recentes, como gargalo populacional, utilizamos o programa Bottleneck (PIRY *et al.* 1999). Para as análises, escolhemos o teste de Wilcoxon, que pode ser utilizado para menos de 20 locos e possui alto poder estatístico e utilizamos o modelo de mutação *two phase* (TP) estabelecido com 55% para o modelo *infinite alleles* (IA) e 45% para o *stepwise mutation* (SM). Para a escolha do modelo mutacional, colocamos em gráficos a distribuição da frequência alélica por loco, para verificar a qual modelo ela melhor se enquadrava (Apêndice 1).

Por fim, calculamos o tamanho efetivo populacional (N_e), utilizando o método baseado no desequilíbrio de ligação (HILL, 1981). Incluímos a correção de viés (WAPLES, 2006), por meio do programa LDNe (WAPLES; DO, 2008). Esse método assume neutralidade seletiva dos marcadores não ligados e apresenta bom desempenho nas análises de populações não ideais, com desvios na razão sexual ou variação não aleatória no sucesso reprodutivo (WAPLES, 2006). O método jackknife foi utilizado para obter 95% dos intervalos de confiança (CI) nos locos, e as estimativas foram calculadas assumindo cruzamento aleatório e excluindo todos os alelos com frequências menores que 0,02.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Diversidade genética intrapopulacional e eventos demográficos

Estimamos a diversidade genética neutra por meio do número de alelos, dos valores de heterozigosidade e da riqueza alélica. O sumário dos dados pode ser observado na Tabela 2, para amostras coletadas em dezembro de 2009, e na Tabela 3, para aquelas coletadas em março de 2010. No total, detectamos 165 alelos nos 10 locos microssatélites analisados. O número de alelos por loco nas subpopulações variou de três (Pcos03) a 21 (Pcos17), com uma média de 16,5 alelos por loco. H_e e H_o variaram de 0,078 (Pcos03) a 0,926 (Par83) e de 0,080 (Pcos03) a 0,970 (Par83), respectivamente. Ao compararmos H_e entre as seis subpopulações, verificamos que não houve diferenças significativas, o que nos indica que a diversidade genética entre essas subpopulações é similar.

Comparamos também a heterozigosidade esperada encontrada em *P. costatus* neste trabalho com os valores encontrados por Carvalho-Costa *et al.* (2008) na região de Três Marias e percebemos que os valores de variabilidade à montante e à jusante da represa de Três Marias são similares, ou seja, a diversidade genética aqui encontrada está dentro do esperado para a espécie.

Tabela 2. Dados microssatélites para cada localidade amostrada de *Prochilodus costatus* em dezembro de 2009

Sítios	Locos									Média	
	Pcos03	Pcos04	Pcos14	Pcos17	Pcos18	Pcos20	Par10	Par80	Par12		Par83
Rio Samburá											
Na	3	9	17	21	4	4	7	12	9	17	10,3
He	0,119	0,585	0,879	0,885	0,323	0,315	0,693	0,803	0,749	0,901	0,625
Ho	0,125	0,250	0,935	0,625	0,226	0,313	0,290	0,750	0,719	0,935	0,517
P_{HW}	1,000	0,000*	0,909	0,000*	0,045	0,565	0,000*	0,400	0,387	0,516	---
F_{is}	-0,038	0,583+	-0,048	0,308+	0,316	0,024	0,592+	0,082	0,056	-0,022	0,185
P_L	1,000	0,002	0,900	0,002	0,050	0,535	0,002	0,208	0,335	0,763	---
P_s	0,930	1,000	0,317	1,000	0,983	0,782	1,000	0,902	0,822	0,508	---
Ra	2,576	7,875	14,189	17,080	3,290	3,250	6,888	10,671	8,367	14,777	8,896
Rio do Peixe											
Na	3	9	18	16	3	3	9	11	11	18	10,1
He	0,291	0,663	0,911	0,849	0,467	0,119	0,748	0,751	0,724	0,912	0,643
Ho	0,273	0,364	0,903	0,484	0,313	0,063	0,300	0,774	0,758	0,970	0,520
P_{HW}	0,361	0,000*	0,129	0,000*	0,064	0,031	0,000*	0,639	0,179	0,794	---
F_{is}	0,077	0,463+	0,025	0,443+	0,345+	0,488+	0,610+	-0,014	-0,031	-0,048	0,236
P_L	0,400	0,002	0,378	0,002	0,030	0,028	0,002	0,687	0,732	0,918	---
P_s	0,851	1,000	0,823	1,000	0,985	1,000	1,000	0,532	0,443	0,255	---
Ra	2,978	7,719	15,194	13,637	2,951	2,726	7,880	9,711	9,711	15,212	8,772
Rio São Francisco											
Na	3	8	20	18	4	2	9	12	10	20	10,6
He	0,078	0,515	0,900	0,888	0,420	0,194	0,803	0,742	0,773	0,924	0,624
Ho	0,080	0,400	0,920	0,480	0,348	0,217	0,500	0,591	0,833	0,920	0,529
P_{HW}	1,000	0,004	0,334	0,000*	0,024	1,000	0,000*	0,018	0,480	0,498	---
F_{is}	-0,011	0,243	-0,002	0,475+	0,193	-0,1	0,399+	0,226	-0,057	0,025	0,139
P_L	1,000	0,030	0,642	0,002	0,160	1,000	0,002	0,0383	0,860	0,417	---
P_s	0,985	0,992	0,658	1,000	0,937	0,788	1,000	0,9967	0,353	0,868	---
Ra	2,600	7,320	17,869	16,403	3,971	2,000	9,000	11,357	9,332	18,227	9,808

