

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA EM *Prochilodus costatus* (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) NA BACIA DO RIO SÃO
FRANCISCO, REGIÃO DE TRÊS MARIAS (MG).**

LUIS FERNANDO CARVALHO COSTA

SÃO CARLOS-SP

2006

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

**ESTUDO DA VARIAÇÃO GENÉTICA EM *Prochilodus costatus* (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES: PROCHILODONTIDAE) NA BACIA DO RIO SÃO
FRANCISCO, REGIÃO DE TRÊS MARIAS (MG).**

Mestrando: Luis Fernando Carvalho Costa

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

Co-orientadora: Dra. Terumi Hatanaka

Dissertação de mestrado como parte
dos requisitos para obtenção do
título de mestre pelo programa de
Pós-Graduação em Ecologia e
Recursos Naturais da UFSCar.

SÃO CARLOS-SP

2006

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

C837ev

Costa, Luis Fernando Carvalho.

Estudo da variação genética em *Prochilodus costatus* (Teleostei: Characiformes: Prochilodontidae) na bacia do Rio São Francisco, região de Três Marias(MG) -- São Carlos : UFSCar, 2006.

73 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Genética de populações. 2. Diversidade genética. 3. Microsatélites. 4. Conservação de espécies. 5. Peixe. I. Título.

CDD: 575.15 (20^a)

Dedico esta dissertação aos meus pais, irmãos, irmãs,
sobrinhos e amigos (as).

“O mundo não é, o mundo está sendo”.

Paulo Freire

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais que tem me proporcionado a formação acadêmica que eu almejava;

Ao CNPq pela concessão da bolsa sem qual não estaria chegando ao fim desse trabalho;

Ao Professor Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. pela inestimável confiança depositada em mim, começando por aceitar me orientar, mesmo sem me conhecer, e pelo exemplo de profissional que é;

À Dra. Terumi Hatanaka (Tê), minha co-orientadora, que me ensinou quase tudo, do pouco que sei, das técnicas de Biologia Molecular, que foi decisiva no isolamento dos meus marcadores moleculares. Não daria pra escrever, nessas poucas palavras, tudo o que ela fez por mim nesse meu mestrado; além disso, é uma grande amiga que fiz aqui em São Carlos;

À Anna Carolina Dal Ri Barbosa por ter feito meus géis no seqüenciador e por ser uma grande amiga;

Ao Dr. Yoshimi Sato e à CEMIG-CODEVASF pelos exemplares coletados;

Ao técnico do laboratório de citogenética da UFSCar, “Piau”, pela colaboração nas coletas;

Ao Prof. Dr. Luiz Antônio Carlos Bertollo, do Departamento de Genética e Evolução da UFSCar, um exemplo de pessoa e de pesquisador, que eu procurarei seguir;

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Silva por nos permitir utilizar os equipamentos do laboratório dele;

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, os que ainda estão e os que foram trilhar outros caminhos, cúmplices da realização desse trabalho, pela paciência em me aturar e em ouvir minhas besteiras: Allysson; Ana Karina; Artur; Carol Garcia; Carol Linconl; Carol Dal Ri; Celeste; Daniel Gaúcho; Débora e a guaraná Dori; Eli; Elô; Fernando “animal”; Júlia Mara; Lelê; Mark; Marcelo; Marilena; Mercival; Michele; Paulinho; Priscila; Thaís; Karina; Renatinha; Thiago Ervilha; Wellington; Rosângela, e a amiga Flávia;

Aos meus pais: José Raimundo e Marlene; meus irmãos e irmãs: Luís e Márcio, Rita e Fernanda; meus sobrinhos e sobrinhas: Felipe (potinho), João Guilherme, Gabriel, Júlia e Rachel; eu nunca disse, mas vocês são tudo pra mim; Aos meus avós (*in memorian*) que devem estar muito felizes por mim;

Aos meus amigos e amigas de graduação: Rejane, Virleene, Juanna, Flávia, Águida, Keilly, Talita, Luana, JackGrayce, Elda, Luciano, Carlos, Júnior, Evaristo e Lenisa; sempre lembrarei de vocês;

Aos amigos da República: Carlos, Iderval (anti-social) e Edílson (o bagunceiro): valeu por me agüentarem e pela convivência;

À Aline, pela força que me deu quando vim fazer o exame de seleção: tenho muito carinho por você; Que Deus te abençoe sempre;

Por último, não menos importante, quero agradecer a Deus, pois acho que não há nada de contraditório entre ter fé religiosa e fazer ciência.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
1.1. A BACIA DO RIO SÃO FRANCISCO: ASPECTOS DA REGIÃO À JUSANTE DA BARRAGEM DE TRÊS MARIAS (MG)	11
1.2. EMPREGO DE MICROSSATÉLITES NO ESTUDO DE VARIABILIDADE GENÉTICA EM POPULAÇÕES	12
1.3. O GÊNERO <i>PROCHILODUS</i> COM ÊNFASE EM <i>PROCHILODUS COSTATUS</i> E ESTUDOS DE GENÉTICA POPULACIONAL EM ALGUNS PEIXES MIGRADORES DO RIO SÃO FRANCISCO	16
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1. ESPÉCIMES E ÁREA DE ESTUDO	22
3.2. EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	22
3.3. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES	23
3.3.1. <i>Isolamento dos microsatélites: construção de biblioteca parcial enriquecida</i>	23
3.3.2. <i>Caracterização dos microsatélites</i>	26
3.4. AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES PARA O ESTUDO POPULACIONAL.....	28
3.5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	29
4. RESULTADOS	30
4.1. ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES MICROSSATÉLITES.....	30
4.2. VARIABILIDADE GENÉTICA INTRA-POPULACIONAL	31
4.3. TESTE DE EQUILÍBRIO DE <i>HARDY-WEINBERG</i>	32
4.4. DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO	32
4.5. ESTRUTURA POPULACIONAL	32
5. DISCUSSÃO.....	33
5.1. DIVERSIDADE E ESTRUTURA GENÉTICA EM <i>PROCHILODUS COSTATUS</i>	33
5.2. CONSERVAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA EM <i>PROCHILODUS COSTATUS</i>	40
6. CONCLUSÕES.....	44
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8. ANEXOS.....	65
9. APÊNDICES	69

LISTA DE ABREVIATURAS

Km: quilômetro;
Km²: quilômetro quadrado;
ha: hectares;
°C: graus Celsius;
Kg: quilograma;
mg: miligrama;
M: molar;
U: unidade;
NaCl: Cloreto de Sódio;
KCl: Cloreto de Potássio;
MgCl₂: Cloreto de magnésio;
Tris-HCl: Tris Ácido Clorídrico;
SDS: Sulfato duodecil de sódio;
TE: Tris-HCl + EDTA
mM; milimolar
Cf: concentração final;
pH: potencial hidrogeniônico;
EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético;
ml: mililitros;
µl: microlitro;
ng: nanograma;
pmol; picomolar;
rpm: rotações por minuto;
dNTPs: desoxirribonucleotídeos;
s: segundo;
min: minuto;
V: volt;
pb: pares de bases;
θ: Theta;
PCR: Reação em cadeia da polimerase;
mtDNA: DNA mitocondrial;
D-loop: região controle do mtDNA;
RAPD: Polimorfismos de DNA amplificado ao acaso;
RFPL: Polimorfismos de tamanhos de fragmentos de restrição;
CODEVASF: Companhia de Desenvolvimento do Vale do São Francisco.

RESUMO

O “curimbatá-pióa”, *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850), é uma espécie endêmica da bacia do Rio São Francisco, de hábitos migratórios, de importante função ecológica e importância pesqueira. O presente estudo propôs-se a estudar a variação genética em *Prochilodus costatus* para verificar a ocorrência de estruturação genética populacional e produzir conhecimentos que contribuam para a conservação da espécie. A variação genética foi estudada em três localidades à jusante da barragem de Três Marias (MG), utilizando-se seis *loci* de microssatélites específicos, isolados e caracterizados neste trabalho. Os *loci* foram amplificados via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e os indivíduos genotipados em seqüenciador automático. As análises estatísticas foram realizadas através dos programas computacionais GENEPOP 3.3 e FSTAT 2.9.3.2. Os peixes das três localidades apresentaram níveis de diversidade genética bastante similares, e não apresentaram diferenciação genética entre si, sugerindo que *P. costatus* possa representar uma simples unidade reprodutiva na região do alto-médio Rio São Francisco. Esses achados são comparáveis ao observado em estudos prévios na espécie-irmã *P. argenteus* e devem ser importantes para futuros planos de manejo que visem à conservação dessa espécie.

Palavras-chave: curimbatá-pióa, variabilidade genética, microssatélites, genética de populações, conservação.

ABSTRACT

"Curimatá-piôa ", *Prochilodus costatus* (Valenciennes, 1850), is an endemic species from São Francisco river basin, with migratory habits, with important ecological role and of fishing importance. The present study aimed to assess the genetic variation in *Prochilodus costatus* in order to verify the occurrence of population genetic structure and to produce knowledge that contributes to the conservation of the species. Genetic variation was studied at three sites downstream of the Três Marias dam (MG) through six specific microsatellites loci, isolated and characterized in this study. The loci were amplified through PCR (polymerase chain reaction) and the individuals were genotyped in an automated sequencer. The statistical analyses were accomplished through the softwares GENEPOP 3.3 and FSTAT 2.9.3.2. Fish from the three sites had quite similar genetic diversity levels and they did not show genetic differentiation to each other, suggesting that *P. costatus* might represent a single reproductive unit in the high-middle São Francisco River. These findings are comparable to those previously obtained in the sister-species *P. argenteus* and should be important for futures management plans that seek the conservation of this species.

Keywords: curimatá-piôa, genetic variability, microsatellites, population genetics, conservation.

1. INTRODUÇÃO

1.1.A bacia do Rio São Francisco: aspectos da região à jusante da Barragem de Três Marias (MG)

A bacia do Rio São Francisco abrange uma área total de 631.133 Km², equivalendo a 7,4% do território nacional (Paiva, 1982; 1983). O Rio São Francisco tem 2.780 Km de extensão, banhando sete estados e 450 municípios. Cerca de 83% de sua área reside nos Estados de Minas Gerais e Bahia, uma área onde habitam 13 milhões de habitantes aproximadamente (Petrere, 1989; Cappio *et al.*, 1995).

O Brasil possui cerca de 3 x 10⁶ ha de reservatórios dos quais mais de 23% estão situados na bacia do São Francisco, sendo os maiores os de Três Marias, Sobradinho, Itaparica, Moxotó e os complexos Paulo Afonso e Xingó (Sato & Godinho, 2004).

O reservatório de Três Marias (105.000 ha), construído em 1960, foi o primeiro grande reservatório brasileiro de hidroelétrica, embora originalmente tenha sido construído para controle de inundações na região central do São Francisco. A barragem possui 75 metros de altura e não dispõe de nenhum mecanismo para passagem de peixes, fragmentando o rio em duas partes efetivamente (Sato & Godinho, 2004).

O reservatório de Três Marias possui águas mornas, oligotróficas e monomíticas; é verticalmente estratificado de novembro a fevereiro quando a diferença de temperatura entre o epilímnio e o hipolímnio é sempre maior do que 3°C, e desestratifica em julho com mistura vertical durante a estação seca (Sato & Godinho, 2004). Além disso, as condições ambientais têm sofrido profundas mudanças tanto à montante quanto à jusante da barragem como menor temperatura da água e menores taxas de oxigênio dissolvido à jusante, que podem estar influenciando as características biológicas dos organismos daquela região (Sato & Osório, 1986; Sato *et al.*, 1995).

À jusante da barragem, a aproximadamente 32 km, deságua o Rio Abaeté, um importante tributário do São Francisco, cujas condições limnológicas são diferentes em relação às da barragem onde, notadamente, a temperatura da água é em média de 3-6°C maior (Esteves *et al.*, 1985). Muitas espécies de peixes migradores parecem desovar nesse tributário, mas a desova aparentemente não ocorre na calha principal do São Francisco entre a barragem e o Abaeté (Sato & Godinho, 2004).

A ictiofauna do São Francisco é composta de cerca de 152 espécies (Travassos, 1960; Britski *et al.*, 1984; Sato & Godinho, 1999). Cerca de 8% delas migram para reproduzir-se. Dentre essas, sete são provavelmente migradoras de longa distância: *Brycon lundii* (matrinchã), *Salminus brasiliensis* (dourado), *Leporinus elongatus* (piauverdadeiro), *Prochilodus costatus* (curimbatá-piôa) e *Prochilodus argenteus* (curimbatá-pacu) (Characiformes); *Conorhynchus conirostris* (Pirá) e *Pseudoplatystoma corruscans* (Surubim) (Siluriformes). Destas, *B. lundii*, *S. brasiliensis*, *C. conirostris* e *P. corruscans* estão listadas como espécies “presumivelmente ameaçadas” do Estado de Minas Gerais (Lins *et al.*, 1997).

