

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“Caracterização da estrutura genética de  
populações residentes e migradoras da  
espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do  
rio Mogi-Guaçu”**

BRUNO CÉSAR ROSSINI

SÃO CARLOS  
NOVEMBRO – 2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**“Caracterização da estrutura genética de populações  
residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da  
Bacia do rio Mogi-Guaçu”**

Bruno César Rossini

Orientadora: Prof. Dr. Patrícia  
Domingues de Freitas

*Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Evolução, da  
Universidade Federal de São  
Carlos, como parte dos  
requisitos para a obtenção do  
título de Mestre em Genética e  
Evolução*

SÃO CARLOS

NOVEMBRO – 2010

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

R835ce

Rossini, Bruno César.

Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu / Bruno César Rossini. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
121 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Genética animal. 2. Microsatélites. 3. Variabilidade genética. 4. Dourado (Peixe). I. Título.

CDD: 591.15 (20ª)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA ESTRUTURA GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES RESIDENTES E MIGRADORAS DA ESPÉCIE  
*SALMINUS BRASILIENSIS* DA BACIA DO RIO MOGI-  
GUAÇU.**

Dissertação de Mestrado de Bruno César Rossini

Banca Examinadora

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas



Profa. Dra. Fernanda Simões de Almeida



Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf



Aos meus pais e  
ídolos, Sônia e  
Antonio, de força e  
amor incomparáveis

“Uma mente que se abre a uma  
nova idéia jamais volta ao seu  
tamanho original’  
*Albert Einstein*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre me dar força e ânimo em todas as horas da vida.

Ao programa de pós-graduação em Genética e Evolução pela oportunidade de realizar o mestrado.

A FAPESP (Processo 2008/07453-2) e ao CNPq pelo apoio financeiro indispensável durante a realização deste trabalho.

Aos meus pais e irmão por sempre me apoiarem e nunca barrarem meus sonhos, mesmo não entendendo o que eu pretendia fazer.

A Leila (Linda) uma pessoa que sem dúvida mudou minha vida e que, em hipótese alguma, poderá ser esquecida.

A minha orientadora Patrícia, que com muita paciência, me ajudou a dar os primeiros passos nesta luta para o mundo científico.

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr que abriu as portas de seu laboratório e que sem medir esforços, sempre me ajudou nos trabalhos realizados e foi o responsável pela revisão deste trabalho.

Aos professores Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo pela amizade nestes anos e ao Dr. Orlando Moreira-Filho por toda a amizade, disposição e confiança que me foram depositados para esta e para as próximas jornadas.

A bióloga Rita de Cássia G. de Alcântara Rocha e ao Dr. José Augusto Senhorini, pesquisadores do CEPTA/ICMBio que gentilmente cederam as amostras para este trabalho.

Aos amigos Fernando (Testa), Bello, Daniel, Beto, Carla e Cris. A todos os companheiros de laboratório, vizinhos, visitantes em geral do laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, onde passei todos estes anos.

Aos técnicos de laboratório, em especial ao Pedro Luis Gallo que segurou muita barra e me ajudou muito durante este mestrado.

A todos os colegas de aulas, de faculdade e de vida que de uma forma ou de outra, garantiram a minha auto-estima elevada e que contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) é um excelente peixe migrador, possuindo grande porte e larga distribuição na América do Sul, com presença nas bacias dos rios Paraná, Uruguai, Prata e Paraguai (Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai), na drenagem da Laguna dos Patos (Rio Grande do Sul, Brasil) e na porção superior do sistema do alto rio Mamoré e Chaparé (Bolívia). Este peixe é muito apreciado na pesca esportiva e gastronomia. Porém, com a crescente degradação de habitats, a sobrepesca e o represamento de rios para fins de geração de energia elétrica, a fauna dessas áreas vem sofrendo grandes impactos, sendo necessários estudos que visem sua conservação. Dentro desta abordagem, marcadores moleculares microssatélites vêm sendo utilizados para avaliar a estrutura genética de populações naturais com o objetivo de subsidiar programas de manejo e conservação. Apesar dos microssatélites serem marcadores extremamente úteis, para muitos organismos incluindo o dourado, não há locos espécie-específicos descritos. Desta forma, no presente trabalho foram utilizados locos heterólogos descritos para três espécies relacionadas à *S. brasiliensis* em oito populações (sendo quatro residentes e quatro migradoras). Amostras de 201 animais foram coletadas no rio Mogi-Guaçu (região da Cachoeira de Emas, município de Pirassununga, SP) durante os anos de 2007 a 2009, incluindo os períodos reprodutivos (Novembro a Fevereiro) e não reprodutivo (Março a Outubro). O DNA foi extraído utilizando protocolo fenol:clorofórmio:álcool isoamílico. Foram testados 29 locos microssatélites, sendo 16 descritos para *Salminus franciscanus*, seis para *Brycon hilarii* e sete para *Brycon opalinus*. Deste total, apenas dez locos (nove de *S. franciscanus* e um de *B. opalinus*) demonstraram



excelente padrão de amplificação e alto polimorfismo, sendo utilizados nas análises populacionais de *S. brasiliensis*. As análises estatísticas foram feitas nos programas Genepop 4.0 (EHW, níveis de heterozigosidade, desequilíbrio de ligação), FSTAT 2.9.3. ( $F_{ST}$ , diversidades gênica e riqueza alélica, Fis), GenAEx 6 (alelos privados), Popgene 1.31. (distância e identidades genéticas), Micro-Checker (alelos nulos) e Structure 2.3.1. (teste de atribuição e diferenciação populacional). O número de alelos variou de oito (Sfra18) a 48 (Sfra02), considerando as oito populações conjuntamente. Os níveis de heterozigosidade média observada variaram de 0,668 (RT-07/2008) a 0,776 (MT-01/2009), sendo que sete populações apresentaram-se fora do EHW para pelo menos um loco. Os valores de distância e identidade genética de Nei variaram, respectivamente, de 0,08 a 0,29 e 0,75 a 0,92. Os dados obtidos demonstram que estas populações apresentam alta variabilidade genética intra-populacional e baixa diferenciação entre as populações aqui analisadas. Os valores de  $F_{ST}$ , juntamente com os dados de diferenciação gênica e genotípica e análises no programa Structure apontam para a provável existência de pelo menos duas populações residentes diferenciadas. Para as populações amostradas dentro do período reprodutivo nenhuma estruturação foi identificada. Estes resultados podem auxiliar a entender melhor o comportamento migratório e reprodutivo destes animais na região de Cachoeira de Emas, contribuindo para proposições de ações de manejo relacionadas à pesca e conservação desta importante espécie de peixe migrador.