Na, número de alelos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; P_{HW} , desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $0.005 < \alpha < 0.05$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); F_{is} , coeficiente de endocruzamento; P_L , valores de p para o déficit de heterozigotos; P_s , valores de p para o excesso de heterozigotos; Ra , riqueza alélica. * valores significantes; + presença de alelos nulos.

Tabela 3. Dados microssatélites para cada localidade amostrada de *Prochilodus costatus* em março de 2010

Sítios	Locos										Média
	Pcos03	Pcos04	Pcos14	Pcos17	Pcos18	Pcos20	Par10	Par80	Par12	Par83	
Rio Samburá											
Na	3	6	15	15	3	4	10	11	7	18	9,2
He	0,141	0,541	0,883	0,824	0,466	0,356	0,804	0,807	0,758	0,916	0,649
Ho	0,150	0,450	0,900	0,650	0,400	0,421	0,550	0,684	0,700	0,800	0,570
P_{HW}	1,000	0,011	0,465	0,001*	0,275	1,000	0,001*	0,093	0,269	0,021	---
F_{is}	-0,036	0,193	0,006	0,235+	0,167	-0,157	0,339+	0,179	0,101	0,152+	0,118
P_L	1,000	0,152	0,568	0,008	0,303	1,000	0,005	0,070	0,250	0,022	---
P_s	0,928	0,958	0,717	1,000	0,822	0,417	0,997	0,982	0,893	1,000	---
Ra	2,949	5,899	14,647	14,645	2,999	4,000	9,799	11,000	6,947	17,595	9,048
Rio do Peixe											
Na	4	6	16	14	3	5	8	12	9	20	9,7
He	0,143	0,522	0,896	0,741	0,562	0,236	0,777	0,747	0,626	0,924	0,617
Ho	0,152	0,394	0,900	0,531	0,688	0,258	0,424	0,781	0,636	0,909	0,567
P_{HW}	1,000	0,008	0,077	0,000*	0,965	1,000	0,000*	0,245	0,506	0,089	---
F_{is}	-0,042	0,259+	0,013	0,298+	-0,208	-0,079	0,466+	-0,031	-0,001	0,031	0,071
P_L	1,000	0,017	0,500	0,002	0,958	1,000	0,002	0,742	0,568	0,303	---
P_s	0,827	0,997	0,748	1,000	0,100	0,643	1,000	0,485	0,635	0,880	---
Ra	3,080	5,121	13,664	12,064	3,000	4,061	7,478	10,451	7,303	16,843	8,307
Rio São Francisco											
Na	4	8	16	19	3	4	8	14	9	17	10,2
He	0,227	0,623	0,898	0,879	0,577	0,425	0,794	0,806	0,685	0,926	0,684
Ho	0,250	0,417	0,957	0,458	0,625	0,429	0,500	0,818	0,583	0,875	0,592
P_{HW}	1,000	0,000*	0,741	0,000*	0,725	0,171	0,000*	0,326	0,046	0,105	---
F_{is}	-0,082	0,350+	-0,043	0,495+	-0,062	0,016	0,389+	0,008	0,169	0,076	0,132
P_L	1,000	0,007	0,873	0,002	0,720	0,555	0,002	0,558	0,068	0,165	---
P_s	0,687	0,998	0,417	1,000	0,420	0,723	1,000	0,683	0,983	0,957	---
Ra	3,582	7,496	14,967	17,078	3,000	3,905	7,744	12,862	8,483	16,009	9,513

Na, número de alelos; H_e , heterozigosidade esperada; H_o , heterozigosidade observada; P_{HW} , desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $0.005 < \alpha < 0.05$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); F_{is} , coeficiente de endocruzamento; P_L , valores de p para o déficit de heterozigotos; P_s , valores de p para o excesso de heterozigotos; Ra , riqueza alélica. * valores significantes; + presença de alelos nulos.

Embora esteja proposto na literatura que a alta variação neutra possa indicar potencial para significativa variação adaptativa (HEDRICK *et al.*, 2001), a diversidade neutra não está significativamente correlacionada com a diversidade genômica (VALI *et al.*, 2008) e, portanto, apenas constatar se ela é elevada ou baixa não é um bom critério para que medidas conservacionistas se fundamentem. Ainda assim, medi-la torna-se importante, pois nos possibilita definir a ocorrência de eventos demográficos recentes (como gargalo populacional) e estimar o tamanho populacional efetivo (N_e).