1.2. Emprego de microssatélites no estudo de variabilidade genética em populações

Diversidade, variação ou variabilidade genética corresponde à variedade de alelos e genótipos dentro de uma população (Frankham *et al.*, 2002), e entender a distribuição da variação genética dentro e entre populações é necessário para conservação de espécies (Spruell *et al.*, 2003).

O manejo dos recursos pesqueiros requer algum conhecimento da estrutura populacional, incluindo a existência de populações geneticamente distintas que podem

ser acessadas através de eletroforese de enzimas e/ou de DNA (Allendorf & Utter, 1979; Allendorf *et al.*, 1987).

Associado a isso, o manejo genético tende a ordenar a exploração, evitando a erosão do *pool* gênico e garantindo a produção de alimento em face do crescimento populacional humano (Foresti *et al.*, 1992).

Um bom modo de estudar a estrutura genética populacional em organismos é através do uso de bons marcadores moleculares específicos. Entre estes, um dos mais utilizados são as seqüências simples repetidas em *tandem* (SSR ou STR) ou microssatélites (Fernandes-Matioli & Almeida-Toledo, 2000). Estes marcadores foram descobertos no final da década de 1980 (Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989; Weber & May, 1989) e logo foi demonstrada sua ampla dispersão e abundância no genoma animal (Ellegren, 1991; Stallings *et al.*, 1991).

Microssatélites são seqüências curtas de bases (1-6 pb) repetidas em *tandem* (adjacentes), 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 (Schlötterer & Pemberton, 1998; Zane *et al.*, 2002). Essa hipervariabilidade é resultado da instabilidade das repetições desses microssatélites, sendo essas regiões referidas, às vezes, como *hotspots* mutacionais (Eisen, 1999).

As taxas de mutação em microssatélites são frequentemente da ordem de 10^{-3} a 10^{-4} eventos por *locus* por gameta por geração (Schug *et al.*, 1997; Zane *et al.*, 2002). No entanto, essas taxas variam não só de acordo com o tipo de repetição (di, tri, tetra, etc), composição de bases da repetição, tipo de microssatélite (perfeito, composto ou interrompido), mas também entre grupos taxonômicos (Goldstein & Schötterer, 1999). Além disso, mesmo dentro de um mesmo *locus*, a taxa de mutação pode variar entre os

alelos, com alelos maiores sendo mais propensos a mutar do que os menores (Schlötterer *et al.*, 1998).

Por conta dessa alta taxa de mutação, alelos que são idênticos por estado (tamanho) necessariamente não serão idênticos por descendência (*i.e.* Homoplasia; Estoup *et al.*, 2002), o que pode confundir as interpretações de parentesco e de estrutura populacional geográfica (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Apesar disso, os microssatélites são considerados marcadores moleculares muito eficientes e têm ajudado a aumentar o conhecimento sobre a variabilidade genética e a estrutura de populações em peixes (Agnèse *et al.*, 1997; García de León *et al.*, 1997; Nielsen *et al.*, 1997; Reilly *et al.*, 1999; Shaw *et al.*, 1999; Desvignes *et al.*, 2001; Fritzner *et al.*, 2001; Taylor & Verheyen, 2001; Beacham *et al.*, 2004; Habicht *et al.*, 2004; Matala *et al.*, 2004; Segelbacher & Storch, 2002; Young *et al.*, 2004), estudos de mapas de ligação (Schuler *et al.*, 1996; Knapik *et al.*, 1998) e até mesmo inferir sobre relações filogenéticas (Presa & Guyomard, 1996; Rico *et al.*, 1996), já que apresentam um grau elevado de polimorfismo inter- e intra-populacional que pode ser detectado por fracionamento de tamanhos dos fragmentos em gel de agarose ou poliacrilamida, após amplificação via PCR utilizando apenas um único par de *primers* (iniciadores de replicação).

Também têm sido bastante utilizados em estudos de genética da conservação, por exemplo, em estudos de hibridização (Gottelli *et al.*, 1994; Sillero-Zubiri & Macdonald, 1997), divergência entre populações (Paetkau *et al.*, 1995; Smith *et al.*, 1997), inferência sobre processos demográficos pretéritos (Taylor *et al.*, 1994; O`Ryan *et al.*, 1998), sucesso reprodutivo, estrutura social e endocruzamento (Morin *et al.*, 1994; Altmann *et al.*, 1996; Bourke *et al.*, 1997).

Esses marcadores moleculares também têm encontrado ampla aplicação em questões forenses, análise de parentesco e outros estudos micro-evolutivos (Goldstein & Schlötterer, 1999).

A dificuldade em se trabalhar com esses marcadores reside na obtenção das seqüências flanqueadoras dos microssatélites (onde serão desenhados os *primers*), que consome, em geral, muito tempo e recursos financeiros. Os microssatélites são, geralmente, identificados através de bibliotecas genômicas (enriquecidas ou não) contendo insertos clonados (fragmentos de DNA que podem conter microssatélites) que sofrerão varredura através de sondas apropriadas (compostas de repetições de interesse). Após a identificação dos clones positivos, estes devem ser seqüenciados para que a seqüência da região flanqueadora seja acessada. Contudo, uma vez que os *primers* estejam disponíveis, um grande número de indivíduos podem ser rapidamente genotipados para alelos co-dominantes (Awise, 2004).

Além disso, o relativo conservadorismo das seqüências flanqueadoras dos microssatélites permite a utilização de *primers* heterólogos (desenhados originalmente para outra espécie) entre espécies filogeneticamente próximas.

A estratégia de construção de *primers* universais, que é bastante eficiente para DNA mitocondrial, é mais problemática para microssatélites, pois microssatélites são encontrados, usualmente, em regiões não-codificantes, onde a taxa de substituição de nucleotídeos é maior, comparada às das regiões codificantes (Schug *et al.*, 1997; Zane *et al.*, 2002).

1.3.O gênero *Prochilodus* com ênfase em *Prochilodus costatus* e estudos de genética populacional em alguns peixes migradores do Rio São Francisco

A família Prochilodontidae constitui um dos mais importantes recursos pesqueiros da América do Sul (Bonetto *et al.*, 1981; Bayley & Petrere, 1989; Welcomme, 1990). Está distribuída em três gêneros e 21 espécies válidas que ocorrem em quase todas as grandes bacias da América do Sul (Géry, 1977; Castro & Vari, 2004).

O gênero *Prochilodus* compreende 49 espécies nominais, contudo apenas 13 espécies são válidas (Castro & Vari, 2004; FISHBASE, 2005), cujos tamanhos corpóreos variam de médio a grande (Britski *et al.*, 1988). São peixes economicamente relevantes na pesca continental (Britski, 1972) e desempenham papel importante na conservação dos rios neotropicais (Flecker, 1996).

Os peixes desse gênero estão entre os peixes mais conspícuos, abundantes e amplamente distribuídos da América do Sul (Sivasundar *et al.*, 2001). Por exemplo, *P. lineatus* representa de 50 a 90% da biomassa íctica no trecho inferior da bacia do Rio Paraná e em suas lagoas marginais (Bonetto, 1986; Cordiviola de Yuan, 1992).

São peixes de grande poder migratório e seus hábitos detritívoros suportam atividades pesqueiras em muitas partes do continente (Welcomme, 1979). A detritivoria faz de *Prochilodus* um elemento dominante na estruturação da dinâmica de comunidades dulcícolas tropicais e de atributos dos ecossistemas através das atividades de processamento do sedimento (Bowen, 1983; Flecker, 1996).

Na bacia do São Francisco são reconhecidas três espécies de *Prochilodus*: *P. argenteus*, *P. costatus* e *P. vimboides* (Castro & Vari, 2003).

O “curimatá-piôa”, *Prochilodus costatus* (= *P. affinis* Valenciennes, 1850), é uma espécie endêmica da bacia do Rio São Francisco, e que recentemente foi

introduzida na bacia do Rio Jequitinhonha (FISHBASE, 2005). É também caracterizada por ser uma espécie migratória, além de ser um importante recurso pesqueiro do São Francisco (Paiva, 1983).

Atinge biomassa de cerca de 6 kg, e junto com outros Prochilodontidae (principalmente os peixes do gênero *Prochilodus*) representavam cerca de 20% de toda biomassa de peixe de água doce pescada no Brasil na década de 1980 (IBGE, 1988). Estatísticas recentes indicam que a pesca extrativa dos peixes do gênero *Prochilodus* ultrapassou 30.000 toneladas, fazendo deles o recurso pesqueiro de águas interiores mais importante do Brasil no ano de 2003 (IBAMA, 2003).

Nos 10-15 anos após a construção da barragem de Três Marias, a pesca ainda era baseada nas mesmas espécies migratórias encontradas nos outros trechos do rio (Suvale, 1973). No entanto, esse padrão de captura mudou na década de 1980, onde espécies sedentárias substituíram as espécies migradoras, com exceção dos curimatás (Sato & Godinho, 2004).

A produção pesqueira de *P. costatus* e de outros peixes, na região barragem de Três Marias, foi extremamente elevada por certo período após a inundação, mas tem declinado drasticamente desde então (Sato & Godinho, 2004).

Um dos impactos da construção da barragem de Três Marias, evidenciados na ictiofauna migratória, foi obviamente a impossibilidade de passagem através da barragem. Estudos histológicos das gônadas de *P. argenteus* revelaram distúrbios reprodutivos nos espécimes capturados em uma área à jusante próxima à barragem quando comparados a indivíduos de regiões mais distantes (Sato *et al.*, 1995). Os autores relacionaram esses achados, entre outros fatores, à temperatura da água, que é mais baixa na região imediatamente à jusante da barragem quando comparada às áreas à jusante mais distantes.

Com a interrupção da livre migração de peixes através da barragem a variabilidade genética e as frequências alélicas de populações migratórias podem estar sofrendo alterações (Hatanaka & Galetti Jr., 2003).

Estudos recentes da genética de alguns peixes migradores, da região da barragem de Três Marias, têm sugerido um cenário de estruturação genética nas populações desses peixes.

Wasko & Galetti Jr. (2002) estudaram *Brycon lundii* utilizando marcadores do tipo RAPD, e revelaram que as amostras coletadas na região imediatamente à jusante da barragem apresentavam-se diferenciadas geneticamente de outra amostragem feita a 40 km à jusante da barragem. Revelaram também que os peixes coletados na região da barragem possuíam menor heterozigosidade (0,57) quando comparados com os peixes amostrados na outra região (0,64). Ainda neste estudo, foi encontrada uma banda de 1.200 pb presente em 100% dos indivíduos da barragem, enquanto a mesma banda foi detectada em apenas 27% dos peixes coletados na outra região. Os autores sugeriram que os animais coletados na região da barragem de Três Marias poderiam representar um único estoque de *B. lundii*, enquanto os indivíduos coletados na região à jusante da confluência entre os rios São Francisco e Abaeté poderiam representar um estoque composto de pelo menos dois *pools* gênicos simpátricos diferentes.

Em outro estudo realizado na mesma região (Sousa, 2003), com *Pseudoplatystoma corruscans*, através de marcadores RAPD, foram coletados peixes procedentes de quatro regiões à jusante da barragem de Três Marias (incluindo as duas regiões descritas no estudo do parágrafo anterior). Com base nos resultados, o autor concluiu que as quatro localidades apresentavam-se geneticamente diferenciadas entre si e que os peixes coletados próximos à barragem de Três Marias apresentavam menor variabilidade genética para esse marcador molecular.

Hatanaka & Galetti Jr. (2003) analisaram amostras de *Prochilodus argenteus*, através de RAPD, em duas regiões do São Francisco: região imediatamente à jusante da barragem de Três Marias e à jusante da confluência entre os rios São Francisco e Abaeté (cerca de 40 km da barragem). Neste estudo, os peixes da região da barragem e à jusante da confluência dos rios Abaeté e São Francisco apresentaram baixa similaridade genética significativa entre si, sugerindo estrutura genética populacional.

Hatanaka *et al.* (2006) estudaram, novamente, a estrutura genética em *P. argenteus*, utilizando agora marcadores moleculares microssatélites nos mesmos locais. 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 naquele trecho do Rio São Francisco. O estudo também indicou que existe uma baixa ($F_{ST} = 0,008$, $p = 0,0001$), mas significativa, estruturação populacional entre as duas áreas, reforçando a existência de diferentes *pools* gênicos.

Estudos em peixes migradores de outras bacias divergem em relação à premissa de que os hábitos migratórios, potencialmente, inibem o surgimento de estrutura genética populacional neste tipo de organismo.

Avise & Felley (1979) estudaram, nos Estados Unidos, populações do peixe migrador de água doce *Lepomis macrochirus*, utilizando marcadores alozimáticos para 2.560 peixes de 64 localidades. O estudo revelou que 90% da variância alélica estava entre os locais mais distantes, padrão não observado em micro-escala (reservatórios separados por barragens).

Revaldaves *et al.* (1997) estudaram populações de *Prochilodus lineatus*, em três localidades na bacia do alto Paraná, utilizando marcadores alozimáticos. Neste estudo,

não foram encontradas diferenças significativas entre as populações, sugerindo a existência de um único *pool* gênico ao longo da área estudada.