**Palavras-chave:** dourado, genética da conservação, microssatélites, estruturação de populações, locos heterólogos.

## ABSTRACT

Dourado (*Salminus brasiliensis* Cuvier, 1816) is an excellent migratory fish, possessing large body and wide distribution in South America, with presence in Paraná, Uruguay, Paraguay and La Plata River Basins (Argentina, Brazil, Uruguay and Paraguay), in drainage of Laguna dos Patos (Rio Grande do Sul state, Brazil) and the upper portion of the Mamoré and Chaparé River system (Bolivia). This fish is much appreciated in gastronomy and sport fishing. However, with increasing habitat degradation, overfishing and damming of rivers due to electric power generation, the fauna of these areas has suffered large impacts, and studies aimed at conservation are needed. In this approach, microsatellite markers have been used to assess the genetic structure of natural populations in order to provide data for management and conservation programs. Despite the microsatellite markers are extremely useful for many organisms including dourado, there are not species-specific loci described yet. Thus, in the present study we used heterologous loci, described for three species related to *S. brasiliensis* in eight populations of this fish (four residents and four migratory). Samples of 201 animals were collected in the Mogi-Guaçu River (Cachoeira de Emas, Pirassununga, SP) during the years 2007-2009, including reproductive periods (November-February) and non-reproductive (March-October). DNA was extracted using protocol phenol: chloroform: isoamyl alcohol. We tested 29 microsatellite loci, 16 were described for *Salminus franciscanus*, six for *Brycon hilarii* and seven for *Brycon opalinus*. Of this total, only ten loci (nine for *S. franciscanus* and one for *B. opalinus*) have demonstrated excellent amplification and high polymorphism, being used in population analysis of *S. brasiliensis*. Statistical analysis was performed in

Genepop 4.0 (HWE, heterozygosity, linkage disequilibrium), FSTAT 2.9.3. ( $F_{ST}$ , genetic diversity and allelic richness,  $F_{is}$ ), GenAlEx 6 (private alleles), Popgene 1.31. (distance and genetic identities), Micro-Checker (null alleles) and Structure 2.3.1. (assignment test and population differentiation). The number of alleles ranged from eight (Sfra18) to 48 (Sfra02), considering all populations together. The levels of observed heterozygosity ranged from 0,668 (RT-07/2008) to 0,776 (MT-01/2009), and seven populations were out of the HWE at least for one locus. The values of Nei's distance and genetic identity varied, respectively, from 0,08 to 0,29 and 0,75 to 0,92. The data show that these populations have high intra-population genetic variability and low population differentiation between them. The  $F_{ST}$  values, together with the data of gene and genotypic differentiation and the analysis in the software Structure pointed to the existence of at least two populations outside the breeding period in the analysis. For populations sampled within the reproductive period no structure was identified. These results may help to better understand about the migratory behavior and their reproduction in the region of Cachoeira de Emas, contributing to management actions related to fisheries and conservation of this important migratory fish species.

**Keywords:** dourado, conservation genetics, microsatellites, population structure, heterologous loci.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Mapa da bacia do Alto Paraná. Os pontos indicam as barragens presentes em toda a bacia. Mapa retirado de Agostinho et al. (2003).....4
- Figura 2. Distribuição do gênero *Salminus* na América do Sul. Retirado de Lima, 2006.....6
- Figura 3. Aspecto morfológico de um indivíduo da espécie *S. brasiliensis*. Fonte: FISHBASE (<http://www.fishbase.org/>).....6
- Figura 4. Foto ilustrativa dos pontos de coleta realizados na região de Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP. Gentileza das coordenadas geográficas de Rita de Cássia G. de Alcântara Rocha, Bióloga/Analista Ambiental, CEPTA/ICMBio.....23
- Figura 5. Esquema exemplificando a técnica proposta por Schuelke (2000). A figura (A, B e C) mostra o mix de *primers* (*forward*, *reverse* e M13) utilizados. Em D segue-se os ciclos de amplificação dos *primers* (geralmente 30 ciclos); em E segue o ciclo de amplificação dos fragmentos com a adição da cauda M13; em F é demonstrado o fragmento final formado marcado com fluoróforo. Retirado de Schuelke (2000).....27
- Figura 6. Exemplo de um teste de atribuição em que a estruturação populacional não pode ser evidenciada. Os indivíduos estão representados por barras verticais. Note que cada indivíduo possui a mesma probabilidade de pertencer a cada grupo diferente (cada grupo é representado por uma cor diferente) e que deste modo, não existe subdivisões entre eles.....39
- Figura 7. Quantificação de DNA de três indivíduos pertencentes à população residente (RA-10/2007) da barragem de Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP. Ao lado está o marcador de peso molecular (*Low Mass DNA Invitrogen*) e suas concentrações em ng; acima, o número dos indivíduos amostrados.....41
- Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando o resultado da reação de PCR em termociclador de gradiente de temperatura. Oito dos 14 *primers* já descritos estão demonstrados. Ao lado está indicado em pb o tamanho dos fragmentos (1 KB Plus DNA Ladder, Invitrogen); cada loco está mostrado com barras; Os números de 1 a 12 indicam as temperaturas analisadas segundo a tabela 6. Testes executados no Mastercycler gradient, Eppendorf. Foi utilizada a Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) nestes testes.....44
- Figura 9. Gel de agarose 2% evidenciando o padrão de amplificação de alguns locos de *Brycon* (*B. hilarii* em A e *B. opalinus* em B). Os testes foram conduzidos com MasterMix GoTaq DNA Colorless, Promega e o ciclo *touch-down*. Acima em cada figura está o número da amostra utilizada seguida de um controle negativo de amplificação (Ø). Ao lado está o marcador molecular de tamanho dos fragmentos (1 kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) indicado em pb.....44.

Figura 10. (A) Teste de gradiente de temperatura de alguns locos isolados de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*. O nome de cada loco encontra-se na parte superior. (B) Amplificação do loco Sfra01 após novo teste. Nota-se a presença de bandas inespecíficas. Ao lado de cada figura temos o marcador de peso molecular (*Ladder*) com seus respectivos tamanhos. Abaixo, indicado em °C encontra-se as temperaturas analisadas.....47

Figura 11. Etapa de validação dos locos isolados de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*. Nos locos Sfra02, Sfra03, Sfra10, Sfra13 e Sfra15 é possível a visualização da presença de heterozigotos ou alelos de diferentes tamanhos. Gel de agarose 3%. Acima da figura está indicado o nome do loco testado; ao lado encontra-se o marcador de tamanho molecular (*Ladder*) e seus respectivos tamanhos em pb; abaixo estão indicados os números das diferentes amostras utilizadas nesse teste.....48

Figura 12. Resultados da genotipagem de três locos monomórficos (Sfra06, Sfra07 e Sfra09) demonstrados em apenas três indivíduos. Todos os locos estão marcados com o fluoróforo FAM. Os locos foram considerados como monomórficos após análises em pelo menos 15 indivíduos. (A) O loco Sfra06 apresentou tamanho de alelo para todos os indivíduos de 366pb, (B) o loco Sfra07 de 198pb e (C) o loco Sfra09 de 236pb.....51

Figura 13. Análise da genotipagem de dois locos considerados monomórficos pela presença de múltiplas bandas em todos os indivíduos testados. (A) Loco Sfra08 amplificado com ciclo clássico com adição M13, marcado com fluoróforo HEX. (B) Loco Sfra12 amplificado com clássico com adição M13, marcado com fluoróforo TET. (C) Loco Sfra08 amplificado com ciclo proposto por Arruda et al. (2010). Verifica-se que não houve redução do sinal de bandas inespecíficas.....52

Figura 14. Gráfico de distribuição dos alelos entre as populações analisadas. Número médio de alelos por loco encontrados em cada população ( $N_a$ ); número médio de alelos privados por loco ( $N_{ap}$ );  $H_e$  e  $H_o$  referem-se às heterozigosidade esperada e observada, respectivamente. No eixo da ordenadas à esquerda temos os números de alelos e à direita, os valores de heterozigosidade. Abaixo estão as populações analisadas. Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.....58