Como a diversidade genética encontrada para a população de *P. costatus* é bastante elevada, sugere-se que a espécie tenha um grande N_e e que não tenha experimentado nenhum efeito gargalo que pudesse deixar marcas nos valores de diversidade encontrados. As análises realizadas no programa LDNe para estimar N_e e no Bottleneck para verificar a ocorrência de gargalo populacional corroboram essa afirmação. Encontramos um valor infinito de N_e e ausência de gargalo recente.

5.2. Desequilíbrio de ligação e desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg

Não encontramos desequilíbrio de ligação para os pares de locos analisados. Isso significa dizer que a frequência observada da combinação entre os alelos do par de locos é semelhante à esperada.

Como pudemos observar nas Tabelas 2 e 3, os locos (Pcos17 e Par10) apresentaram desvios significativos do HWE ($0,005 < \alpha < 0,05$, ajustado de acordo com a correção sequencial de Bonferroni) para todas as subpopulações. Já o loco (Pcos04) apresentou desvio do HWE para duas subpopulações coletadas em dezembro de 2009 e para uma coletada em março de 2010. O índice F_{IS} sugeriu déficit de heterozigotos em 42 de 60 comparações realizadas nas seis subpopulações analisadas. A análise realizada no software Micro-checker indicou a presença de alelos nulos nesses locos (Tabela 2 e Tabela 3).

As possíveis causas para desvios do HWE são cinco: (1) erros de amostragem que subestimam o número de alelos por loco; (2) artefatos técnicos como a ocorrência de alelos nulos, *stuttering* ou alelos *drop-out*, (3) efeito Wahlund, isto é,

excesso de homozigotos causado pela sobreposição de populações, (4) seleção de alelos específicos e (5) endocruzamento (PEREIRA *et al.*, 2009).

Para que os desvios fossem causados pelo efeito da seleção, esperaríamos que os locos em desequilíbrio não fossem necessariamente os mesmos em cada subpopulação, já que a seleção pode atuar de forma distinta em cada uma delas. Já se os desvios fossem causados por endocruzamento, seria esperado que todos os locos estivessem em desequilíbrio, pois a depressão endogâmica atuaria sobre todos eles. E se houvesse efeito Wahlund, seria esperado que, na análise de agrupamento bayesiana, fossem detectadas mais de uma população em cada ponto de coleta. E isso não ocorreu, como pode ser observado no tópico “Estrutura populacional”.

Como os locos que apresentaram desvios no HWE se repetiram em todas as subpopulações (com exceção do loco Pcos04), o argumento de ocorrência de alelos nulos torna-se plausível para explicar nossos resultados. A ocorrência de alelos nulos pode ser explicada pela baixa eficiência de hibridização do primer usado para amplificar alguns locos devido a pontos de mutação em um ou mais sítio de anelamento desses primers (DAKIN; AVISE, 2004). Outra explicação para a ocorrência de alelos nulos é a amplificação diferencial de alelos de tamanhos diferentes (WATTIER *et al.*, 1998).

Diante dessa conclusão, decidimos descartar os locos Pcos04, Pcos17 e Par10 nas posteriores análises de estrutura populacional, exceto para as análises realizadas no Structure, em que utilizamos as duas situações, pois era necessário verificar a ocorrência do efeito Wahlund.

5.3. Estrutura populacional

Os valores de F_{ST} estimados par-a-par não mostraram diferenças significativas entre as seis subpopulações e podem ser observados na Tabela 4, juntamente com os valores de p .

Tabela 4. Valores de F_{st} (abaixo da diagonal) e de p (acima da diagonal) entre os pares de subpopulações de *Prochilodus costatus*

	Samburá (D)	Peixe (D)	Francisco (D)	Samburá (M)	Peixe (M)	Francisco (M)
Samburá (D)	---	0,0500	0,4300	0,0100	0,0067	0,0133
Peixe (D)	0,0112	---	0,6167	0,3467	0,1467	0,0400
Francisco (D)	-0,0005	0,0027	---	0,7433	0,0233	0,1667
Samburá (M)	0,0069	-0,0023	-0,0069	---	0,8233	0,2967
Peixe (M)	0,0201	-0,0014	0,0073	-0,0023	---	0,3700
Francisco (M)	0,0157	0,0076	0,0118	0,0025	0,0025	---

Os valores de p foram obtidos após 300 permutações. O ajuste do intervalo de significância para múltiplas comparações é 0,0033.

Além disso, a AMOVA revelou que a maior parte da variação genética foi encontrada dentro das subpopulações. Da variação total, 99,39% foi atribuída às diferenças individuais dentro das populações e 0,61% à divergência interpopulacional.

A partir desses resultados, concluímos que não existe estruturação espacial (localidades amostradas) e temporal (períodos amostrados) entre as subpopulações de *P. costatus*, sugerindo a existência de um único pool gênico. Entretanto, essas duas análises (F_{ST} e AMOVA) exigem a definição *a priori* das subpopulações. No entanto, esse agrupamento prévio pode não representar os verdadeiros grupos biológicos e por isso realizamos um teste de atribuição quantitativo no GenAlex.