Prochilodus lineatus também foi objeto de estudo de Sirvasundar *et al.* (2001) na mesma bacia do Paraná. Utilizando a região controle do mtDNA (*D-loop*), os autores encontraram alta homogeneidade genética entre as populações, ocorrendo haplótipos similares distantes a 2.600 km. A explicação para esse alto fluxo gênico, segundo os autores, seria o hábito migratório dessa espécie.

Estudos genético-populacionais em *Prochilodus nigricans* (curimbatá amazônico) (Vasconcelos *et al.*, 2002), através de seqüências de *D-loop*, indicaram alta variabilidade genética e alto fluxo gênico (99 % da variação encontrada dentro das populações) entre as localidades amostradas. Os autores também sugerem a existência de uma grande população panmítica deste peixe migrador na bacia Amazônica.

Contudo, Sanches (2002) detectou diferenças genéticas significativas entre populações de *Brycon microlepis* (piraputanga), na subbacia do Rio Miranda (bacia do Rio Paraguai), quando comparou quatro localidades (distância não superior a 40 km) em ambos os períodos reprodutivo e não reprodutivo através de RAPD. O estudo evidenciou diferenças entre as localidades e dentro de uma mesma localidade em épocas diferentes.

Sekine *et al.* (2002) estudaram populações do peixe migrador dulcícola *Pseudoplatystoma corruscans*, ao longo da bacia do Paraná, através de RAPD e encontraram diferenças genéticas significativas entre as localidades amostradas, embora a divergência fosse baixa.

Almeida *et al.* (2003) também 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. Ao contrário, na subbacia 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 *Leporinus elongatus* (piauí-verdadeiro) foi estudado por Martins *et al.* (2003) na bacia do Rio Paraná, através de seqüências de *D-loop* em seis localidades. Os autores identificaram altos níveis de variabilidade intra-populacional e a ocorrência de haplótipos exclusivos, sugerindo diferenciação genética parcial entre as localidades.

Coronel *et al.* (2004) avaliaram a diversidade genética em *Pseudoplatystoma fasciatum*, em dois rios Amazônia Boliviana, através de alozimas e PCR-RFLP de mtDNA (Citocromo B e *D-loop*) e encontraram baixa variabilidade alozimática ao contrário da alta variabilidade encontrada no marcador mitocondrial. Foram encontradas diferenças não significativas entre os locais, sugerindo a existência de uma única unidade reprodutiva naquela região.

Em face do cenário criado pelos trabalhos anteriores na região da barragem de Três Marias e considerando-se a relevância pesqueira, o papel ecológico, o endemismo de *P. costatus* e a pouca informação existente da genética populacional de espécies do gênero *Prochilodus*, torna-se evidente a importância de estudos que visem acessar a variabilidade genética dessa espécie, que podem servir como instrumento norteador para a conservação e o uso sustentável deste recurso.

2. OBJETIVOS

- Isolar e caracterizar marcadores moleculares microssatélites espécie-específicos;
- Acessar a diversidade genética em *Prochilodus costatus*, na região à jusante da barragem de Três Marias (MG), através dos *loci* de microssatélites isolados e caracterizados;
- Verificar a ocorrência de estruturação nas populações estudadas;
- Produzir conhecimentos que contribuam para a conservação da espécie;
- Avaliar as implicações para a conservação desse recurso.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Espécimes e área de estudo

Os espécimes de *Prochilodus costatus* (Figura 1) foram coletados na região do alto-médio Rio São Francisco, próximo ao município de Três Marias (MG), durante as estações reprodutivas de 2003/2004. Os tamanhos amostrais para caracterização dos *loci* de microssatélites e análise populacional estão nas Tabelas 1, 2 e 3..

O estudo da variação foi feito comparando-se três pontos de coleta à jusante da barragem de Três Marias (Figuras 2 e 3), a saber: A: região imediatamente à jusante da barragem; B: Rio Abaeté (32 km à jusante da barragem); C: região à jusante da confluência entre os rios Abaeté e São Francisco (cerca de 40 km da barragem).

3.2. Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído a partir de tecidos de fígado, fixados em etanol 95%, e seguiu o método de Aljanabi & Martinez (1997), com modificações, descrito abaixo:

Aproximadamente 100 mg de tecido (fígado ou nadadeira) foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de um bastão. Posteriormente, adicionou-se 800 µl de

solução tampão salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 10 mM pH=8,0 e EDTA pH=8,0 2mM). Em seguida, foram adicionados 80 µl de SDS 20% (Cf=2%) e 16 µl de Proteinase K 20 mg/ml (Cf=400 mg/ml). As amostras foram incubadas a 55°C por aproximadamente 4 horas. Transcorrido este prazo, adicionou-se 300 µl de NaCl 6M, as amostras foram “vortexadas” por 30s à velocidade máxima e centrifugadas por 30 min a 13.000 rpm em microcentrífuga. Então, o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Um volume igual de isopropanol foi adicionado e, em seguida, agitou-se vagarosamente as amostras. As amostras foram centrifugadas novamente por 20 min a 13.000 rpm. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e as amostras foram secas em estufa (60 °C) durante 30 min. Após a secagem, o *pellet* foi ressuscitado em solução de 98 µl de TE e 2 µl de RNase (20mg/ml) e finalmente o DNA foi armazenado em *freezer* a -20°C.

O DNA extraído foi quantificado comparando-se as amostras com um marcador contendo concentrações de DNA conhecidas (*Low DNA Mass Ladder*TM, *Invitrogen Life Technologies*).

3.3. Isolamento e caracterização dos microssatélites

3.3.1. Isolamento dos microssatélites: construção de biblioteca parcial enriquecida

Para obter esses marcadores, foi gerada uma biblioteca plasmidial contendo insertos genômicos enriquecidos para oito repetições tetranucleotídicas diferentes através do procedimento de captura por hibridização, uma modificação do protocolo apresentado por Hamilton *et al.* (1999) (Figura 4).

Inicialmente, uma amostra de DNA foi digerida com a enzima de restrição *Rsa I*, com o intuito de obter fragmentos de DNA genômico em torno de 500 pb. Este tamanho de fragmento possibilita um bom seqüenciamento e ainda possui alta probabilidade de

conter seqüências flanqueadoras suficientes para o desenho dos *primers*. A enzima de restrição reconhece um sítio específico de corte (GTAC), deixando uma extremidade conhecida, que será útil para o prosseguimento do isolamento. Abaixo estão as condições da digestão.

2,5 µl Tampão 2
0,25 µl 100x BSA
0,25 µl 5M NaCl (Cf 50mM)
1,0 µl RSA I
1,0 µl Xmn I

20,0 µl DNA genômico (≈ 200 ng/µl)
A digestão foi conduzida à temperatura de 37 °C overnight;

Após a digestão, foi eluída, de gel de agarose 1 %, a faixa de tamanho de fragmento desejada, utilizando para isso o *kit* de purificação *SV Gel and PCR Clean up System™* (Promega). Em seguida, foi feita ligação dos fragmentos eluídos a *linkers* (oligonucleotídeos de seqüência conhecida) (vide Hamilton *et al.*, 1999). Os *linkers* irão proporcionar o sítio de anelamento para os *primers* nas PCRs subseqüentes. Para verificar o sucesso da ligação, fizemos uma PCR utilizando um único *primer* complementar a umas das seqüências dos *linkers*. Como foi observado um rastro (*smearing*) no gel, isso indicava que a ligação dos *linkers* aos fragmentos havia funcionado, pois o material foi amplificado. Abaixo estão as condições dessa ligação e da PCR:

Ligação

7,0 µl dos *linkers* dupla fita
1,5 µl 10x tampão da DNA ligase
2,0 µl DNA ligase
4,5 µl água Milli-Q

Adiciona-se todo o produto purificado e incuba-se a 16°C overnight;

PCR

2,5 µl 10x tampão
2,5 µl BSA (Cf 25 µg/ml)
1,3 µl *primer linker* (Cf 0,5 µM)
1,5 µl dNTPs (Cf 150 µM)
2,0 µl MgCl₂ (Cf 2,0 mM)

13,0 µl água milli-Q
0,2 µl *Taq* DNA Polimerase (5 u/µl)

2,0 µl dos fragmentos ligados aos *linkers*

Ciclo: 95°C por 2 min.; então 20 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 20s, 72°C por 1,5 por min; manter a 15°C;

Em seguida partimos para o enriquecimento de nossos fragmentos. O objetivo era capturar fragmentos portadores de seqüências complementares às sondas biotiniladas (oligonucleotídeos) de microssatélites que utilizamos: (AAAC)₆, (AAAG)₆, (AATC)₆, (AATG)₆, (ACCT)₆, (ACAG)₆, (ACCT)₆, (ACAG)₆, (ACTC)₆ e (ACTG)₆. Após a hibridização (fragmentos + sonda biotiniladas), separou-se os fragmentos hibridizados (fragmentos com alta probabilidade de conter microssatélites) daqueles onde não houve hibridização. Para isso, realizou-se lavagens do material em uma solução contendo partículas paramagnéticas (de acordo com as instruções do fabricante) (*Streptavidin Magsphere Paramagnetic Particles*TM, Promega), que envolvidas por estreptavidina. Os fragmentos hibridizados se complexam às partículas paramagnéticas, pois há afinidade entre a biotina das sondas e a estreptavidina. Então através de uma minicoluna acoplada a um ímã os fragmentos que contém os microssatélites são selecionados. Depois disso, fizemos uma PCR (com o *primer* do *linker*) para aumentar a quantidade de fragmentos enriquecidos, confirmando seu sucesso em gel de agarose 1,5%. Abaixo estão as condições da hibridização:

Hibridização

25,0 µl 2x Solução de hibridização (12x SSC, 0,2% SDS)

5,0 µl sondas de microssatélites biotiniladas (*mix* contendo 1-10 µM de cada)

10,0 µl do DNA ligado ao *linkers*

10,0 µl de água milli-Q

Ciclo: 95° por 5 min; então 70°C e vai baixando 0,2°C a cada 5 s por 99 ciclos; mantenha a 15°C;

PCR

5,0 µl 10x tampão de PCR

5,0 µl BSA (Cf 25 µg/ml)

3,0 µl dNTPs (Cf 150 µM)

2,5 µl *primer* do *linker* (Cf 0,5 µM)

4,0 µl MgCl₂ (Cf 2,0 mM)

25,2 µl de água milli-Q
0,3 µl de *Taq* DNA polimerase (5u/µl)

5,0 µl do fragmentos enriquecidos

Ciclo: 95°C por 2 min; então, 25 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 20 s, 72°C por 1,5 min; então 72°C por 30 min, manter a 15°C;

Procedemos, então, à ligação dos fragmentos enriquecidos em vetor *TOPO TA Cloning Kit™* (*Invitrogen Life Technologies*), de acordo com as instruções do fabricante. Após a ligação, transformamos bactérias competentes (linhagem DH5α), e seqüenciamos os clones positivos (contendo os insertos) utilizando-se *kit DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing™* em seqüenciador automático ABI 377 (*Applied Biosystems, Inc.*), do Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar, do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva.

As seqüências obtidas foram manejadas no programa *GENERUNNER 3.05* (*Hastings Software Inc.*) e, posteriormente, as repetições do tipo microssatélites foram localizadas no *TANDEM REPEATS FINDER* (Benson, 1999). Após a confirmação, *primers* foram desenhados nas regiões flangeadoras dos microssatélites através do programa *PRIMER 3* (Rozen & Skaletsky, 2000).

3.3.2. Caracterização dos microssatélites

O polimorfismo foi analisado via PCR para um conjunto de indivíduos provenientes da bacia do São Francisco.

Inicialmente as PCRs foram conduzidas em termociclador *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf Inc.*) para se determinar a temperatura de *annealing* ótima (temperatura em que os *primers* irão se anelar às suas respectivas fitas). Posteriormente, as reações foram conduzidas em termociclador PTC-100 (*MJ Research*) em volume de 10 µL contendo 100 ng de DNA, 2,25 mM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1 x PCR *buffer* (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM; *Invitrogen Life Technologies*),

10 pmoles/ μ L de cada *primer* (*forward* e *reverse*), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 U da enzima *Taq* polimerase (*Invitrogen Life Technologies*). O termociclador foi programado para uma desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos, consistindo de 30 s a 94°C, 30 s a temperatura de *annealing* (Tabela 1) e 30 s a 72° C, seguido por 20 min de extensão final a 72°C.

Os produtos da amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose 1%, sob voltagem constante de 100 V, utilizando-se como marcador de tamanho um *ladder* de 100 pb (*Invitrogen Life Technologies*). Após a migração eletroforética, o gel, corado com brometo de etídio (1:30 ml de gel) (10 mg/ml), foi visualizado e foto-documentado (Kodak 1D 3.5) em transiluminador de luz ultravioleta.