Figura 15. Teste de atribuição de todas as populações para  $K=8$ . Note a presença de grupos populacionais presentes em RA-10/2007 e RL-04/2009. Cada cor indica um grupo diferente e cada barra indica um indivíduo. Ao lado, está indicada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada grupo.....67

Figura 16. Teste de atribuição das populações ( $K=8$ ) ordenadas por suas probabilidades de pertencer a cada grupo. Desse modo, podemos ver a presença de quatro grupos mais definidos. Repare que estes grupos estão, em sua maioria, presentes nas duas populações

residentes (RA-10/2007 e RL-04/2009). As mesmas características da figura anterior foram mantidas. ....67

Figura 17. (A) Gráfico dos valores médios de Ln das probabilidades de cada K. À esquerda estão os valores de Ln (K) e acima os valores de K. (B) Valores de delta (K), segundo correção de Evanno et al. (2005), mostrando o maior valor de delta (K) para K=2. À esquerda estão os valores de delta (K) e abaixo, os diferentes K testados. O desvio padrão para cada K testado está representado na forma de uma barra vertical. ....68

Figura 18. Valores de Ln das probabilidades e correção de Evanno et al. (2005) para cada K testado nas populações RA-10/2007 (A e B) e RL-04/2009 (C e D). O desvio padrão para cada K testado está representado na forma de uma barra vertical. ....69

Figura 19. Teste de atribuição realizado somente para a população RA-10/2007, com K=4. Cada cor indica um grupo diferente e cada barra indica um indivíduo. Ao lado, está indicada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada grupo. ....70

Figura 20. Teste de atribuição realizado somente para a população RL-04/2009. Cada cor indica um grupo diferente e cada barra indica um indivíduo. Ao lado, está indicada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada grupo. ....70

Figura 21. (A) Gráfico dos valores de Ln das probabilidades de K. À esquerda estão os valores de Ln (K) e acima os valores de K. (B) Gráfico dos valores de delta (K). À esquerda estão os valores de delta (K) e abaixo, os diferentes K testados. ....72

Figura 22. Resultado do teste de atribuição sem as populações RA-10/2007 e RL-04/2009. Note que a probabilidade de cada indivíduo (representado por uma barra vertical) estar presente em cada uma das K=8 possíveis populações é semelhante para todas, ou seja, todos os indivíduos têm semelhantes probabilidades de estarem presentes em qualquer uma das K=8 populações. ....72

Figura 23. Testes com cada possível sub-população dentro de RA-10/2007 e RL-04/2009, com K=13. Os números de 1 a 4 indicam cada sub-população dentro de RA-10/2007 e os números de 5 a 7 as sub-populações dentro de RL-04/2009. Note que há formação de grupos dentro de cada uma dessas populações subdivididas e para o restante das populações, esta subdivisão não é definida. ....73

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Amostragem de *S. brasiliensis* realizadas nos anos de 2007, 2008 e 2009, na região de Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP. ....24
- Tabela 2. Lista dos locos caracterizados para a espécie *Brycon hilarii*, com número de alelos ( $N_A$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_E$ ) baseadas em uma amostra de 30 indivíduos. Retirado de Sanches e Galetti (2006) .....28
- Tabela 3. Lista dos locos caracterizados para a espécie *Brycon opalinus*, com número de alelos ( $N_A$ ), tamanho amostral ( $n$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_E$ ). Retirado de Barroso et al. (2003). ....29
- Tabela 4. Dados dos locos isolados e caracterizados de *S. franciscanus*. Estão apresentados os *motifs* microssatélites, os tamanhos dos alelos, números de alelos ( $N_A$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ). Dados retirados de (Rossini et al., 2010).....29
- Tabela 5. Temperaturas pré-estabelecidas para as reações de gradiente de temperatura dos locos de *Brycon* (12 temperaturas, conforme disponível no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf) e para *S. franciscanus* (seis temperaturas, conforme disponível para o termociclador Veriti 96 well Applied Biosystems) para a determinação da Temperatura de anelamento (TA) dos conjuntos de *primers* testados. ....30
- Tabela 6. Resumo dos dados de transferabilidade dos locos de *Brycon sp.* para *S. brasiliensis*. Estão detalhados os tamanhos dos fragmentos em gel de agarose 2% e o ciclo utilizado.....43
- Tabela 7. Resumo dos dados obtidos para a transferabilidade dos locos de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*. Estão indicados os locos testados, o número da amostra utilizada em cada teste bem como a concentração inicial de DNA utilizada. As temperaturas em que houve amplificação também estão demonstradas (segundo tabela 6), a temperatura escolhida para a condução dos testes de validação populacional, e também os tamanhos dos fragmentos em gel de agarose 2%.....46
- Tabela 8. Descrição dos ciclos e temperaturas utilizadas para amplificação dos locos de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*.....48
- Tabela 9. Relação de todos os locos heterólogos em *S. brasiliensis*. Para alguns dos locos não foi realizada a etapa de genotipagem, apenas a avaliação de transferabilidade. Estão indicados se houve ou não genotipagem dos locos, se houve avaliação de polimorfismo em tais locos e se possível, determinado o tamanho dos alelos. O número de alelos por loco, obtidos com base em todas as amostragens realizadas, está presente na última coluna à direita.....53

Tabela 10. Estimativas de erros de genotipagem. ( $e_a$ refere-se a taxa de erros por alelo; $e_l$ refere-se a taxa de erros por locus) .....	54
Tabela 11. EHW calculados com o programa Genepop versão 4.0. Para cada população está descrito os valores de P (P-val) obtidos pelo programa. S.E. (erro padrão); Os valores marcados com * mostraram desvio do EHW após a correção seqüencial de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.....	55
Tabela 12. Valores de heterozigidade observada e esperada para cada loco em cada população analisada. N é o número amostral; Na: número de alelos; Ho: heterozigidade observada; He: heterozigidade esperada; * indica déficit significativo de heterozigotos. Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.....	57
Tabela 13. Lista dos alelos privados com suas respectivas freqüências em cada população amostrada.....	59
Tabela 14. Valores de diversidade gênica (DG), riquezas alélicas (RA) e Fis. * refere-se a valores significativos de Fis (déficit de heterozigotos). Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.....	60
Tabela 15. Heterozigidade observada por loco (para maiores detalhes, ver tabela 11), possíveis freqüências de alelos nulos ( $A_n$ ) e possíveis presença de erros devido a <i>stutters</i> . * indica presença de alelos nulos. † indicam déficit de heterozigotos. Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.....	62
Tabela 16. Valores de P obtidos para os testes de diferenciação gênica e genotípica entre os diferentes pares de populações de <i>S. brasiliensis</i> . * Valores significativos após a correção seqüencial de Bonferroni ( $\leq 0,05$ ). .....	63
Tabela 17. Valores de $F_{ST}$ calculados par a par entre as populações. Na diagonal abaixo estão os valores de $F_{ST}$ e diagonal acima, os valores de P (destaque). Os valores de $F_{ST}$ significantes estão marcados com asterisco. $P \leq 0,00179$ (correção seqüencial de Bonferroni).....	64
Tabela 18. Distância (diagonal abaixo) e identidade genética de Nei (diagonal acima) entre as populações.....	64