De acordo com os resultados obtidos pelo GenAlex, 77% dos indivíduos pertencentes a uma determinada subpopulação foram atribuídos a outra, que não à sua previamente definida (Tabela 5).

Tabela 5. Sumário dos resultados de atribuição dos indivíduos à sua própria subpopulação ou à outra.

População	Própria População	Outra População
Samburá (D)	12	20
Peixe (D)	13	20
São Francisco (D)	4	21
Samburá (M)	3	17
Peixe (M)	1	32
São Francisco (M)	6	18
Total	39	128
Porcentagem	23%	77%

Também observamos que cada subpopulação teve indivíduos atribuídos a todas as demais subpopulações, o que nos indica que esses grupos definidos *a priori* não possuem um significado biológico. Além disso, esses grupos podem conter populações sobrepostas, como dois ou mais cardumes geneticamente diferenciados que estão realizando o movimento de piracema (migração reprodutiva) simultaneamente.

Para contornar essa questão, realizamos duas análises de agrupamento bayesiana no programa Structure. Nesse tipo de análise, a informação prévia dos grupos de subpopulações é desnecessária. Primeiramente, incluímos todos os locos, inclusive aqueles que apresentaram desvios no HWE. Obtivemos como resultado $K=1$, ou seja, a existência de uma única população. Isso significa que as subpopulações não apresentam diferenciação genética entre si e também não possuem sobreposição de populações, o que nos permite excluir o efeito Wahlund como uma das causas para os desvios no HWE.

A segunda análise realizada no programa Structure, agora sem os locos com desvios, também nos indicou que qualquer um dos indivíduos possui probabilidades semelhantes de pertencer a qualquer uma das populações, como observados nos gráficos de barra com $K=2$ e $K=6$ (Figuras 10 e 11). Isso sugere a existência de uma única população.

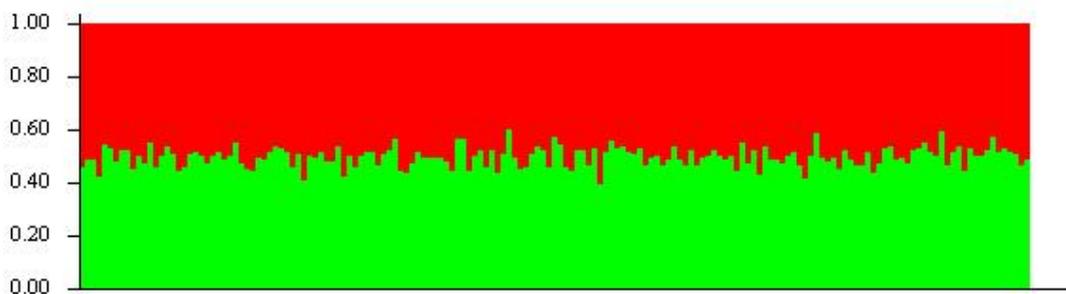


Figura 10. Gráfico de barras obtido pelo *Structure* com $k=2$, representando a população não estruturada de *Prochilodus costatus*.

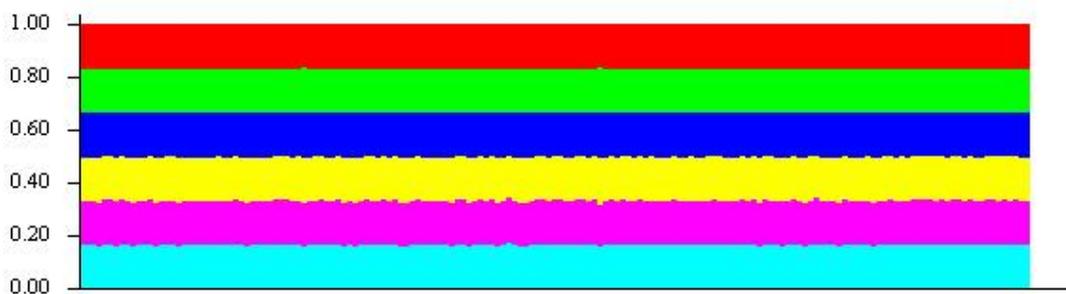


Figura 11. Gráfico de barras obtido pelo *Structure* com $k=6$, representando a população não estruturada de *Prochilodus costatus*.

Ao estimarmos o número de populações, tanto pelo método de Pritchard (2000) (Figura 12), como pelo de Evanno *et al.* (2005) (Figura 13), obtivemos um $K=1$, o que confirma a informação de que as subpopulações são geneticamente iguais. Esse resultado está de acordo com o estudo realizado também com *P. costatus* no rio São Francisco, à jusante da represa de Três Marias (CARVALHO-COSTA, 2008), no qual a estruturação genética também não foi observada.