Para marcar fluorescentemente os fragmentos amplificados, utilizamos um *primer forward* de cada *locus* contendo uma seqüência extra (“cauda” contendo uma seqüência universal do fago M13; TGT AAAACGACGGCCAGT), um *primer reverse* e um terceiro *primer* marcado com fluorescência NED ou 6-FAM contendo a seqüência complementar à “cauda” M13 (Schuelke, 2000). Os ciclos da PCR consistiram de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a temperatura de *annealing* de cada *locus*, 45 s a 72°C; mais 8 ciclos adicionais iniciando a 94°C por 30 s, 45 s a temperatura de *annealing* do *primer* M13 marcado (53°C), 45 s a 72°; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 10 min. Todas essas reações foram conduzidas em termociclador PTC100 (*MJ Research*) de 96 amostras.

A preparação das amostras para genotipagem consistiu em diluir os produtos de PCR na proporção 2:6 (produto: água milli-Q), pipetando-se 0,5 μ l das amostras diluídas e misturando-as a uma solução contendo o marcador de tamanho *Genescan-350 Rox*, tampão de corrida e formamida deionizada (6:5:29). Então, os produtos foram

resolvidos em seqüenciador automático, após desnaturação das amostras durante 5 min a 95°C.

Os produtos de PCR foram genotipados em seqüenciador automático ABI 377 (*Applied Biosystems, Inc.*) (Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar do Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva). O tamanho dos alelos foi determinado através dos programas GENESCAN 3.1 e GENOTYPER 2.5 (ABI) contra um marcador interno de tamanho padrão (*GeneScan-350 Rox™, Applied Biosystems*).

Avaliamos, também, a aplicabilidade dos *loci*, isolados de *P. costatus*, para outros táxons, numa tentativa de amplificar fragmentos de tamanhos similares em duas outras espécies de *Prochilodus*, *P. argenteus* e *P. lineatus*, utilizando as mesmas condições de PCR.

3.4. Amplificação dos microssatélites para o estudo populacional

A variação genética foi estudada através de PCR utilizando-se seis *loci* de microssatélites polimórficos isolados neste trabalho (Pcos03, Pcos04, Pcos14, Pcos17, Pcos18 e Pcos20; Carvalho-Costa *et al.*, no prelo).

As amplificações foram conduzidas em volume final de 10-15 µl e o programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 45 s a temperatura de *annealing* de cada *locus*, 45 s a 72°C; mais 8 ciclos adicionais iniciando a 94°C por 30 s, 45 s a 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. Todas as reações foram conduzidas em termociclador PTC100 (*MJ Research*) de 96 mostras.

Após a amplificação, 5-8 µl de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 1% sob voltagem constante de 100 V. Após a migração eletroforética, o gel de agarose,

corado com brometo de etídio (10 mg/ml), foi visualizado e foto-documentado (Kodak 1D 3.5) em transiluminador de luz ultravioleta.

Os fragmentos amplificados foram genotipados em seqüenciador automático ABI 377 (*Applied Biosystems Inc.*) do mesmo modo descrito no subítem anterior.

3.5. Análises estatísticas

As freqüências alélicas foram obtidas através do programa *GENEPOP* 3.3 (Raymond & Rousset, 1995), sendo as mesmas utilizadas para o cálculo de outras estimativas de variabilidade genética. O mesmo programa foi utilizado para o cálculo de eventuais desvios do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($p < 0,05$). As estimativas, não enviesadas, do valor exato de p , para o desvio do equilíbrio e deficiência de heterozigotos, foram obtidas pelo algoritmo Cadeia de Markov-MonteCarlo (Guo & Thompson, 1992) ($p < 0,05$). As heterozigosidades esperada (H_e) e observada (H_o) para cada *locus* também foram calculadas através do *GENEPOP* 3.3.

A diferenciação populacional foi estimada pelos índices de fixação de Wright (1978) F_{IT} , F_{ST} e F_{IS} para cada *locus* entre as populações de acordo com o método baseado em variância de Weir & Cockerham (1984), utilizando o programa *FSTAT* 2.9.3.2 (Goudet, 2001). A significância das estatísticas F foi determinada pelos testes de permutação, com correção seqüencial de Bonferroni, disponível no *FSTAT*. Para acessar o grau de diferenciação genética entre as populações, os valores de F_{ST} (proporção da variabilidade atribuída a diferenças entre populações) para os pares de populações foram computados e sua significância estatística testada por testes de permutação, utilizando intervalos de confiança de 95% por *bootstrap* (15.000 réplicas) sobre os *loci* através do *FSTAT*.

Os valores de riqueza alélica foram estimados através do *FSTAT*. A riqueza alélica é uma medida do número de alelos independente do tamanho amostral, e seu cálculo é baseado no método de rarefação de Hurlbert (1971). As diferenças nos valores de riqueza alélica, entre as três localidades, foram testadas através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis, Man-Whitney (para amostras independentes) e de Wilcoxon (para amostras relacionadas). Todos esses testes foram efetuados no programa BIOESTAT 3.0 (Ayres *et al.*, 2003).

4. RESULTADOS

4.1. Isolamento e caracterização dos marcadores microssatélites

Foram encontrados microssatélites em 42 dos 124 clones analisados (33,9%), mas em apenas vinte deles foi possível desenhar *primers*. Após os testes em gradiente de temperatura, foi possível determinar a temperatura de *annealing* ótima em treze desses *loci*. Desses treze, apenas sete foram polimórficos em *P. costatus* (ver Tabelas 1 e 2 para informações dos *loci* monomórficos e polimórficos, respectivamente).

O número de alelos variou de 3 a 21, enquanto as heterozigosidades observada e esperada variaram de 0,03 a 0,89 e 0,17 a 0,92, respectivamente. As análises do GENEPOP não revelaram evidências de desequilíbrio de ligação entre os pares de *loci* para o tamanho amostral analisado. A análise indicou que os *loci* Pcos03, Pcos04, Pc07, Pcos17and Pcos18 apresentaram desvios significativos do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW), sugerindo deficiência de heterozigotos significativa para esses *loci*. O *locus* Pcos 07 não foi utilizado na análise populacional, devido ao grande excesso de homozigotos, o que sugere forte evidência da presença de alelos nulos nesse *locus*.

Em relação à tentativa de amplificação heteróloga desses *loci* em *P. argenteus* e *P. lineatus*, observou-se amplificação de todos eles. O nível de polimorfismo desses *loci*, nessas espécies irmãs, ainda será avaliado posteriormente.

4.2. Variabilidade genética intra-populacional

Os dados de variação genética intra-populacional (número de alelos, número de alelos privados, número médio de alelos/*locus*, heterozigosidades e coeficiente de endocruzamento) estão expostos na Tabela 3.

Foi encontrado um total de 43 a 48 alelos para os locais amostrados. Vinte e sete eram alelos privados, ou seja, encontrados apenas em uma localidade. A localidade A (barragem) apresentou 18,75 % de alelos privados, a B (Rio Abaeté) 18,6% e a localidade C apresentou 21,75% de alelos privados. Os três locais apresentaram ambos os números médios de alelos/*locus* (7,57 – 8,0) e de alelos privados/*locus* bastante similares (1,3 – 1,6).

As heterozigosidades observadas (H_o) e esperadas (H_e) variaram de 0,16 (Pcos20, loc. A) a 1 (Pcos14, loc. C) e de 0,15 (Pcos20, loc. C) a 0,95 (Pcos14, loc. C), respectivamente. Os peixes da barragem (A) foram os que apresentaram maior H_o média (0,48), enquanto em relação à H_e média os três conjuntos apresentaram valores semelhantes (A= 0,66; B= 0,65; C= 0,66).

Os testes de Kruskal-Wallis ($H= 0,2456$; $gl= 2$; $p= 0,8844$), Man-Whitney (AxB: $p= 0,9362$; BxC: $p= 0,6310$ e AxC: $p= 0,5218$) e de Wilcoxon (AxB: $p= 0,6547$; BxC: $p= 0,5002$ e AxC: $p= 0,5002$) não detectaram diferenças significativas entre os valores de riquezas alélicas das três localidades (Tabela 4).

4.3. Teste de Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*

As três localidades apresentaram pelo menos um locus desviante das proporções esperadas para o equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (A: Pcos04, Pcos18; B: Pcos03 e Pcos18; C: Pcos17 e Pcos18), após correção de Bonferroni (Tabela 3). Este resultado também foi evidenciado pelos valores médios de F_{IS} para cada população, onde todos mostraram déficit de heterozigotos, manifestados pelos valores positivos desse índice (Tabela 3).

4.4. Desequilíbrio de Ligação

Não houve nenhuma significância estatística para associações não aleatórias entre os genótipos dos seis *loci* nas três localidades, sugerindo que as análises poderiam ser realizadas assumindo-se a independência estatística entre os *loci*.

4.5. Estrutura populacional

Os valores estimados do F_{ST} (θ de Weir & Cockerham, 1984) para os pares de amostras estão na Tabela 5. Não se observou diferenças significativas entre as três localidades, indicando alta homogeneidade genética entre as mesmas, em relação aos marcadores microssatélites, para o tamanho amostral analisado e para a escala espacial utilizada. Isto equivale dizer que as amostras comparadas devem ter sido retiradas da mesma população genética.

A mesma falta de significância foi observada quando foram eliminados das análises os *loci* Pcos17 e Pco18 (*loci* em desequilíbrio em duas das três localidades) (dados não apresentados).

5. DISCUSSÃO

5.1. Diversidade e estrutura genética em *Prochilodus costatus*

A variação genética populacional deve ser função tanto da diversidade genética disponível originalmente para a espécie (seu legado filogenético), quanto de processos contemporâneos como seleção, fluxo gênico, sistema de cruzamento etc, que governam como aquela variação é posteriormente dividida dentro e entre as populações (Avice, 2004).

De fato, correlações positivas entre a variação neutra e a adaptativa podem não ser muito altas (Hedrick, 2004). Contudo, alta variação neutra pode indicar potencial para significativa variação adaptativa. Por exemplo, há alta correlação positiva, para o peixe *Poeciliopsis occidentalis*, entre a variação em *loci* de microssatélites (variação neutra) e do MHC (*Major histocompatibility complex*) (variação adaptativa), sendo este último envolvido na resposta imune de vertebrados (Hedrick *et al.*, 2001).

Para microssatélites, tradicionalmente, a existência de alelos nulos, efeito Wahlund, acasalamentos preferenciais e amostragem não-randômica têm sido cogitados como os principais responsáveis por deficiência de heterozigotos em populações naturais (García de León *et al.*, 1997). Existe ainda a possibilidade de alguns dos *loci* estarem em regiões próximas de genes sob seleção, que, nesse caso, poderiam apresentar menor variabilidade genética (Slatkin, 1995).

Provavelmente, destes fatores, uma combinação de alelos nulos e amostragem não randômica devem ser os responsáveis pelo déficit e conseqüentemente pelos desvios das proporções genotípicas esperadas (Equilíbrio de *Hardy-Weinberg*) encontrados nas nossas análises.

O pequeno número amostral parece não ter influenciado, demasiadamente, nos números de diversidade genética, uma vez que as duas localidades de menor

amostragem (B e C) apresentaram níveis de diversidade semelhantes aos da área de maior amostragem (A). Esperava-se que a área A (barragem) fosse apresentar menores níveis de diversidade, como encontrado nos trabalhos de Souza (2003), Wasko & Galetti Jr. (2002), Hatanaka & Galetti Jr (2003) e Hatanaka *et al.* (2006), sendo que este último foi o único a utilizar marcadores microssatélites.

Ao contrário, os indivíduos coletados na região da barragem apresentaram os maiores valores de heterozigidade média (0,48). Contudo, deve-se considerar que essa foi a localidade de maior tamanho amostral. Mesmo assim, as análises de riqueza alélica, que independem do tamanho amostral, confirmaram que não há diferenças significativas entre as localidades em termos de diversidade genética.

Uma explicação para esses resultados contrastantes seria o tipo de marcador molecular utilizado, pois, a exceção do trabalho de Hatanaka *et al.* (2006), todos os outros se basearam em RAPD, um marcador de sérias deficiências como fraca reprodutibilidade (em alguns casos) e comportamento dominante (não é possível identificar os heterozigotos) (Awise, 2004; Liu & Cordes, 2004).

A diversidade genética atual é resultado de milhares de anos de evolução, no entanto, perdas irreparáveis podem ocorrer muito rapidamente (Nielsen & Kenchington, 2001; Kenchington, 2003). Os níveis de diversidade encontrados em *P. costatus* são bastante elevados sugerindo que a espécie, provavelmente, tenha um grande tamanho efetivo populacional (N_e) e não tenha experimentado nenhum efeito gargalo (afunilamento populacional), que pudesse deixar marcas nos valores de diversidade encontrados. O N_e refere-se ao número de indivíduos em uma população idealizada que teria as mesmas propriedades genéticas observadas na população real, sendo, usualmente, menor do que o tamanho real da população, por conta de diferenças nas

proporções sexuais, flutuações no tamanho populacional, variações na contribuição da progênie e outros fatores demográficos (Avice, 2004).