Tabela 19. Tabela com os valores de diferenciação real ( $D_{EST}$ ) estimados para os pares de populações residentes e migradoras. Os valores são estimados em um intervalo de confiança de 95%.....	65
Tabela 20. Análise AMOVA entre grupos residentes e migradoras. (g.l. significa graus de liberdade; Va é variação entre populações; Vb é variação dentro das populações).....	66
Tabela 21. Valores de probabilidade, $Pr(X/K)$ , para cada um dos possíveis modelos populacionais (K=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 populações) obtidos através do programa Structure 2.3.1. ( <i>burn-in</i> =30.000, 200.000 réplicas).....	66
Tabela 22. Valores das probabilidades [ $Pr(X/K)$ ] dos testes com os modelos populacionais K=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 para as populações excluindo-se RA-10/2007 e RL-04/2009 das análises.....	71

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	2
1.1. Os Peixes Neotropicais.....	2
1.2. A Bacia do Alto Paraná e os Peixes Migradores.....	3
1.3. Considerações sobre o gênero <i>Salminus</i> e a espécie <i>Salminus brasiliensis</i> .....	5
1.4. Ameaças à Ictiofauna.....	9
1.5. Marcadores Moleculares e Estudos Genéticos em Peixes Neotropicais.....	11
1.6. Transferabilidade de Locos Heterólogos.....	15
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	19
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
3.1. Amostras e Área de Coleta.....	22
3.2. Extração e Quantificação das Amostras.....	24
3.3. Locos Microssatélites Utilizados.....	26
3.4. Validação Populacional dos Locos Microssatélites.....	27
3.5. Estimativas de Erros de Genotipagem.....	32
3.6. Análises Estatísticas.....	33
3.6.1. Caracterização da Variabilidade Genética.....	33
3.6.2. Diferenciação Genética entre as Populações.....	35
<b>4. RESULTADOS</b> .....	41
4.1. Extração e Quantificação de DNA.....	41
4.2. Testes de PCR.....	41
4.2.1. Transferabilidade dos Locos Microssatélites de <i>Brycon</i> .....	41
4.2.2. Transferabilidade dos Locos Microssatélites de <i>S. franciscanus</i> .....	45
4.3. Genotipagem dos Locos.....	49
4.4. Análises Estatísticas.....	54
4.4.1. Caracterização da Variabilidade Genética.....	54
4.4.2. Diferenciação Genética entre as Populações.....	61
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	75
5.1. Transferabilidade de Locos Microssatélites.....	75
5.2. Caracterização da Estrutura Populacional de <i>S. brasiliensis</i> .....	80
5.3. Diferenciação Genética entre Populações.....	86

5.4. Inferências de valores de K pelo programa Structure 2.3.1. (Pritchard et al., 2000).....	93
5.5. Implicações para a Conservação.....	99
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>102</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>
<b>8. APÊNDICE.....</b>	<b>117</b>

# ***INTRODUÇÃO***

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Os Peixes Neotropicais

Estima-se que existam classificadas atualmente mais de 40 mil espécies de vertebrados, dentre as quais o grupo dos peixes é predominante. Os peixes Actinoptérigeos (*actinos*=raio, *ptero*=asa ou nadadeira) somam mais de 25 mil espécies viventes, sendo que dentro deste grupo os teleósteos correspondem a quase totalidade de peixes já descritos (aproximadamente 20 mil espécies). Estes possuem tamanhos, formas e habitats variados, ocupando ambientes dulcícolas, estuarinos e marinhos (Pough, 1999).

Dentre os peixes de água doce, ou continentais, as espécies neotropicais somam, somente na América Latina, cerca de 46% da ictiofauna continental mundial. Estes peixes ocorrem nas regiões desde a América Central até a extrema porção da América do Sul e atualmente são reconhecidas 4475 espécies distribuídas em 71 famílias, com estimativa de 1550 espécies ainda não descritas (Lima et al., 2003).

Existem cinco grupos principais de peixes neotropicais: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Perciformes e Atherinomorpha. Os Characiformes formam o grupo mais diversificado, no qual se encontra a família Characidae (Malabarba et al., 1998). Esta família possui 12 subfamílias que engloba 952 espécies reconhecidas. Deste total, mais de 600 espécies estão distribuídas em 88 gêneros diferentes que na maioria dos casos apresenta colocação ainda incerta. Grande parte dessas espécies é utilizada para alimentação humana, aquarioria e atividades de lazer como, por exemplo, a pesca esportiva (Lima et al., 2003).

## **1.2. A Bacia do Alto Paraná e os Peixes Migradores**

O rio Paraná é formado pela junção dos rios Grande e Paranaíba e corre em direção ao rio da Prata na Argentina. A bacia do Alto Paraná (figura 1) corresponde a aproximadamente um terço do rio Paraná e cobre uma área correspondente a 10,5% do território brasileiro. Esta porção do rio está localizada na área mais populosa do estado de São Paulo, sendo suas águas utilizadas para consumo humano, agricultura, agropecuária e também para geração de energia através da construção de barragens. Todas estas atividades humanas estão acarretando impactos diretos na fauna e flora locais em decorrência da modificação dos habitats. Especificamente em relação às barragens, estas estão presentes ao longo de toda a bacia tornando-a quase toda represada, sendo que a maioria dos reservatórios foi construída após a década de 60 (Agostinho et al., 2003).

Estima-se que ocorra nesta bacia aproximadamente 220 espécies de peixes e que 39% delas seja migradora, se dirigindo às cabeceiras dos rios durante a época reprodutiva para realizar a desova. As duas principais ordens de peixes migradores presentes na bacia do Alto Paraná são os Characiformes e Siluriformes e incluem espécies como a piapara, pacu, mandi, pintado, dourado, entre outras (Agostinho et al., 2003).

Nesta bacia está localizado o rio Mogi-Guaçu, que nasce no estado de Minas Gerais e apresenta uma extensão aproximada de 470 km no total. O rio Mogi-Guaçu corta 38 municípios e atende cerca de 4% da população paulista (1,5 milhão de habitantes). Ele faz parte do sistema Mogi-Pardo-Grande, componentes da bacia do Alto Paraná (CETESB, 2008). Estão presentes nesse

rio mais de 100 espécies de peixes, incluindo espécies migradoras, como o dourado e o curimatá (Godoy, 1975). Segundo o Relatório Anual da CETESB (Companhia Ambiental do Estado de São Paulo) de 2008, o despejo de esgotos domésticos sem tratamento e uso de agrotóxicos são as principais causas de poluição no rio, afetando diretamente à qualidade da água e a fauna local.



Figura 1. Mapa da bacia do Alto Paraná. Os pontos indicam as barragens presentes em toda a bacia. Mapa retirado de Agostinho et al. (2003).

### 1.3. Considerações sobre o Gênero *Salminus* e a Espécie *Salminus brasiliensis*

O gênero *Salminus* inclui atualmente quatro espécies válidas, sendo elas: *Salminus affinis*, *Salminus brasiliensis*, *Salminus hilarii* e *Salminus franciscanus* (Lima et al., 2003; Lima e Britski, 2007) e uma ainda a ser descrita, *Salminus iquitensis* (Lima, comunicação pessoal).