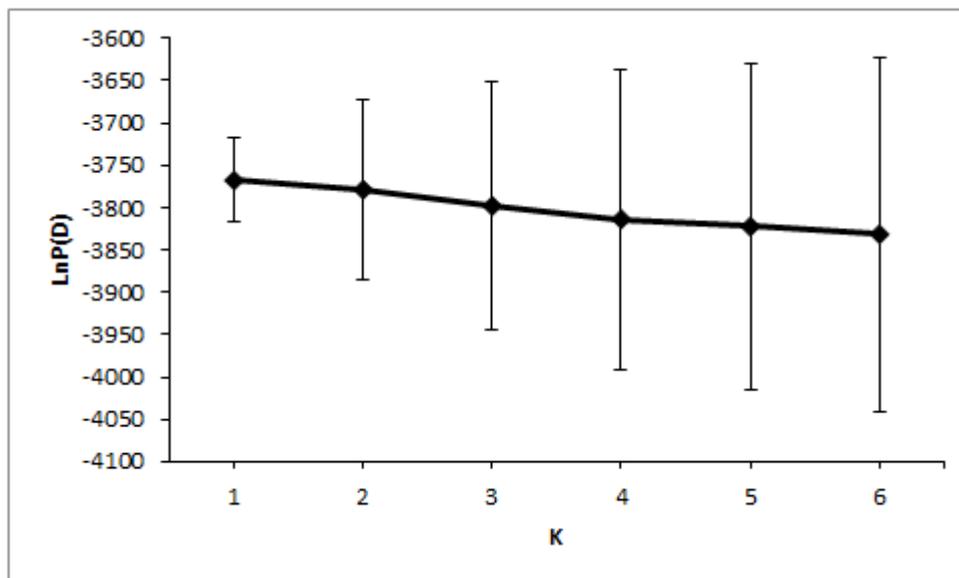


Figura 12. Resultados das estimativas de $\text{Ln}(P(X|K))$ versus o número de populações K . Os pontos são médias entre 6 corridas independentes com 500.000 gerações de “burn-in” seguida por 2.000.000 gerações de MCMC.

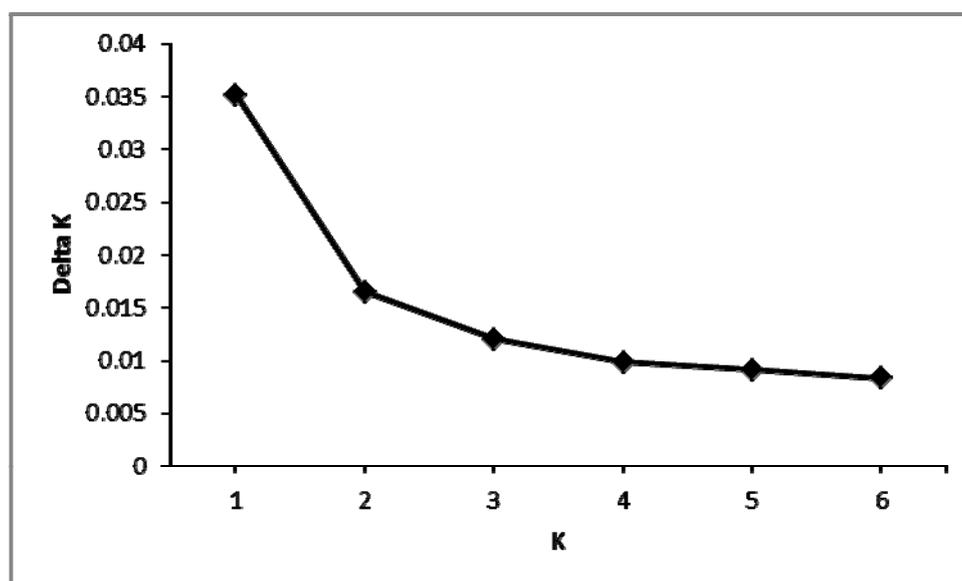


Figura 13. Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno *et al.* (2005).

Diante desses resultados, rejeitamos nossa hipótese de ocorrência de estruturação populacional, pois ainda que o comportamento de *homing* exista em *P. costatus*, a restrição do fluxo gênico pode não ser forte o suficiente para promover estruturação genética. Ou, ainda, o tempo de existência desse comportamento nas bacias

estudadas não foi evolutivamente longo para a formação de subpopulações. Ou, por fim, ao contrário do que ocorre em *P. argenteus* (GODINHO; KYNARD, 2006), o comportamento de *homing* em *P. costatus* pode ser característica de indivíduos de apenas um dos sexos, o que possibilitaria a ocorrência de fluxo gênico intenso entre as subpopulações.

5.4. Implicações para a conservação

Os recursos destinados à conservação são limitados e por isso devem ser empregados de forma consciente. Nesse aspecto, trabalhos que indiquem o que deve ou não ser conservado são fundamentais.

Neste estudo, concluímos que a população de *P. costatus* não está estruturada, ou seja, a diversidade genética encontrada nos três tributários é semelhante entre si. Dessa forma, para manter a variabilidade genética nessa espécie é suficiente a conservação de apenas um dos tributários, o que já ocorre, pois a nascente histórica já está inserida no Parque Nacional da Serra da Canastra.