A estruturação genética (subdivisão de uma espécie em unidades locais inter-cruzantes) é resultado do equilíbrio dinâmico entre forças que favorecem a diferenciação (deriva, mutação e seleção disruptiva, diferentes em cada área) e forças homogeneizantes (migração, seleção purificadora, seleção balanceadora, uniformes em cada área) (Sole-Cava, 2001). Ela determina o padrão e a quantidade de variação que está disponível para evolução de uma espécie, e impõe limites para atuação da seleção natural e outras forças evolutivas (Templeton, *in press*).

Loci com muitos alelos, como os de microssatélites, têm a capacidade sem precedentes de detectar e descrever diferenças genéticas entre populações (Hedrick, 1999; Kalinowski, 2002). No entanto, diferenças genéticas estatisticamente significativas nem sempre são biologicamente ou evolutivamente significantes (Waples, 1998; Hedrick, 1999).

As altas taxas de mutação de microssatélites trazem importantes conseqüências para a estimativa de F_{ST} , porque, de fato, a probabilidade de identidade de dois genes diminui com altas taxas de mutação (Rousset, 1996). Portanto essa estatística será subestimada quando calculada para marcadores com altas taxas de mutação, qualquer que seja o modelo de mutação assumido (Hedrick, 1999; Balloux *et al.*, 2000).

Além disso, sabe-se que a expectativa de F_{ST} sob completa diferenciação não será sempre 1 (um) (Balloux & Lugon-Moulin, 2002). De fato, na maioria dos casos não será 1, por causa do efeito do alto polimorfismo (devido às altas taxas de mutação) que drasticamente diminui as expectativas das estimativas do parâmetro (Wright, 1978; Charlesworth, 1998; Hedrick, 1999).

Morton *et al.* (1993) e Charlesworth (1998) sugerem que medidas de diferenciação para *loci* hipervariáveis, como microssatélites, podem ser quase uma ordem de magnitude menor do que as de marcadores menos polimórficos, como alozimas e grupos sanguíneos.

Em alguns casos pode não haver diferenças significativas baseado em marcadores genéticos neutros, como os microssatélites, mas outros *loci* adaptativamente importantes podem ser altamente diferenciados entre as populações (Hedrick, 1999).

Segundo Waples (1998) existem limitações inerentes para a utilidade de dados genéticos no exame da estrutura de estoques em espécies de alto fluxo gênico. As dificuldades surgem porque o “sinal” genético para estruturação é relativamente fraco em espécies de alto fluxo gênicas e, conseqüentemente, várias fontes de “ruído” assumem importância relativamente grande na análise (Waples, 1998). Esse “ruído” pode afetar a acurácia e a precisão das estimativas de parâmetros genético-populacionais.

O erro amostral é uma grande fonte de “ruído” na estimativa de frequências alélicas, traduzido em dois componentes: erro intra-*locus*, que é função do número de indivíduos amostrados; e o erro inter-*loci*, que é função do número de *loci* analisados (Waples, 1998). No nosso caso, o primeiro tipo de “ruído” pode ter influenciado nas estimativas do F_{ST} . Amostrar mais indivíduos reduz o viés causado pelo erro intra-*locus*, embora não o elimine completamente. No entanto, a falta de precisão, em alguma extensão, pode ser superada pela utilização de múltiplos *loci* (Waples, 1998).

O nível de significância de um teste proporciona sozinho pouca informação, pois é necessário, também, considerar a riqueza contida nos dados e o poder do teste. Infelizmente, o poder estatístico é determinado não só pela magnitude das diferenças

entre populações, mas também pelo tamanho amostral, estratégia de amostragem, e o número de características independentes medidas (Waples, 1998).

Interpretar os valores de F_{ST} pode ser uma tarefa perigosa, pois valores idênticos do parâmetro podem ser estimados de diferentes padrões de frequências alélicas (Wright, 1978). Para essa interpretação, tem sido sugerido que valores na faixa de 0 a 0,05 indicam fraca diferenciação genética; valores entre 0,15 e 0,25, diferenciação moderada; e valores acima de 0,25 indicam grande diferenciação (Wright, 1978; Hartl & Clark, 1997). De acordo com esse critério, nossos valores estimados de F_{ST} indicariam ausência de estrutura genética populacional em *Prochilodus costatus*.

As subpopulações de *P. costatus*, analisadas neste trabalho, podem fazer parte de uma população “quase panmítica” dentro da área delimitada pelas barragens de Três Marias e de Sobradinho (alto e médio Rio São Francisco), uma área de cerca de 1.200 Km de extensão, com dezenas de tributários (perenes e temporários) utilizados para a reprodução desses e de outros peixes migradores. Estudos nesses tributários mais distantes ajudariam a conhecer melhor a estrutura genética dessas populações.

De acordo com Turner *et al.* (2004), os prochilodontídeos apresentam, em geral, grande número de adultos e devem apresentar grandes tamanhos efetivos (N_e) nas suas populações. Altos valores de N_e combinados com alto fluxo gênico, proporcionados pelos seus hábitos migratórios, tendem minimizar o efeito da deriva genética em erodir a diversidade genética intra-populacional.

As subpopulações locais de *Prochilodus costatus* devem ser amplamente influenciadas pela migração reprodutiva anual que, potencialmente, proporciona alto fluxo gênico entre elas, diminuindo as diferenças nas frequências alélicas. O fluxo gênico possibilita a entrada maciça de nova variabilidade genética que pode alterar *pools* gênicos locais drasticamente (Templeton, *in press*). Alto fluxo gênico exclui

adaptações locais (*i.e.* a fixação de alelos que são favorecidos sob condições locais) e também pode impedir o processo de especiação (Barton & Hewitt, 1985).

Por outro lado, o fluxo gênico gera novos polimorfismos nas populações, e aumenta tamanhos efetivos populacionais locais (portanto opondo-se à deriva genética), gerando novas combinações gênicas nas quais a seleção pode agir potencialmente (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Em animais com larvas e/ou gametas de baixa capacidade de dispersão, a vagilidade dos adultos constitui grande influência no fluxo gênico e, portanto, na estrutura populacional (Avice, 2004). A ausência de estruturação em *P. costatus* deve refletir seu hábito migratório ou ainda que a estratégia de amostragem combinada com o número amostral não tenham sido suficientes para detectar estruturação. Em geral, os hábitos migratórios de *P. costatus* devem proporcionar ampla oportunidade para dispersão e fluxo gênico e, portanto, seria esperada ausência ou, no máximo, baixa estrutura genética dentro da escala espacial analisada, como foi demonstrado no trabalho de Hatanaka *et al.* (2006) com *P. argenteus*. No entanto, isso não exclui a possibilidade de existir maior estruturação entre regiões mais distantes do que as consideradas neste estudo.

No entanto, estudos genéticos em outros peixes migradores da mesma região chegaram a conclusões diferentes do nosso estudo, pois o cenário de estruturação genética encontrado nesses trabalhos, através de RAPD e microssatélites (Wasko & Galetti Jr., 2002; Hatanaka *et al.*, 2003; Sousa, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006), não foi confirmado por nossos seis marcadores microssatélites.

As mesmas críticas feitas ao marcador RAPD, na comparação de diversidades genéticas, se aplicam nesse caso. Contudo, no trabalho de Hatanaka *et al.* (2006) foram utilizados marcadores microssatélites (não susceptíveis aos problemas inerentes ao

RAPD), mas o valor de F_{ST} estimado pelos autores (0,008) é muito baixo (próximo de um dos valores estimados por nós, $F_{ST}= 0,0063$), embora seja estatisticamente significativo, mas não o seja necessariamente em termos biológicos.

Estudos em peixes migradores de outras bacias também divergem quanto ao cenário de estruturação genética nesses organismos. Os estudos ainda são incipientes, mas na literatura disponível o número de trabalhos com estruturação estatisticamente significativa ou sugestiva (Awise & Felley, 1979; Sanches, 2002; Sekine *et al.*, 2002; Almeida *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2003;) é bem similar ao de trabalhos que indicam um cenário de ausência estatisticamente significativa ou sugestiva de estruturação genética populacional (Almeida *et al.*, 2003; Coronel *et al.*, 2004), incluindo nesta última categoria estudos com *Prochilodus lineatus* (Revaldaves *et al.*, 1997; Sirvasundar *et al.*, 2001) e *Prochilodus nigricans* (Vasconcelos *et al.*, 2002).

Todos esses estudos utilizaram marcadores moleculares diferentes do nosso, e comparações mais aprofundadas não seriam apropriadas devido às diferentes dinâmicas evolutivas envolvidas. Além disso, diferentes espécies de peixes migradores devem apresentar diferentes comportamentos migratórios que podem influenciar na intensidade na qual o fluxo gênico seria facilitado.

No entanto, pode-se concluir que não há consenso sobre até que ponto a migração reprodutiva seja uma agente homogeneizador de *pools* gênicos em populações de peixes migradores de água doce.

Embora, com suas limitações, estudos diretos de parâmetros demográficos (através de estudos de marcação-recaptura, dispersão no espaço e no tempo, etc) podem ser um complemento importante para estudos genéticos de estrutura populacional em *Prochilodus costatus*.

Sugerimos que novas análises com um maior número amostral, mais locais de amostragem e réplicas temporais sejam realizadas para confirmar, ou não, o *status* de uma grande população panmítica de *Prochilodus costatus* na região de Três Marias (MG).

5.2. Conservação da diversidade genética em *Prochilodus costatus*

É notório que os organismos aquáticos são as únicas espécies restantes no planeta que ainda são, em grande parte, obtidas diretamente, em números apreciáveis, do ambiente natural para consumo humano (Ryman *et al.*, 1995).

Sozinhos, os peixes de água doce constituem $\frac{1}{4}$ de todas as espécies de vertebrados e recentes avaliações sugerem que cerca de 30% delas estão ameaçadas (World Conservation Union, 2000).

Estudos teóricos sugerem que populações depauperadas geneticamente têm reduzida capacidade de adaptação a mudanças ambientais (Hoffmann & Parsons, 1997) e altas probabilidades de extinção (Mills & Smouse, 1994; Lacy, 1997; Frankham *et al.*, 2002). De fato, a *World Conservation Union* (IUCN) reconhece a manutenção da diversidade genética como uma das três prioridades globais de conservação (McNeely *et al.*, 1990). Portanto, é imperativo manter a variação intra e inter-populacional (quando esta existir) para minimizar a frequência de extinções locais e garantir a estabilidade da espécie frente às instabilidades ambientais, já que a diversidade genética é um requisito para adaptação a um ambiente em mudança (Wright, 1978; Ryman *et al.*, 1995; Vrijenhoek, 1998; Avise, 2000; Frankham *et al.*, 2002).

Estudos desenvolvidos em *Prochilodus mariae* (Flecker, 1996) demonstraram que a exclusão seletiva dessa espécie resultou em mudanças notáveis na estrutura da comunidade local, medidas por padrões de sedimentação (aumento no acúmulo de

sedimentos) e composição de assembléias de algas e invertebrados. Este estudo sugere que os peixes do gênero *Prochilodus* são elementos funcionalmente dominantes nos ecossistemas onde ocorrem, em grande parte, devido às atividades de processamento de sedimentos (conseqüência dos seus hábitos detritívoros).

Tal como *P. mariae*, os peixes de *P. costatus*, bem como os do gênero *Prochilodus*, funcionam como “engenheiros de ecossistemas” (na semântica de Coleman & Williams, 2002). Representam, portanto, uma espécie-chave e isto deveria garantir-lhe prioridade em programas conservacionistas, devido a sua grande importância ecológica na ciclagem de nutrientes e a sua endemidade. Além disso, soma-se a isso, sua importância econômica como recurso pesqueiro para as populações humanas locais onde, junto com *P. argenteus*, representa a biomassa íctica mais pescada na região do médio Rio São Francisco (Camargo & Petrere Jr., 2001), devido mais a sua abundância do que ao seu valor de mercado (Camargo & Petrere Jr., 2001).

Um problema que vem afetando os peixes migradores do São Francisco, há algumas décadas, é a construção de barragens e usinas hidrelétricas. A fragmentação de habitat ocasionada por barragens afeta a estrutura genética das populações e de seus arredores, alterando a divisão dos componentes de diversidade genética intra e inter-populacional (Vrijenhoek, 1998).

Sato & Osório (1986) relatam que as condições ambientais sofreram mudanças drásticas tanto à montante quanto à jusante da barragem de Três Marias (MG). Segundo os autores, essas mudanças podem ter sido causadas, principalmente, pela redução do fluxo d` água, baixa temperatura da água e baixas taxas de oxigênio dissolvido à jusante da barragem, que podem está influenciando alguns dos atributos biológicos dos organismos daquela região (Sato *et al.*, 1995).

Uma das formas de assegurar a conservação da ictiofauna migradora de água doce, em face da construção de barragens e usinas hidrelétricas, seria a construção de escadas que permitam aos cardumes migrarem em direção às áreas de desova à montante (inexistentes em Três Marias) e/ou a criação em cativeiro de peixes migradores com propósito de repovoamento. Contudo, esta última alternativa deve ser escolhida com cautela, pois são bem conhecidos os efeitos de depressão por exocruzamento em algumas populações repovoadas (Vieira & Pompeu, 2001), devido à tendência potencial de homogeneização de populações estruturadas e conseqüente perda de alelos e/ou complexos gênicos co-adaptados.