A espécie *S. affinis* é encontrada na Colômbia e no Equador. *Salminus hilarii* ocorre nas bacias do Alto Paraná, do São Francisco e do Paraguai. *Salminus franciscanus* foi recentemente descrita como sendo endêmico da bacia do rio São Francisco e *S. iquitensis* ocorre nas bacias do rio Tocantins, no sistema do Alto Amazonas, na bacia do rio Madeira e bacia do rio Orinoco, no rio Branco (Roraima), tendo tido relatos de sua ocorrência também na Bolívia, Peru e Venezuela (figura 2) (Lima et al., 2003; Sato e Godinho, 2003; Lima e Britski, 2007).

A espécie *S. brasiliensis* (Cuvier 1816) (figura 3) já foi referida na taxonomia como *Salminus maxillosus*, *Salminus cuvieri* e *Salminus orbignyana* e também dentro de outros gêneros, tendo sido citada como *Hydrocynus brasiliensis*, *Hydrocyon brevidens* e *Salmo auratus*. Esta espécie distribui-se por uma grande extensão na América do Sul, ocorrendo nas bacias do rio Paraná, Paraguai e Uruguai, além da drenagem da Laguna dos Patos e bacias dos rios Mamoré e Chaparé, na Bolívia. No Brasil ela é comumente conhecida como dourado e nos demais países latinos como dorado, dorada e pirayú (Lima et al., 2003; Lima, 2006).





Figura 2. Distribuição do gênero *Salminus* na América do Sul. Retirado de Lima, 2006.

*Salminus brasiliensis*, em especial, é bastante apreciada na culinária, pesca artesanal e esportiva, apresentando grande destaque econômico e de lazer (Godoy, 1975; Barbieri et al., 2004; Suplicy, 2007). Devido a sua importância diversos estudos de cunho ecológico ou fisiológico vêm sendo realizados nesta espécie, sendo os estudos genéticos mais escassos.



Figura 3. Aspecto morfológico de um indivíduo da espécie *S. brasiliensis*.  
Fonte: FISHBASE

(<http://www.fishbase.org/>).

Esta espécie difere de seus congêneres por apresentar um maior número de escamas na linha lateral e maior tamanho dos dentes quando comparada à *S. franciscanus*. Sua coloração dourada também a faz diferir das espécies *S. affinis*, *S. hilarii* e *S. iquitensis*, que em geral apresentam coloração prateada (Lima, 2006).

Estes peixes possuem tamanho médio a grande, podendo atingir até um metro de comprimento e pesar mais de 30kg. Seu desenvolvimento é considerado lento e podem alcançar até 25 anos de vida (Godoy, 1975). Eles habitam grandes rios e possuem comportamento predatório quando adultos, se alimentando principalmente de outros peixes. Em estágios iniciais, seus hábitos alimentares estão ligados ao consumo de plâncton (Godoy, 1975; Ribeiro e Nuñez, 2008).

Segundo Godoy (1975), estes peixes são reofílicos e apresentam hábitos residentes relacionados com as atividades de alimentação. No rio Mogi-Guaçu, por exemplo, estudos realizados na década de 70 mostraram a existência de locais preferenciais denominados de “lar de reprodução” e “lar de alimentação”.

A reprodução ocorre entre os meses de novembro e fevereiro, período conhecido como piracema, quando os peixes realizam a migração para desovarem preferencialmente em águas mais agitadas. Seus ovos são pequenos e numerosos e a desova é total, com maior atividade no mês de dezembro (Ihering, 1968; Godoy, 1975; Barbieri et al., 2000; Lima et al., 2003).

Tais migrações parecem estar relacionadas, predominantemente, com o nível do rio Mogi-Guaçu, não ocorrendo quando o nível do rio está diminuindo ou estável. Entretanto, em *S. brasiliensis* e outras espécies como *Prochilodus lineatus*, o gatilho da reprodução parece ser influenciado também por outros

fatores abióticos como, por exemplo, a temperatura da água e o fotoperíodo durante o ciclo de cheias (Barbieri et al., 2000).

A migração durante a reprodução em direção às cabeceiras dos rios é fundamental no sucesso reprodutivo destes peixes, pois possibilita a busca por locais mais adequados para a fertilização dos ovos, desenvolvimento e também uma menor taxa de predação, principalmente nas lagoas marginais (Agostinho et al. 2007). Estudos de marcação e recaptura indicam que estoques de curimba (*Prochilodus sp.*) e dourado (*Salminus sp.*) seriam compostos por “ecótipos” distintos, ou seja, alguns precisariam migrar mais para reprodução, enquanto que outros grupos poderiam reproduzir em áreas mais restritas e ali permaneceriam por longos períodos, sugerindo a possível presença de populações residentes ao longo do rio Mogi-Guaçu (Bonetto e Castello, 1985, apud Agostinho et al., 2007).

Em um estudo realizado com populações de *S. brasiliensis* do rio Uruguai, cerca de 40% dos peixes marcados por telemetria permaneceu à jusante da barragem de Itá por períodos prolongados, indicando assim a presença de populações residentes nesta região (Hahn, 2007). Para peixes de regiões temperadas esta distinção entre populações residentes e migradoras já se encontra bem relatada e vários estudos demonstram a existência de populações simpátricas, residentes e migradoras anadrômicas, ao longo das bacias (Klemetsen et al. 2002; Narum et al., 2004; Westgaard et al., 2004; Karve et al., 2008).

#### **1.4. Ameaças à Ictiofauna**

Em geral, a exploração de estoques naturais de peixes tem sido maior que sua capacidade de suporte e em alguns locais, espécies como o dourado, por exemplo, já se encontram sobre-exploradas. Em consequência desta exploração, no estado do Rio Grande do Sul, por exemplo, *S. brasiliensis* é apontada como vulnerável à extinção. Além desta, outras cinco espécies da família Characidae (*Brycon orbignyianus*, conhecida como piracanjuba e apontada como criticamente em perigo; *Bryconamericus lambari* e *Odontostoechus lethostigmus*, conhecidas como lambaris; *Hollandichthys multifasciatus*, conhecida como lambari-listrado e *Mimagoniates rheocharis*, conhecida lambari-azul), também se encontram sob ameaça (Marques et al., 2002). Na bacia do rio São Francisco há registro de declínio de toda a produção pesqueira, inclusive do dourado, durante as décadas de 70, 80 e 90 (Sato e Godinho, 2003).

Feitosa et al. (2004) em comparação com outros estudos prévios, indicam que para *S. brasiliensis* o tamanho e idade da maturação dos peixes capturados na bacia do Alto Paraná diminuíram ao longo das décadas de 60 e 80, com diferenças de até 15 cm de comprimento e cerca de dois anos o tempo de maturação sexual, indicando uma possível sobre-pesca desses animais. Barbieri et al. (2004) também relataram que em Cachoeira de Emas (Pirassununga, SP) os tamanhos corpóreos e a idade da primeira maturação também diminuíram ao longo de 60 anos, sendo este acontecimento um possível reflexo de fatores relacionados principalmente à atividade antrópica exercida no local.

Na década de 70, Godoy (1975) já havia relatado o impacto das atividades antrópicas sobre populações de peixes na região do rio Mogi-Guaçu. O

desmatamento na bacia superior do rio Paraná, a erosão de solos e o uso de fungicidas e inseticidas estavam causando um declínio populacional em diferentes espécies de peixes, como por exemplo, a piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), cuja carne é bastante apreciada na gastronomia.