Entretanto, é necessário aclarar que essa conclusão é válida para *P. costatus*, já que o nosso trabalho possui como foco a espécie. Para verificar a necessidade de se conservar a atual nascente geográfica é necessário realizar mais estudos, nos quais sejam abordadas outras espécies, e também estudos em que o foco seja o ecossistema.

6. CONCLUSÕES

- ❖ Não foi encontrada estruturação genética entre as subpopulações amostradas nos três tributários do rio São Francisco, nos dois períodos de coleta.
- ❖ A variabilidade encontrada nos locos microssatélites foi elevada, porém não é possível sugerir que esforços de conservação sejam empregados para preservar a variabilidade neutra, visto que pode não existir correlação com a variabilidade genômica.
- ❖ Sugerimos que não é necessária a ampliação do Parque Nacional da Serra da Canastra para a proteção da espécie de *P. costatus*, porém, é necessário aclarar que outras espécies devem ser estudadas para que se possa inferir qual a necessidade de conservação da nascente geográfica do rio São Francisco.

7. REFERÊNCIAS

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.

ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K; CONTEL, E.P.B. Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 301-305, 2003.

AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS A. S. Bioestat: Versão 3.0. Belém: Sociedade Civil Mamirauá. MCT-CNPQ, 2003.

ARCHIE, J. W. Statistical analysis of heterozygosity data: independent sample comparisons. **Evolution**, v. 39, n. 3, p. 623-637, 1985.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 2, p. 155-165, feb. 2002.

BARBOSA, A. C. D. R.; CORRÊA, T. C.; GALZERANI, F.; GALETTI JR, P. M.; HATANAKA, T. Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Note**, v. 6, n. 3, p. 936-938, 2006.

BARBOSA, A. C. D. R.; GALZERANI, F.; CORRÊA, T. C., GALETTI JR, P. M.; HATANAKA, T. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 1, p. 357-360, 2008.

BRASIL. Agência Nacional da Água (ANA). **Diagnóstico Analítico da Bacia do Rio São Francisco e da Zona Costeira**. Brasília, 2003. 64p. Relatório Final.

BRASIL, Agência Nacional da Água (ANA). **Estudo técnico de apoio ao PBHSF – Nº 10: controle de cheias**. Brasília, abr. 2004. 55p.

BONETTO, A. A. Investigaciones sobre migraciones de peces en los rios de la cuenca del Plata. **Ciência e Investigación**, v. 19, n. 1/2, p.12–26, 1963.

CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 4, p. 607 – 616. 2009.

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 3, p.818-819, 2006.

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P. M. Evidence of lack of substructuring of Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetic and Molecular Biology**. v. 31, n. 1, p. 337-380, 2008.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Family Prochilodontidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR., C. J. **Check List of the Freshwaters of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. p. 65–70.

CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. **Detritivores of the South American fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A Phylogenetic and Revisionary Study**. Washington: Smithsonian Books, 2004. 189p. (Smithsonian Contributions and Studies Series, 622).

DAKIN, E. E.; AVISE, J. C. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, p. 504–509, 2004.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Review Genetic** v. 5, p. 435–445, jun. 2004.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, jul. 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, p. 479–491, 1992.

FERNANDES-MATIOLI, E. M. C.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 803-807, 2000.

FLECKER, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. **Ecology**. v. 77, n. 6, p.1845– 1854, 1996.

GERKING, S. D. The restricted movement of fish populations. **Biological Reviews**. v. 34, n. 2, p. 221–242, 1959.

GODINHO, A. L.; KYNARD, B. Migration and Spawning of Radio-Tagged Zulega *Prochilodus argenteus* in a Dammed Brazilian River. **Transactions of the American Fisheries Society**. v. 135, n.3, p. 811-824. 2006.

GODINHO, A. L.; KYNARD, B.; GODINHO, H. P. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. **Environmental Biology of Fish**, v.80, n.4 ,p. 421–433, 2007.

GODINHO, A. L.; POMPEU, P. S. A importância dos ribeirões para os peixes de piracema. In: GODINHO, H. P.; GODINHO, A. L. (org). **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUC Minas, 2003. p. 361-372.

GODOY, M. P. Age, growth, sexual maturity, behavior, migration, tagging, and transplanted of the curimbatá (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guaçu River, São Paulo State, Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. v. 31, p.447–477, 1959.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil (Fishes of Brazil)**: subordem Characoidei, bacia do rio Mogi Guassu. Piracicaba: Franciscana, 1975. 216p.

GOUDET, J. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485–486, 1995.

HAIG, S. M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 413-425, mar. 1998.

HARVEY, B.; CAROSFELD, J. Fishes of the floods. In: CAROLSFELD J.; HARVEY B.; ROSS C.; BAER A. (eds). **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Victoria: IDRC, 2004. p. 1-18.

HATANAKA, T.; SILVA, F.H.; GALETTI JR, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genética**. v.126, n. 1-2, p.153-159, 2006.