No entanto, segundo Sato & Godinho (2004), desde 1983 cerca de 7 milhões de alevinos de *P. argenteus*, *P. costatus*, *L. elongatus*, *B. lundii*, *S. brasiliensis* e *P. corruscans* têm sido produzidos e soltos na região à montante da barragem de Três Marias pela CODEVASF. Só em 2005, foram liberados 500 mil alevinos dessas espécies naquela região. Embora isso já venha sendo feito há mais de duas décadas, não existem relatos quantitativos de sua eficiência. Contudo, há indicações de que as populações de *B. lundii*, que estavam praticamente extintas localmente, têm repovoado essa região vagarosamente desde o início da reintrodução em 1988. Além disso, *L. elongatus*, *P. argenteus* e *P. costatus*, que eram raros nas capturas naquela região, também têm aumentado em abundância desde os anos 80 (Sato & Godinho, 2004.).

Como não existem estudos prévios da estrutura genética dos peixes migradores alvos de peixamento (repovoamento), não há como saber se os peixamentos poderiam ter induzido a homogeneização em populações previamente estruturadas.

Contudo, embora consideremos pouco provável, existe a possibilidade de esses peixamentos serem responsáveis pela fraca estrutura populacional encontrada em *P. costatus*. Isto porque, segundo Sato (comunicação pessoal), embora os peixamentos

fossem prioritários apenas na região à montante da barragem, eventualmente, alguns alevinos de *P. costatus*, bem como dos outros peixes migradores, foram liberados na região amostrada neste estudo. E na hipótese de estruturação prévia, essas reintroduções poderiam induzir à homogeneização dos *pools* gênicos locais, caso aqueles alevinos conseguissem sobreviver e obter sucesso reprodutivo.

Por causa de casos semelhantes a esse é que o conhecimento da estrutura populacional pode proporcionar diretrizes para estratégias de conservação e manejo (*e.g.* Rossiter *et al.*, 2000; Eizirik *et al.*, 2001). Assim, recomenda-se que os níveis de variabilidade genética em *Prochilodus costatus* e outros peixes migradores da bacia do Rio São Francisco sejam alvos de constante monitoramento e façam parte de planos de manejo específicos.

6. CONCLUSÕES

- O presente trabalho disponibiliza *primers* de seis microssatélites polimórficos obtidos em *P. costatus*, podendo ainda ser utilizados na amplificação heteróloga em duas outras espécies, *P. argenteus* e *P. lineatus*, todas importantes do ponto de vista econômico para a pesca de águas interiores do Brasil;
- Foram encontrados níveis similares de variação genética em *Prochilodus costatus* nas três localidades estudadas, na região da barragem de Três Marias, Minas Gerais.
- Não foram detectadas diferenças genéticas entre os peixes das três localidades, ou seja, os dados de microssatélites revelaram uma estruturação populacional muito fraca, sugerindo a existência de um único *pool* gênico para este peixe migrador.
- Essas informações devem ser confirmadas em estudos posteriores onde se utilize um maior número amostral, mais localidades e mais *loci* hipervariáveis, como os microssatélites.
- Em face de seu *status* de espécie endêmica, importante recurso pesqueiro e de grande papel ecológico, o presente trabalho proporciona um ponto de partida na execução de planos de manejo que visem à conservação da diversidade genética desse peixe.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agnèse, J.-F.; Teugels, G.G.; Galbusera, P.; Guyomard, R.; Volckaert, F. 1997. Morphometric and genetic characterization of sympatric populations of *Clarias gariepinus* and *C. anguillaris* from Senegal. *Journal of Fish Biology*, 50: 1143-1157.

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): 4692-4693.

Allendorf, F.W. & Utter, F.M. 1979. Population genetics. In: Hoar, W. S., Randal, D. J.; Brett, J. R., (Ed). *Fish Physiology*. Washington: Academic Press, p. 407-454.

Allendorf, F.W.; Ryman, N.; Utter, F.M. 1987. Genetics and fishery management: past, present and future. In: Ryman, N. & Utter, F. (Ed.). *Population Genetics & Fishery Management*, University of Washington Press, Washington, p. 1-19.

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.

Altmann, J.; Alberts, S.; Coote, T.; Dubach, J.; Geffen, E.; Haines, S.A. 1996. Behavior predicts genetic structure in a wild primate group. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 93: 5797-5801.

Avise, J.C. & Felley, J. 1979. Population structure of freshwater fishes I. Genetic variation of bluegill (*Lepomys macrochirus*) populations in man-made reservoirs. *Evolution*, 33: 15-26.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press. 464 p.

Avise, J.C. 2004. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2.ed. Sunderland: Sinauer Associates, Inc. 684p.

Ayres, M.; Ayres Jr., M.; Ayres, D.L.; Santos A.S. 2003. *Bioestat: Versão 3.0*. Sociedade civil Mamirauá, MCT-CNPQ, Belém, Pará, Brasil.

Balloux, F.; Brüner, H.; Lugon-Moulin, N.; Hausser, J.; Goudet, J. 2000. Microsatellites can be misleading: an empirical and simulation study. *Evolution*, 54: 1414–1422.

Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165.

Barton, N.H. & Hewitt, G.M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16: 113–148.

Bayley, P.B. & Petrere, M. 1989. Amazon fisheries: assessment of methods, status, and management options. In: Dodge, D.P. (Ed.). *Proceedings of the International Large*

Rivers Symposium. Canadian Special Publications in Fisheries and Aquatic Sciences, 106: 385–398.

Beacham, T.D.; Le, K.D.; Candy, J.R. 2004. Population structure and stock identification of steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) in British Columbia and the Columbia River based on microsatellite variation. *Environmental Biology of Fishes*, 69: 95-109.

Benson, G. 1999. Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 27: 573-580.

Bonetto, A.A.; Cerón, M.C.; Roldán, D. 1981. Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de peces en el Río Paraná . *Ecosur*, 8: 29–40.

Bonetto, A.A. 1986. Fish of the Paraná system. In: Davies, B.R. & Walker, K.F. (Ed.). *The Ecology of River Systems*, Holanda: Dordrecht. p. 573-588.

Bourke, A.F.G.; Green, H.A.A.; Bruford, M.W. 1997. Parentage, reproductive skew and queen turnover in a multiple-queen ant analyzed with microsatellites. *Proceedings of the Royal Society of London*, 264: 277-283.

Bowen, S.H. 1983. Detritivory in Neotropical fish communities. *Environmental Biology of Fishes*, 9:137–144.

Britski, H.A. 1972. Peixes de água doce do estado de São Paulo – Sistemática, pp.79-108. In: *Poluição e Piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca da C.P.R.N. da Secretaria da Agricultura.

Britski, H.A.; Sato, Y.; Rosa, A.B.S. 1984. *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias*: com chaves de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco. Brasília, Câmara dos Deputados, Coordenação de Publicações – CODEVASF, Divisão de Piscicultura e Pesca, 143 p.

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)*. 3 ed., Minas Gerais: Ministério da Irrigação - CODEVASF. 115p.

Camargo, S.A.F. de & Petreire, Jr., M. 2001. Social and financial aspects of the artisanal fisheries of Middle São Francisco River, Minas Gerais, Brazil. *Fisheries Management and Ecology*, 8: 163-171.

Carvalho-Costa, L.F.; Hatanaka, T.; Galetti Jr., P.M. 2006. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology Notes*, no prelo.

Cappio, L.F.; Martins, A.; Kirchner, R. 1995. *O Rio São Francisco*. Petropolis: Editora Vozes. 110 p.

Castro, R.M.C. & Vari, R.P. 2003. Family Prochilodontidae. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris Jr., C.J. (Ed.). *Check List of the Freshwaters of South and Central America.*; Porto Alegre : EDIPUCRS. p. 65–70.

Castro, R.M.C. & Vari, R.P. 2004. *Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): a phylogenetic and revisionary study.* Smithsonian contributions to Zoology, n.622. Washington, D.C.: Smithsonian books. 189 p.

Charlesworth, B. 1998. Measures of divergence between populations and the effect of forces that reduce variability. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 538–543.

Coleman, F.C. & Williams, S.L. 2002. Overexploiting marine ecosystem engineers: potential consequences for biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution*, 17: 40-44.

Cordiviola De Yuan, E. 1992. Fish populations of lentic environments of the Parana River. *Hydrobiologia*, 237: 159–173.

Coronel, J.S.; Maes, J.E.; Claus, S.; Vandamme, P.A.; Volckaert, F.A.M. 2004. Differential population history in the migratory catfishes *Brachyplatystoma flavicans* and *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pimelodidae) from the Bolivian Amazon assessed with nuclear and mitochondrial DNA markers. *Journal of Fish Biology*, 65: 859–868

Desvignes, J.F.; Laroche, J.; Durand, J.D.; Bonvet, I. 2001. Genetic variability in reared stocks of common carp (*Ciprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture*, 194: 291-301.

Eisen, J.A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein, D.B. & Schlötterer, C. (Ed.) *Microsatellites: evolution and applications*. New York: Oxford Univeristy Press. Cap. 4.

Eizirik, E.; Kim, J.H.; Menotti-Raymond, M.; Crawshaw, P.G.; O'Brien, S.J.; Johnson, W.E. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10: 65–79.

Ellegren, H. 1991. Fingerprinting birds` DNA with a synthetic polynucleotide probe (TG)_n. *Auk*, 108: 956-958.

Esteves, F.A.; Amorim, J.C.C.; Cardoso, E.L.; Barbosa, F.A.R. 1985. Caracterização limnológica preliminar da represa de Três Marias (MG) com base em alguns parâmetros ambientais básicos. *Ciência e Cultura*, 37(3): 608–617.

Estoup, A.; Jarne, P.; Cornuet, J.-M. 2002. Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetic analysis. *Molecular Ecology*, 11: 1591-1604.

Fernandes-Matioli, E.M.C. & Almeida-Toledo, L.F. 2000. Species diversity and geographic distribution of *Gymnotus* (Pisces: Gymnotiformes) by nuclear (GGAC)_n microsatellite analysis. *Genetics and Molecular Biology*, 23(4): 803-807.

Flecker, A.S. 1996. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, 77: 1845-1854.

Foresti, F.; Toledo-Filho, S.A.; Almeida-Toledo, L.F. 1992. Manejo de recursos genéticos em populações naturais. In: Agostinho, A.A. & Benedito-Cecílio, E. (Ed). *Situação atual e perspectivas da Ictiologia no Brasil*. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá. p. 58-67.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to conservation genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.

Fritzner, N.G.; Hansen, M.M.; Madsen, S.S.; Kristiansen, A. 2001. Use of microsatellite markers for identification of indigenous brown trout in a geographical region heavily influenced by stocked domesticated trout. *Journal of Fish Biology*, 58: 1197-1210.

Froese, R. & Pauly, D. *Fishbase*. Versão 21. World wide web publication. Disponível em www.fishbase.org. Acessado em 02 de fevereiro de 2006.

García de León, F.J.; Chikhi, L.; Bonhomme, F. 1997. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of Europe sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*, 6: 51-62.

Géry, J. 1977. *Characoids of the World*. New Jersey: TFH Publications, Inc.

Gottelli, D.; Sillero-Zubiri, C.; Applebaum, G.D.; Roy, M.S.; Girman, D.J.; Garcia-Moreno, J. *et al.* 1994. Molecular genetics of the most endangered canid- the ethiopian wolf *Canis simensis*. *Molecular Ecology*, 3: 301-312.

Goudet, J. 2001. *FSTAT, a Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices Version 2.9.3*. Disponível em [http:// www.unil.ch/izea/software/fstat.html](http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html).

Goldstein, D.B. & Schlötterer, C. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. New York: Oxford University Press. 351 p.

Guo, S.W. & Thompson, E.A. 1992. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361–72.

Habicht, D.; Olsen, J.; Fair, L. & Seeb, J. 2004. Smaller effective population sizes evidenced by loss of microsatellite alleles in tributary-spawning populations of sockeye salmon from the Kvichak River, Alaska drainage. *Environmental Biology of Fishes*, 69: 51-62.

Hamilton, M.B.; Pincus, E.L.; Di Fiori, A.; Flesher, R.C. 1999. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques*, 27: 500–507.

Hartl, D.L. & Clark, A.G. 1997. *Principles of Population Genetics*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.

Hatanaka, T. & Galetti Jr., P.M. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 19-25.

Hatanaka, T.; Silva, F.H.; Galetti Jr., P.M. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 153-159.

Hedrick, P.W. 1999. Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, 53: 313–318.

Hedrick, P.W.; Parker, K.M.; Lee, R. 2001. Genetic variation in the endangered Gila and Yaqui topminnows: microsatellite and MHC variation. *Molecular Ecology*, 10: 1399–1412.