No Brasil, as causas mais comuns de perda de biodiversidade em ambientes aquáticos estão ligadas à eutrofização do meio, ao assoreamento e aos altos níveis de poluição, além de fatores como introdução de espécies alóctones e atividade de pesca predatória (Agostinho et al., 2003). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA), 37 espécies de peixes Characiformes, sendo que 32 destas pertencentes à família Characidae, estão sob ameaça de extinção (MMA, 2004).

A destruição ou interferência dos habitats das populações de peixes, além da super-exploração pesqueira, podem propiciar a quebra de relações ecológicas importantes, conduzindo em alguns casos à extinção de populações locais (Vrijenhoek, 1998; Agostinho et al., 2003).

No caso específico da construção de reservatórios e hidrelétricas, estes criam barreiras para a migração de peixes, ocasionando modificações na estrutura dessas populações decorrentes do número reduzido de indivíduos e alteração nos padrões de fluxo gênico, podendo contribuir efetivamente para o surgimento de isolados populacionais com constituição gênica divergente e baixos níveis de diversidade genética (Moran, 2002; Vrijenhoek, 1998).

A barragem de Três Marias-MG, por exemplo, possui uma altura de 75 m e nenhum sistema de passagem de peixes, tornando-se assim, uma barreira física intransponível (Sato e Godinho, 2003). Além disso, injúrias em peixes são acarretadas quando estes passam através do sistema de geração de energia

(turbinas e vertedouro), que podem levar a morte dos animais (Agostinho et al., 2007).

Dados da década de 80 já apontavam com grande preocupação para os possíveis impactos que a construção de barragens poderia ocasionar sobre a ictiofauna local na Argentina. Nesta época, estudos de indução artificial de ovulação em *S. brasiliensis* foram conduzidos objetivando viabilizar sua criação em cativeiro, entretanto, estes não obtiveram sucesso (Amutio et al. 1986).

Outros problemas como hábito canibal e as altas taxas de conversão alimentar, além da baixa taxa de fertilização, podem inviabilizar o seu cultivo. A maior predominância de machos em relação a fêmeas (as quais possuem maior porte e peso) e o tamanho dos viveiros (que deve ser grande para atender o hábito natatório desses animais) também fazem com que iniciativas para estabelecer sua criação em cativeiro sejam dificultadas, mesmo em face de sua grande importância econômica e de lazer (Fracalossi et al., 2004; Mai e Zaniboni-Filho, 2005; Vega-Orellana et al., 2006; Suplicy, 2007; Baldisserotto, 2009).

### **1.5. Marcadores Moleculares e Estudos Genéticos em Peixes Neotropicais**

Diversos estudos genético-populacionais têm sido conduzidos na tentativa de identificar estruturação populacional em peixes neotropicais. Entretanto, estes estudos ainda são relativamente escassos. Em uma revisão recente, Oliveira et al. (2009) verificou que estudos citogenéticos e populacionais foram realizados em apenas 1040 espécies de peixes de água doce e 109 espécies de peixes marinhos. Destes, os estudos populacionais são minoria, sendo que apenas duas ordens têm sido mais estudadas, Characiformes e Siluriformes.

Apesar disso, é sabido que análises moleculares apresentam especial relevância para abordagem conservacionista, uma vez que permitem avaliar a estrutura e dinâmica de uma população. A utilização de diversas classes de marcadores moleculares, como RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), DNA mitocondrial, minissatélites ou VNTR (*Variable Number of Tandem Repeats*) e microssatélites ou SSR (*Simple Sequence Repeats*), baseadas em PCR (*Polymerase Chain Reaction*), está possibilitando a caracterização da estrutura genética de diversas populações, incluindo a identificação de indivíduos migrantes e análises de diversidade genética intra- e inter- populacional (Haig, 1998; Wasko e Galetti, 2003; Matoso et al., 2004; Hatanaka et al., 2006; Oliveira et al., 2009).

A técnica de RAPD baseia-se na utilização de apenas um *primer* com uma seqüência arbitrária em reações de PCR e, portanto, com seqüência alvo desconhecida. *Primers* únicos de seqüências cernes universais de VNTRs também podem ser utilizados para amplificar regiões arbitrárias do genoma de diversas espécies, incluindo peixes (Wasko e Galetti, 2002) e camarões (Freitas e Galetti, 2002). Existem ainda outros métodos moleculares, como RFLP (*Restriction Fragment Polymorphism*) e AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), que podem ser utilizados para inferir sobre a estrutura genética das populações. A técnica de RFLP baseia-se no uso de enzimas de restrição e hibridação destes fragmentos com seqüências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos luminescentes para detectar polimorfismos nos sítios de restrição (Imsland et al., 2004; Okimoto et al., 2008). A AFLP utiliza um misto de digestão de enzimas de restrição e posterior PCR, com análise dos

fragmentos em géis de alta resolução (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Mickett et al., 2003; Maldinia et al., 2006; Liu et al., 2006).

Independente do método empregado, análises moleculares realizadas estão permitindo investigar a estrutura genética de diversas espécies de peixes em diferentes bacias hidrográficas do Brasil. No caso específico dos peixes migradores, estes estudos têm apontado para a presença de populações panmíticas (Revaldaves et al., 1997; Carvalho-Costa, 2008; Calcagnotto e DeSalle, 2009, Iervolino et al., 2010) e também de metapopulações, ou seja, populações geneticamente diferenciadas que mantêm fluxo gênico entre si (Hatanaka et al., 2006, Morelli et al., 2007b). A caracterização de populações geneticamente diferenciadas pode ser eficiente para determinar as unidades que deverão ser prioritariamente estabelecidas para conservação do potencial evolutivo de uma espécie (Laikre et al., 2005; Frankham et al., 2008).

Para Laikre et al. (2005) existem três tipos de estruturação populacional em peixes: (1) populações distintas (com baixo fluxo gênico e manutenção de isolados populacionais), (2) populações contínuas (com fluxo gênico moderado e padrão de isolamento por distância) e (3) sem diferenciação (homogeneidade genética entre todas as áreas de distribuição geográfica estudadas). Deste modo, para o estabelecimento de estratégias de manejo deve-se considerar cada um destes casos, pois o manejo incorreto pode levar à perda de alelos raros e conseqüentemente à diminuição na variação genética da espécie, uma vez que cada população contribui com uma parcela da variação total (Laikre et al., 2005).

Em *Brycon lundii*, a existência de estruturação em populações foi evidenciada através de análises de RAPD e VNTR, na qual ficou demonstrado que diferentes populações coexistem e migram ao longo do canal do rio São



Francisco (Wasko e Galetti, 2002; Wasko e Galetti, 2003). Matoso et al. (2004), também usando a técnica RAPD, demonstraram a presença de estruturação genética em três populações de *Astyanax sp.* No gênero *Brycon*, Sanches e Galetti (2007) utilizando marcadores RAPD identificaram a presença de estruturação populacional em quatro diferentes populações de *B. hilarii* da sub-bacia do rio Miranda (Bacia do rio Paraguai), durante a piracema e outras épocas do ano. Eles apontaram que a estruturação genética entre as diferentes populações foi maior durante a época não reprodutiva do que durante a época reprodutiva.