HEDRICK, P. W.; PARKER, K. M.; LEE, R. Genetic variation in the endangered Gila and Yaqui topminnows: microsatellite and MHC variation. **Molecular Ecology** v. 10, p. 1399–1412, 2001.

HILL, W. G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetical Research**, v. 38, p. 209–216, 1981.

MARTIEN, K. K.; GIVENS, G. H.; ARCHER, E. A note on the ability of Structure to correctly infer the number of populations for Bering-Chuckchi-Beaufort Seas bowhead whales. **International Whaling Commission**. p.1-8, 2007.

NEIGEL, J. E. Is FST obsolete? **Conservation genetics**, v. 3, n. 2, p. 167-173, 2002.

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 94-307, 2006.

OOSTERTERHOUT, C. V.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P. M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004.

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

PAIVA, M.P. **Peixes e pesca de águas interiores do Brasil**. Brasília: Editerra, 1983. 158p.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006.

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215-225, 2009.

PETRERE JR., M. **Migraciones de peces de agua dulce en America Latina: algunos comentarios**. Roma, 1985. 17 p. (COPESCAL Documento Ocasional , 1)

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, jun. 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop: Population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v. 86, n. 3, p. 248-249, 1995.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M. F. P. S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal Genetics**, v. 20, n. 3, p. 381-388, 1997.

SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 4, p. 889-895, 2007.

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

SATO, Y.; GODINHO, H. P. Peixes da bacia do rio São Francisco. In: LOWE-MCCONNELL. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Tradução de A. E. A. M. Vazzoler, A. A. Agostinho, P. T. M. Cunningham. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 401-413.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. Migratory fishes of the São Francisco River. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (eds). **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. Victoria: IDRC, 2004. p. 195 – 232.

SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotech**, v. 18, p. 233-234, feb. 2000.

SILVA, A. P., VIEIRA, G. G., FARINASSO, M., CARLOS, R. J. **Determinação da extensão do Rio São Francisco**. In: XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 11, Belo Horizonte. **Anais XI SBSR**. Belo Horizonte: INPE, 2003. p. 393-400.

SOLÉ-CAVA; A. M.; CUNHA, H. A. Genética e a conservação da Natureza. In: MATIOLI, S. R. **Biologia molecular e evolução**. 2ª Ed. Ribeirão Preto: Holos, editora. No prelo.

TEMPLETON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory**. USA: Wiley-Liss, 2006. 705p.

VALI, U.; EINARSSON, A.; WAITS, L.; ELLEGREN, H. To what extent do microsatellite markers reflect genome-wide genetic diversity in natural populations? **Molecular Ecology**, v. 17, n. 17, p. 3808-3817, 2008.

VAN LITH, H.A., VAN ZUTPHEN, L.F. Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. **Animal Genetics**, v. 27, n. 6, p. 387–395, 1996.

VARSHNEY, R.K.; THIEL, T.; STEIN, N.; LANGRIDGE, P.; GRANER, A. In silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in ESTs of some cereal species. **Cell Mol. Biol. Lett.** v. 7, p. 537–546, 2002.

WAPLES, R. S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 2, p. 167–184, 2006.

WAPLES, R. S.; DO, C. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 753-756, 2008.

WASKO, A. P.; GALETTI JR, P. M. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. **Hydrobiologia**. v. 474, n. 1-3, p. 131–137, 2002.

WATTIER, R.; ENGEL C. R.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; VALERO, M. Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental

evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, v. 7, n. 11, p. 1569–1573, 1998.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323–354, 1951.

WRIGHT, S. The Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, v.19, n. 3, p. 395-420, 1965.

ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. **Molecular Ecology**, v. 11, n. 1, p. 1-16, 2002.

APÊNDICE A - Modelo mutacional para cada loco

A distribuição das frequências alélicas para todos os locos que estão no equilíbrio de Hardy-Weinberg estão mostradas na Figura 14.