Hedrick, P.W. 2004. Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management*, 197: 03–19.

Hoffmann, A.A. & Parsons, P.A. 1997. *Extreme environmental change and evolution*. Cambridge: Cambridge University Press. 271 p.

Hurlbert, S.H. 1971. The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, 52: 577–586.

IBAMA. 2003. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente. *Estatística da Pesca 2003*: grandes regiões e unidades da federação. 137 p.

IBGE. 1988. Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Estatística da pesca*. 9 p.

Kalinowski, S.T. 2002. How many alleles should be used to estimate genetic distances? *Heredity*, 88: 62–65.

Kenchington, E. 2003. The effects of fishing on species and genetic diversity In: Sinclair, M. & Valdimarson, G. (Ed.). *Responsible fisheries in the marine ecosystem*. CAB International. Cap. 14

Knapik, E.W.; Goodman, A; Ekker, M. *et al.* 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*). *Nature Genetics*, 18: 338–343.

Lacy, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *Journal of Mammalogy*, 78: 320–335.

Lins, L.V.; Machado, A.B.M.; Costa, C.N.R; Hermann, G. 1997. Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, 55 p.

Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 44: 387-401.

Liu, Z.J. & Cordes, J.F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 238: 1–37.

Martins, C.; Wasko, A.P.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 33-38

Matala, A.P.; Gray, A.K.; Heifetz, J.; Gharrett, A.J. 2004. Population structure of Alaska shorttraker rockfish, *Sebastes borealis*, inferred from microsatellite variation. *Environmental Biology of Fishes*, 69: 201-210.

McNeely, J.A.; Miller, K.R.; Reid, W.V.; Mittmeier, R.A.; Werner, T.B. 1990. *Conserving the world's biological diversity*. Switzerland: World Conservation Union, Publication Services..

Mills, L.S. & Smouse, P.E. 1994. Demographic consequences of inbreeding in remnant populations. *The American Naturalist*, 144: 412–431.

Morin, P.A.; Wallis, J.; Moore, J.J.; Woodruff, D.S. 1994. Paternity exclusion in a community of wild chimpanzees using hypervariable simple sequence repeats. *Molecular Ecology*, 3: 469-477.

Morton, N.E.; Collins, A.; Balazs, I. 1993. Kinship bioassay on hypervariable loci in Blacks and Caucasians. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 90: 1892-1896.

Nielsen, E.E.; Hansen, M.M.; Loeschcke, V. 1997. Analysis of microsatellite DNA from old scales samples of Atlantic salmon *Salmo salar*: a comparison of genetic composition over 60 years. *Molecular Ecology*, 6: 487-492.

Nielsen, E.E. & Kenchington, E. 2001. Prioritising marine fish and shellfish populations for conservation: a useful concept? *Fish and Fisheries*, 2: 328–343.

O`Ryan, C.; Harley, E.H.; Bruford, M.W.; Beaumont, M.A.; Wayne, R.K.; Cherry, M.I. 1998. Microsatellite analysis of genetic diversity in fragmented South African buffalo (*Syncerus caffer*) populations. *Animal Conservation*, 1: 85-95.

Petrere, M. 1989. River Fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management*, 4:1-16

Paetkau, D.; Calvert, W.; Stirling, I.; Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354

Paiva, M.P. 1982. *Grandes represas do Brasil*. Brasília: EDITERRA Editorial. 192p.

Paiva, M.P. 1983. *Peixes e pesca de águas interiores do Brasil*. Brasília: EDITERRA Editorial. 158p.

Presa, P. & Guiomard, R. 1996. Conservation of microsatellites in three species of salmonids. *Journal of Fish Biology*, 49: 1326-1329.

Raymond, M. & Rousset, M. 1995. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.

Reilly, A.; Elliot, N.E.; Grewe, P.M.; Clabby, C.; Powell, R.; Ward, R.D. 1999. Genetic differentiation between Tasmanian cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) and their ancestral Canadian population: comparison of microsatellite and allozyme and mitochondrial DNA variation. *Aquaculture*, 173: 459-469.

Revaldaves, E.; Renesto, E.; Machado, M.F.P.S. 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3): 381-388.

Rico, C.; Rico, I.; Hewitt, G. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society of London*, 263: 549-557.

Rossiter, S.J.; Jones, G.; Ransome, R.D.; Barratt, E.M. 2000. Genetic variation and population structure in the endangered greater horseshoe bat *Rhinolophus ferrumequinum*. *Molecular Ecology*, 9: 1131–1135.

Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, 142: 1357– 1362.

Rozen, S.; Skaletsky, H.J. 2000. PRIMER 3 on the www for general users and for biologist programmers. In: Krawetz, S. & Misener, S. (Ed.) *Bioinformatics Methods and Protocols*. Totowa: Humana Press. p. 365–386.

Ryman, N.; Utter, F.; Lalkre, L. 1995. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev. Fish. Biol. Fish.*, 5: 417-446.

Sanches, A. 2002. Análise de RAPD em *Brycon microlepis* (Characidae): um estudo populacional e suas implicações na conservação da espécie. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo. 97p

Sato, Y. & Osório, F.M.F. 1986. A pesca profissional na região de Três Marias, MG, em 1986. In: *V Encontro Anual de Aqüicultura de Minas Gerais*. **Anais**. p. 91.

Sato, Y.; Miranda, M.O.T.; Bazzoli, N.; Rizzo, E. 1995. Impacto do reservatório de Três Marias sobre a Piracema à jusante da Barragem. In: *XI Encontro Brasileiro de Ictiologia*, PUC-Campinas. **Anais**. p2.

Sato, Y. & Godinho, H.P. 1999. Peixes da bacia do Rio São Francisco. In: Lowe-McConnell (Ed.) *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. Tradução de São Paulo: EDUSP. p. 401–413 .

Sato, Y. & Godinho, H.P. 2004. Migratory Fishes of the São Francisco River In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A. (Ed.). *Migratory Fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. Victoria (Canadian):IDRC. 380 p.

Schlötterer C. & Pemberton, J. 1998. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations - a critical review. In: Desale, R. & Schierwater, B. (Ed.). *Molecular Approaches to Ecology and Evolution*. Birkhäuser: Verlag Basel. p. 71-86.

Schlötterer, C.; Ritter, R.; Harr, B.; Brem, G. 1998. High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*, 15: 1269–1274.

Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.

Schug, M.D.; Mackay, T.F.C.; Aquadro, C.F. 1997. Low mutation rates of microsatellite loci in *Drosophila melanogaster*. *Nature Genetics*, 15: 99-102.

Schuler, G.D.; Boguski, M.S.; Stewart, E.A. *et al.* 1996. A gene map of the human genome. *Science*, 274: 540–546.

Segelbacher, G. & Storch, I. 2002. Capercaillie in the Alps: genetic evidence of metapopulation structure and population decline. *Molecular Ecology*, 11: 1677-1699.

Sekine, E.S; Prioli, A.J.; Prioli, S.M.A.P.; Júlio Jr., H.F. 2002. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. *Acta Scientiarum*, 24: 507-512.

Shaw, P.W.; Turan, C.; Wriqth, J.M.; O'Connell, M.; Carvalho, G.R. 1999. Microsatellite DNA analysis of population structure in Atlantic herring (*Cupea harengus*) with direct comparison to allozyme and mtDNA RFLP analysis. *Heredity*, 83: 490-499.

Sillero-Zubiri, C. & Macdonald, D. 1997. *The ethiopian wolf: status survey and conservation action plan*. IUCN/SSC Canid Specialist Group.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Ortí, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407–417.

Slatkin, M. 1995. Hitchhiking and associate overdominance at a microsatellite locus. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 473–480.

Smith, T.B.; Wayne, R.K.; Girman, D.J.; Bruford; M.W. 1997. A role for ecotones in generating rainforest biodiversity. *Science*, 276: 1855-1857.

Solé-Cava, A.M. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: Matioli, S.R. (ed.). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos. p 172-192.

Sousa, A.B. de. 2003. Análise da variabilidade genética do surubim do São Francisco, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae): subsídios à conservação e ao cultivo da espécie. Tese de Doutorado-Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

Spruell, P.; Hemmingsen, A.R.; Howell, P.J.; Kandal, N.; Allendorf, F.W. 2003. Conservation genetics of bull trout: geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 4: 17–29.

Stallings, R.L.; Ford, A.F.; Nelson, D.; Torney, D.C.; Hildebrand, C.E.; Moyzis, R.K. 1991. Evolution and distribution of (GT)_n repetitive sequences in mammalian genomes. *Genomics*, 10: 807-815.

SUVALE. 1973. *Diagnóstico e programação do setor agropecuário, da pesca e da piscicultura na área de Três Marias*. Belo Horizonte: Secretaria de Estado de Agricultura de Minas Gerais (Report). 52 p.

Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 17: 6463-6471.

Taylor, A.C.; Sherwin, W.B.; Wayne, R.K. 1994. Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiorhinus krefftii*. *Molecular Ecology*, 3: 277-290.

Taylor, M.I. & Verheyen, E. 2001. Microsatellite data reveals weak population substructuring in *Copa dichromis* sp., a demersal cichlid from lake Malawi, África. *Journal of Fish Biology*, 59: 593-604.

Templeton, A. *in press*. Population genetics and microevolutionary theory. To be published by Wiley & Sons.

Travassos, H. 1960. Catálogo dos peixes do vale do rio São Francisco. *Boletim da Sociedade Cearense de Agronomia*, 1:1-66.

Turner, T.F.; McPhee, M.V.; Campbell, P.; Winemiller, K.O. 2004. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*, 64: 186-201.

Vasconcelos, W.R.; Nascimento, H.L.; Teixeira, A.S.; Farias, I.P. 2004. Confirmação de panmixia em populações de curimatã (*Prochilodus nigricans*) da bacia Amazônica. In: X Simpósio de citogenética e genética de peixes. *Anais*. Natal-Rio grande do Norte. UFRN.

Vieira, F. & Pompeu, P.S. 2001. Peixamento, uma alternativa eficiente? *Ciência Hoje*, 30: 28-33.

Vrijenhoek, R.C. 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53: 394–412 (Supplement A).

Zane, L.; Bargelloni, L.; Patarnello, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

Wasko, A.P. & Galetti Jr., P.M. 2002. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474: 131–137.

Waples, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, 89: 438–450.

Weber, J.L. & May, P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388-396.

Weir, B.S. & Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

Welcomme, R.L. 1979. *Fisheries Ecology of Floodplain Rivers*. New York: Longman, Inc.

Welcomme, R.L. 1990. Status of fisheries in South American rivers. *Interciencia*, 15:

337–345.

World Conservation Union (IUCN). 2000. *The 2000 IUCN red list of endangered species*. Switzerland: IUCN.

Wright, S. 1978. *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 4: Variability Within and Among Natural Populations*. Chicago, IL: The University of Chicago Press.

Young, S.F.; Downen, M.R.; Shaklee, J.B. 2004. Microsatellite DNA data indicate native population of kokanee, *Oncorhynchus nerka*, in the Lake Sammamish basin, Washington. *Environmental Biology of Fishes*, 69: 63-79.

8. ANEXOS

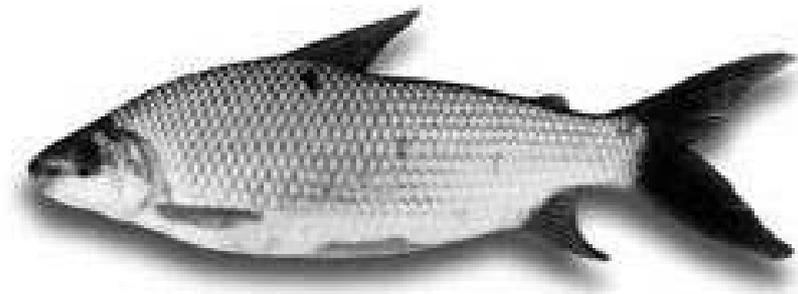
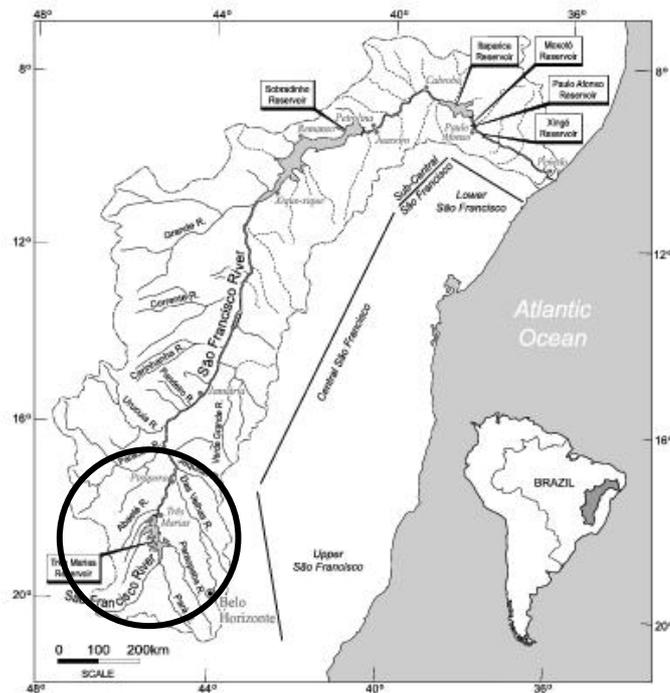


Figura 1: Exemplar de curimatá-piôa, *P. costatus* (tamanho máximo de 42 cm).