Outra classe de marcadores importantes que vem sendo utilizada nestes estudos é a dos microssatélites ou SSR ou ainda STR (*Short Tandem Repeats*). Estes têm sido considerados a classe de marcadores moleculares mais polimórficos e com o maior conteúdo de informações. Eles consistem em pequenos trechos de DNA (seqüência *motif*) com 1 a 6 nucleotídeos, repetidos em *tandem* (lado a lado). Em genomas de eucariotos estas seqüências são freqüentes e distribuídas ao acaso, formando locos extremamente polimórficos (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Ellegren, 2004).

Os microssatélites possuem caráter co-dominante e são encontrados em praticamente todos os organismos (Chambers e MacAvoy, 2000). Podem estar em regiões não expressas e expressas, incluindo éxons e íntrons. Em regiões gênicas, eles podem inativar ou ativar genes, afetando a expressão gênica, o processamento de mRNA e/ou sua exportação para o citoplasma (Li et al., 2004).

Estes marcadores vêm sendo amplamente utilizados em estudos de estrutura genética de populações naturais (Sanches e Galetti, 2007; Hatanaka et al., 2006), além de relações de parentesco (Jerry et al., 2004) e desenvolvimento

de mapas de ligação (Zhang et al., 2007) em espécies economicamente importantes. Acredita-se que a variação nos locos microssatélites seja gerada por erros durante a recombinação e duplicação, como *crossing-over* desigual ou deslizamento da DNA polimerase durante a replicação do DNA, processo conhecido como *slippage* (Oliveira et al., 2006).

Em *Prochilodus argenteus*, estudos utilizando marcadores microssatélites demonstraram que há significativa diferenciação genética entre três populações coletadas na barragem da hidrelétrica de Três Marias-MG, no rio São Francisco, e que estratégias de manejo diferenciadas devem ser adotadas para preservar a integridade genética destas populações (Hatanaka e Galetti, 2003; Hatanaka et al., 2006). Carvalho-Costa et al. (2008), no entanto, também utilizando microssatélites, não encontraram diferenças significativas entre três populações de *Prochilodus costatus* na mesma região de Três Marias.

Na espécie *S. brasiliensis* pouco estudos genético-populacionais têm sido conduzidos e os existentes são baseados em marcadores moleculares como RAPD (Lopes et al., 2007; Ramella et al., 2006) e DNAm (Machado et al., 2005; Freitas, 2010), inexistindo até o momento, estudos com marcadores microssatélites.

### 1.6. Transferabilidade de Locos Heterólogos

Apesar de extremamente eficientes para estudos de genética populacional, o uso de marcadores moleculares microssatélites depende de uma etapa prévia que consiste na caracterização e descrição destes locos no genoma da espécie que se deseja estudar. Porém, muitas espécies ainda não possuem *primers*

espécie-específicos para estes locos, e deste modo, muitos estudos vêm utilizando *primers* heterólogos (de outra espécie) em análises genético-populacionais. Nestes casos, locos heterólogos são avaliados em termos de transferabilidade, ou seja, se estes microssatélites estão ou não presentes no genoma do organismo que está agora sendo analisado. A taxa de transferabilidade de um loco microssatélite pode ser extremamente alta se este estiver presente em uma região conservada do genoma, como por exemplo, uma região codificante. Entretanto, regiões arbitrárias também demonstram eficiência de transferabilidade, principalmente, quando realizada em espécies ou gêneros relacionados (Oliveira et al., 2006).

A transferabilidade de locos microssatélites tem sido testada em vários grupos, incluindo animais, vegetais e fungos (Barbará et al., 2007). Estudos realizados em crocodilianos por Zucoloto et al. (2006), demonstraram que a transferabilidade de locos microssatélites também é possível para espécies pertencentes a gêneros distintos. Os autores utilizaram *primers* específicos para o genoma de *Aligator mississippiensis* e *Caiman latirostris* nas espécies *Paleosuchus palpebrosus*, *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*, obtendo sucesso para grande parte dos locos testados.

Entre membros da família Characidae, estudos de transferabilidade de locos microssatélites também demonstraram grande potencial. Sanches e Galetti (2006), utilizando *primers* específicos de *B. hilarii*, realizaram ensaios de transferabilidade em cinco espécies do gênero *Brycon*, sendo que duas delas, *B. orbignyanus* e *B. insignis*, encontram-se na lista de animais ameaçados de extinção no território brasileiro (MMA, 2004). Matsumoto e Hilsdorf (2009) também utilizaram com grande sucesso locos de *B. opalinus* e *B. cephalus* na

espécie *B. insignis*. Em outros caracídeos, como por exemplo, *Leporinus macrocephalus* e outras espécies relacionadas, estes níveis de transferabilidade também se mantêm altos, demonstrando a eficiência de utilização de locos heterólogos (Morelli et al., 2007a).

Em *S. brasiliensis* não há relato na literatura de estudos prévios de transferabilidade e/ou prospecção de locos microssatélites no genoma desta espécie, tornando esta abordagem essencial para a realização de estudos genético-populacionais neste importante peixe migrador.

# ***OBJETIVOS***

## **2. OBJETIVOS**

Devido à grande importância do dourado e à intensa interferência humana que esta espécie vem sofrendo ao longo dos anos, principalmente, devido à pesca e modificação de seus habitats, o estudo da estrutura genética de suas populações se faz necessário, uma vez que este pode apontar para existência ou não de populações geneticamente diferenciadas, as quais necessitarão de estratégias de manejo específicas que visem estabelecer medidas para conservar a integridade genética das populações e o potencial evolutivo desta espécie e conseqüentemente sua manutenção.

Apesar disso, poucos estudos têm empenhado esforços para caracterizar a estrutura genética das diferentes populações de dourado, provavelmente em decorrência da ausência de marcadores moleculares eficientes para análise da diversidade e estrutura genética desta espécie. Assim, a caracterização de um conjunto de locos microssatélites polimórficos para o gênero *Salminus* e, em especial, para a espécie *S. brasiliensis*, é essencial para possibilitar os estudos genéticos neste grupo animal.

Dentro deste contexto, um amplo estudo para prospecção de locos microssatélites e caracterização da estrutura genética de diferentes espécies e populações pertencentes ao gênero *Salminus* foi iniciado no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética da Universidade Federal de São Carlos (Departamento de Genética e Evolução, UFSCar, São Carlos, SP). Além do estabelecimento de locos espécie-específicos, a utilização de marcadores heterólogos também é uma estratégia eficiente para disponibilizar

locos microssatélites úteis para estudos genéticos em espécies que não possuem locos descritos para o seu genoma.

Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos:

2.1. Validar locos microssatélites na espécie *Salminus brasiliensis*, através da utilização de locos heterólogos descritos para outras espécies de caracídeos, taxonomicamente relacionadas ao grupo *Salminus* e da espécie *Salminus franciscanus*, fornecendo marcadores úteis para os estudos genéticos neste grupo de peixe;

2.2. Caracterizar a estrutura genética de populações de *Salminus brasiliensis* da região de Cachoeira de Emas, localizada no município de Pirassununga, SP (rio Mogi-Guaçu, bacia do Alto Paraná), considerada um local de intensa interferência antrópica, visando subsidiar estudos que considerem a conservação da biodiversidade desta importante espécie de peixe migrador.