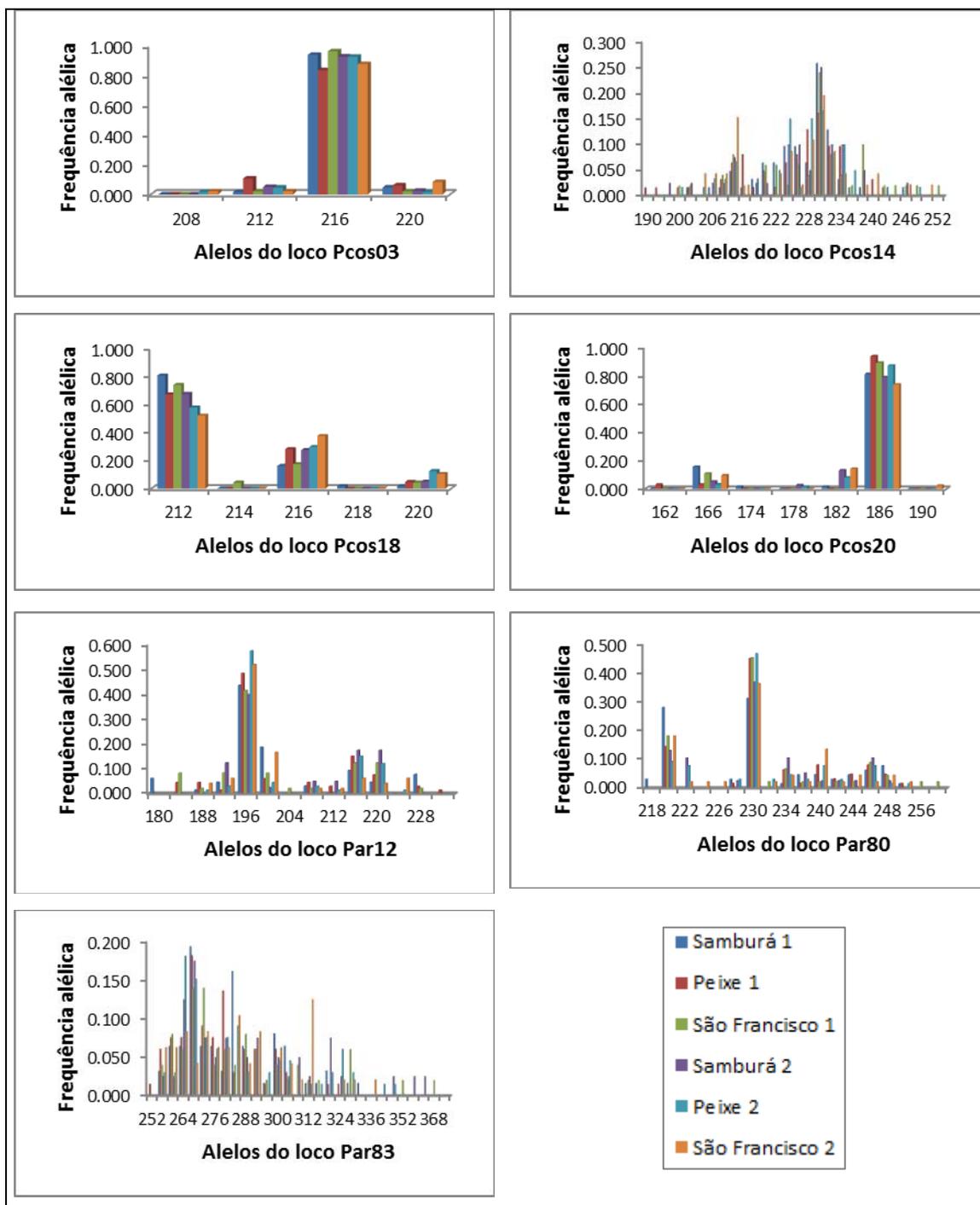


Figura 14. Distribuição da frequência alélica para cada loco utilizada na escolha do modelo mutacional.

Quando observamos os locos Pcos14, Pcos18 e Par83, percebemos a existência de um pico que diminui gradativamente em direção dos demais alelos. Isso sugere o modelo *stepwise* de mutação (SM), em que cada alelo é originado pela perda ou ganho de uma repetição (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Já para os locos Pcos03, Pcos20, Par12 e Par80, observamos um pico para a frequência de um ou dois alelos, sendo que os demais alelos possuem frequência muito inferior. Essa distribuição da frequência alélica sugere a modelo de alelos infinitos (IA), em que cada mutação cria novos alelos aleatoriamente (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Por isso, ao realizar a análise de gargalo populacional no programa Bottleneck, utilizamos o modelo mutacional *two phase*, com 45% para SM e 55% para IA.

ANEXO A – Descrição dos 10 locos microssatélites utilizados

Loco	Motif	Sequência do Primer
Pcos03	(CTGT) ₅	F: CTGGAGTAGCATGAGGAG R: GTTTAACAGCATAGTGATGG
Pcos04	(GT) ₁₁ (GA) ₇ (GTGA) ₂	F: GCCTTTTATGGCAGTATC R: GTTCTCTTTTCCAGTTAGTG
Pcos14	(TC) ₄₉	F: CGRGAATGTGCTTTATATGC R: AATGCCATTTCTGATTAAGG
Pcos17	(CAAA) ₁₃	F: ACGGTAATGATGGGTATTTG R: CGTTGTTTAACCCTTCTCAG
Pcos18	(GT) ₂₀	F: TCTCTTCTCACACACCTTCC R: TGATTACCAGCAACAGTTTG
Pcos20	(GACA) ₆	F: GTGTACATTGGCCTGTTTATC R: AGGGCAGTTAGTGTCACATC
Par10	(TC) ₁₁	F: TGATACGGGTCAGCTTTGCAG R: CTCTGTGGCCAGATGCTAGA
Par12	(AAAC) ₇	F: CGAGCTGGTACCGTCACATA R: AGCATGATGCAAAGGATCTG
Par80	(CT) ₃₇	F: CTAACCTACAAACCTCATTC R: CTCTAAAAGCTCCACTTATC
Par83	(CACT) ₁₁	F: CATTTTCTAACAGCACTCC R: TTCTTGTTCTCCTGTGTAAC