Figura 2: Foto aérea da barragem de Três Marias, Minas Gerais.

a)



b)

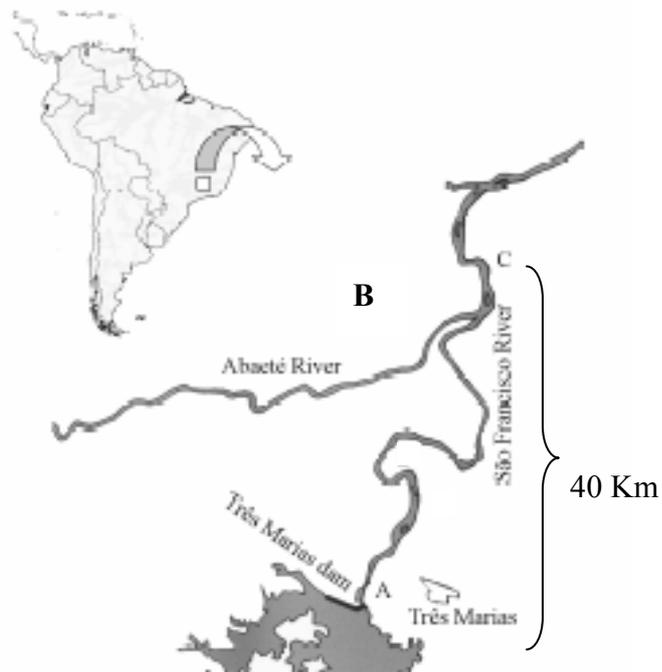


Figura 3: a) Mapa da Bacia do Rio São Francisco, mostrando no círculo a região da barragem de Três Marias (retirado de Sato & Godinho, 2004); b) Mapa onde estão localizados os locais de coleta à jusante da barragem de Três Marias: A: imediatamente à jusante da barragem de Três Marias; B: Rio Abaeté; C: região à jusante da confluência entre os rios Abaeté e São Francisco (retirada de Hatanaka & Galetti Jr., 2003).

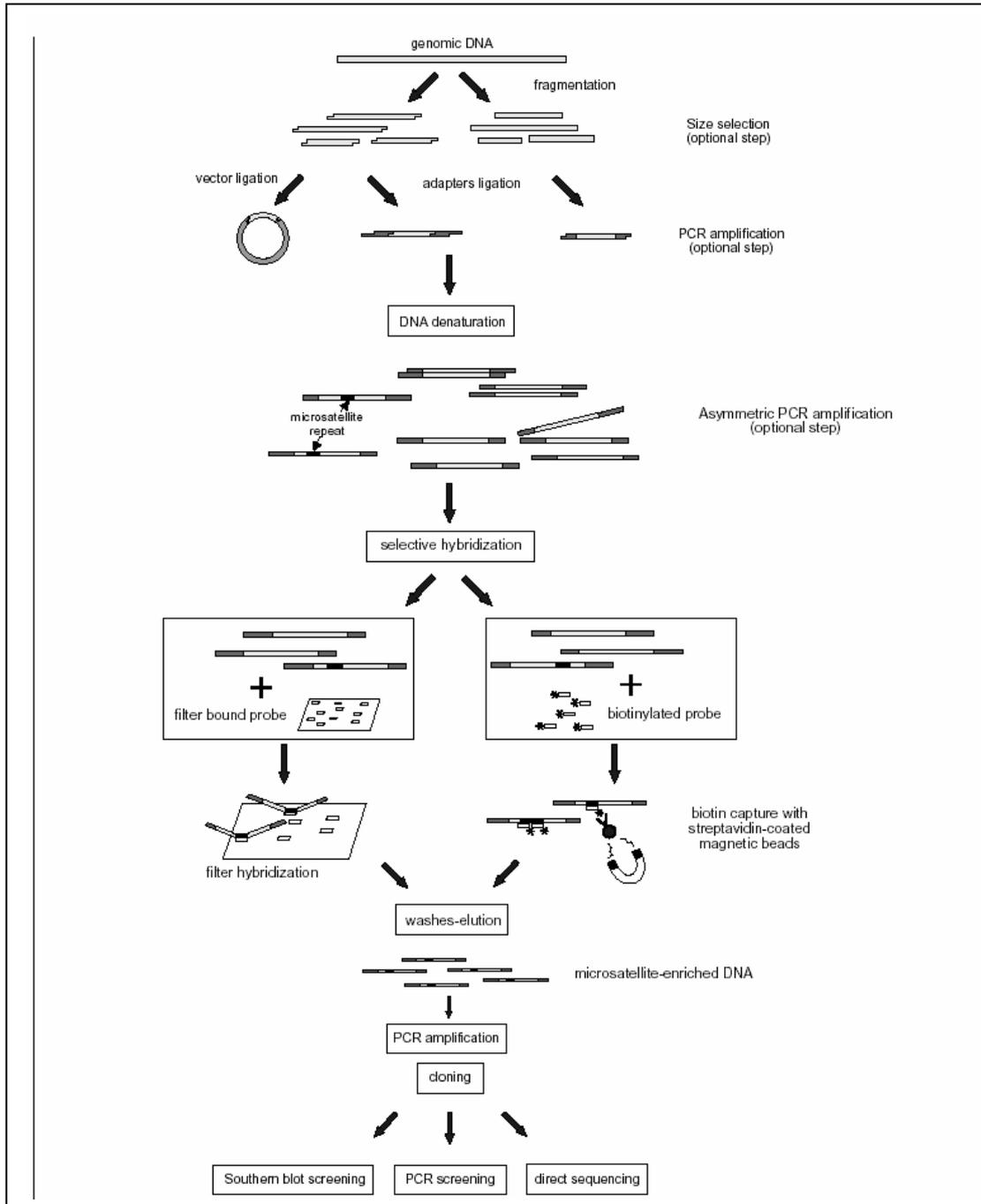


Figura 4: Esquema simplificado do isolamento de microssatélites por bibliotecas enriquecidas (Figura retirada de Zane *et al.*, 2002).

9. APÊNDICES

Tabela 1: Nomenclatura do *locus* monomórfico, natureza da repetição, seqüência dos *primers*, temperatura de *annealing* (T_a), tamanho amostral (n), tamanho dos alelos em pares de bases (pb) e número de alelos para sete *loci* monomórficos de microssatélites isolados em *Prochilodus costatus*.

<i>Locus</i>	Repetição	Seqüência dos <i>primers</i>	T_a (°C)	n	Tamanho (pb)	Nº de alelos
Pcos01	(TG) ₂₀	F:GCCTAGCTAGCAGAATCAC R:ACAGCTATGACCATGATTAC	55,6	20	176	1
Pcos10	(AAAC) ₅	F:CAGGACAAACATTGACTATC R:CATCCTCTTGCATTACAG	53,4	20	222	1
Pcos11	(AGAGG) ₄	F:CACACAGAATCAAGCTCCTC R:AGAAAGAGGGATCTTTGACC	62,8	20	164	1
Pcos12	(CTTGGT) ₂	F:GCGTGGAATAGAAATCTGAC R:AGAATCATTCCCAACAGTG	63,5	20	191	1
Pcos14	(TC) ₄₉	F:CGTGAATGTGCTTTATATGC R:AATGCCATTTCTGATTAAGG	47,0	20	189	1
Pcos16	(CA) ₂₂	F:GGAATGCAGTAAACCACATC R:CTGACCCTATAAATCCACCTC	56,0	20	156	1

Tabela 2: Nomenclatura do *locus* polimórfico e número de acesso no GeneBank, natureza da repetição, seqüência dos *primers*, temperatura de *annealing* (T_a), tamanho amostral (n), amplitude dos alelos em pares de bases (pb), número de alelos, heterozigosidades observada (H_o) e esperada (H_e) para sete *loci* polimórficos de microssatélites isolados em *Prochilodus costatus*.

<i>Locus</i>	Repetição	Seqüência do <i>primer</i>	T_a (°C)	n	Amplitude (pb)	Nº de alelos	H_o	H_e
Pcos03 DQ267693	(CTGT) ₅	F: CTGGAGTAGCATGAGGAG R: GTTAAACAGCATAGTGATGG	55,6	48	212-228	05	0,38	0,54
Pcos04 DQ269986	(GT) ₁₁ (GA) ₇ (GTGA) ₂	F: GCCTTTTATATGGCAGTATC R: GTTCTGTTTTCCAGTTAGTG	59,8	34	152-180	07	0,35	0,68
Pcos07 DQ267695	(AACAAA) ₃	F:TCTCACAGAGACTAACATGC R:TCTAGGGTTCACAAACTTC	48,1	36	220-322	08	0,03	0,63
Pcos14 DQ267694	(TC) ₄₉	F: CGTGAATGTGCTTTATATGC R: AATGCCATTTCTGATTAAGG	47,0	47	204-262	21	0,89	0,92
Pcos17 DQ267696	(CAAA) ₁₃	F: ACGGTAATGATGGGTATTTG R: CGTTGTTTAAACCCTTCTCAG	51,3	46	158-242	20	0,57	0,80
Pcos18 DQ267697	(GT) ₂₀	F: TCTCTTCTCACACACCTTCC R: TGATTACCAGCAACAGTTTG	55,6	48	208-250	10	0,31	0,73
Pcos20 DQ267698	(GACA) ₆	F: GTGTACATTGGCCTGTTTATC R: AGGGCAGTTAGTGTCACATC	55,6	32	170-186	02	0,19	0,17

Tabela 3: Localidades com n amostral e aspectos da diversidade genética em *Prochilodus costatus*: NA: número de alelos, NAp: número de alelos privados, Ho: heterozigidade observada, He: heterozigidade esperada, F_{IS}: coeficiente de endocruzamento, P: valor de p para desvio do Equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (com correção de Bonferroni). A= Barragem; B= Rio Abaeté e C= Jusante Abaeté/São Francisco.

Localidade	Estatística	Locus						
		Pcos03	Pcos04	Pcos14	Pcos17	Pcos18	Pcos20	Média/Total
A (n =24)	NA	5	4	16	15	6	2	8/48
	NAp	1	1	3	3	1	0	1,5/9
	Ho	0,43	0,35	0,95	0,75	0,35	0,16	0,48
	He	0,44	0,65	0,92	0,89	0,73	0,15	0,66
	F _{IS}	0,037	0,468	-0,031	0,162	0,527	-0,063	0,214
	P	0,6722	0,0036*	0,4405	0,1678	0,0001*	1	0,0003*
B (n=17)	NA	4	5	12	14	6	2	7,57/43
	NAp	0	1	2	3	2	0	1,3/8
	Ho	0,25	0,50	0,75	0,64	0,21	0,23	0,44
	He	0,54	0,59	0,90	0,83	0,60	0,21	0,65
	F _{IS}	0,547	0,165	0,172	0,238	0,655	-0,091	0,307
	P	0,0030*	0,0790	0,0128	0,0670	0,0000*	1	0,0000*
C (n=16)	NA	4	8	15	09	7	3	7,43/46
	NAp	0	4	2	1	2	1	1,6/10
	Ho	0,38	0,53	1,00	0,27	0,32	0,27	0,42
	He	0,57	0,63	0,95	0,60	0,80	0,25	0,66
	F _{IS}	0,345	0,164	-0,055	0,564	0,615	-0,071	0,281
	P	0,1327	0,1429	0,7130	0,0011*	0,0000*	1	0,0000*

*significativo (p< 0,05)

Tabela 4: Valores de riqueza alélica para as três localidades (A= Barragem; B= Rio Abaeté e C= Jusante Abaeté/São Francisco).

<i>Locus</i>	A	B	C
Pcos03	3,986	3,902	3,885
Pcos04	3,549	4,706	6,993
Pcos14	12,312	10,418	13,322
Pcos17	11,552	11,602	7,474
Pcos18	5,157	5,351	6,415
Pcos20	1,949	1,998	3,000
Média*	6,4175	6,3295	6,8481

* Valores não diferentes, significativamente, uns dos outros ($p > 0,05$), pelos testes de Kruskal Wallis, Man-Whitney e de Wilcoxon (vide resultados para os valores de p).

Tabela 5: Valores estimados de F_{ST} (par-a-par) e sua significância, após correção de Bonferroni, para os pares de amostras (em parênteses os valores de p). (A= Barragem; B= Rio Abaeté e C= Jusante Abaeté/São Francisco).

	A	B	C
A	-	-0,0085 NS (0.60000)	0,0038 NS (0.60000)
B	-	-	0,0063 NS (0.51667)

NS: Não significativo ($p > 0,05$).