# ***MATERIAL E MÉTODOS***



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Amostras e Área de Coleta**

Durante os anos de 2007, 2008 e 2009 foram coletados exemplares de *S. brasiliensis* pertencentes aos períodos que compreendem as fases de alimentação (março a outubro) e reprodução (novembro a fevereiro) desses animais. Todas as populações coletadas na fase de alimentação foram consideradas residentes e na fase de reprodução, migradoras. Os animais foram coletados no rio Mogi-Guaçu (bacia do Alto Paraná) na região da barragem de Cachoeira de Emas, localizada no município de Pirassununga-SP, por pesquisadores do CEPTA/ICMBio (Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Peixes Continentais/Instituto Chico Mendes), que gentilmente cederam as amostras de tecidos dos animais.

Foram coletadas amostras de nadadeira caudal pertencentes a cada uma das populações amostradas. As amostras de tecido foram conservadas em etanol 100% e acondicionadas a -20°C. As coletas científicas foram realizadas com o auxílio de tarrafas e os peixes foram devolvidos ao rio após a retirada de pedaços da nadadeira caudal e de escamas e a tomada de medidas corpóreas (dados em poder do CEPTA/ICMBio). Além disso, exemplares provenientes de pescadores da região também foram obtidos. Neste caso, os peixes foram capturados utilizando-se linha e anzol para fins comerciais. Entretanto, amostras de tecido desses animais também foram cedidas para o CEPTA para fins de pesquisa.

A coleta foi realizada em dois pontos (montante e jusante da barragem) durante as fases de reprodução e alimentação desses peixes. As populações

coletadas durante o período reprodutivo foram capturadas na região conhecida como “Topava” (região rochosa e de águas turbulentas), designada aqui pela letra ‘T’. Já as populações residentes foram obtidas, além da Topava, nas regiões conhecidas como “Liso” e acima da barragem, designadas respectivamente, pelas letras ‘L’ e ‘A’(figura 4).



Figura 4. Foto ilustrativa dos pontos de coleta realizados na região de Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP. Gentileza das coordenadas geográficas de Rita de Cássia G. de Alcântara Rocha, Bióloga/Analista Ambiental, CEPTA/ICMBio.

Cada amostragem recebeu um código de identificação, referenciando o local de coleta (T, L ou A), o período no qual se encontrava: migratório (M) ou residente (R), mês (de 1= janeiro até 12= dezembro) e o ano (2007, 2008 ou 2009) em que foi realizada a coleta. A tabela 1 aponta as respectivas amostragens.

Tabela 1. Amostragem de *S. brasiliensis* realizadas nos anos de 2007, 2008 e 2009 na região de Cachoeira de Emas, Pirassununga - SP.

ID população	Região de coleta	População	Mês	Data de coleta	Ano	Número de amostras
RA-10/2007	Acima da barragem	Residente	Outubro	01 a 07	2007	36
RL-04/2009	“Liso”	Residente	Abril	10 a 25	2009	23
RT-07/2008	“Topava”	Residente	Julho e Agosto	30/Julho e 21/Agosto	2008	29
RT-10/2009	“Topava”	Residente	Outubro	27	2009	41
MT-12/2008	“Topava”	Migradora	Dezembro	15	2008	17
MT-01/2009	“Topava”	Migradora	Janeiro	08	2009	18
MT-11/2009	“Topava”	Migradora	Novembro	26	2009	19
MT-12/2009	“Topava”	Migradora	Dezembro	15	2009	18

Para RA-10/2007, as amostras foram coletadas no período de 01 a 07 de Outubro de 2007 e para RL-04/2009 no período de 10 a 25 de Abril de 2009, em diversos pontos acima e abaixo da barragem, respectivamente. RT-07/2008 foi coletada em duas datas de amostragem, uma em 30 de Julho e outra em 21 de Agosto de 2008, ambas com auxílio de tarrafa. Para o restante das amostragens, estas foram realizadas num único ponto e em único dia, todas com o auxílio de tarrafa.

### 3.2. Extração e Quantificação das Amostras

A extração de DNA foi realizada através de pequenas adaptações no protocolo descrito por Sambrook et al. (1989). Aproximadamente 1cm<sup>2</sup> de tecido foi colocado em um tubo de 1,5ml e com a ajuda de uma tesoura foi dissociado, resultando em pequenos pedaços homogêneos. Em seguida foram adicionados 600µl de solução de digestão (NaCl 0.4M, EDTA 0.1M pH 8.0,

Proteinase K 100mg/ml, SDS 1%), sendo as amostras incubadas a 37°C por um período de aproximadamente 16 horas. Após esse período foi adicionado igual volume da solução fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma-Aldrich) e os tubos foram levemente balançados por 15 minutos para homogeneização do material. Posteriormente, seguiu-se uma etapa de centrifugação a 13000rpm por 10 minutos para separação de fases. O sobrenadante foi transferido para outro tubo, sendo descartado o restante do material. Foram adicionados 600µl de clorofórmio e os tubos foram novamente invertidos para mistura da solução. Uma nova centrifugação de 10 minutos a 13000rpm foi realizada e novamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo, agora de 2ml. Uma solução de NaCl 5M foi adicionada até o volume final de 1M e posteriormente adicionou-se duas vezes o volume total de sobrenadante recuperado de etanol 100% gelado. Os tubos foram centrifugados a 10000rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado, tomando-se cuidado para que o *pellet* formado ao fundo do tubo não fosse descartado. Uma lavagem com 300µl de etanol 100%, seguida por uma centrifugação a 10000rpm por 3 minutos foi realizada, repetindo-se outra lavagem com 300µl de etanol 70% e centrifugação a 10000rpm por 3 minutos. A secagem do material foi realizada em estufa a 37°C por aproximadamente uma hora e após isso foram adicionados 50µl de água milliQ autoclavada, para solubilização do DNA. O tubo permaneceu em temperatura ambiente por 24 horas e as amostras foram tratadas com RNase (10mg/ml) a 37°C por uma hora.

Após esse período foi realizada a quantificação do material. O DNA foi quantificado visualmente em gel de agarose 0,8% imerso em tampão TBE 1x

(Tris-Base, Ácido Bórico, EDTA), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), sob uma condição de corrida de 1 hora a 100 volts. O marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) foi utilizado como parâmetro de quantificação. Este marcador evidencia bandas de 10, 20, 40, 80, 120 e 200ng. Após a quantificação, alíquotas de 50ng foram confeccionadas e estocadas a -20° C para posteriores testes de PCR.

### 3.3. Locos Microssatélites Utilizados

Os locos microssatélites utilizados no presente trabalho foram os descritos para espécie *S. franciscanus* (Rossini et al., 2010), para a espécie *B. hildarii* (Sanches e Galetti, 2006) e também para a espécie *B. opalinus* (Barroso et al., 2003). Todos os *primers* do presente trabalho foram sintetizados com a adição de uma cauda de 18pb, conhecida como sequência universal M13 (5´ TGT AAA ACG ACG GCC AGT), na extremidade 5´ de um dos *primers* (*forward* ou *reverse*) e testados em PCR. Esta adição foi proposta por Schuelke (2000) com o objetivo de baratear os custos de genotipagem em seqüenciador automático. Desse modo, são utilizados na mesma reação três *primers*, dois específicos ao seu trabalho, com um deles contendo a adição da cauda M13, e um terceiro contendo o *primer* universal M13 com um fluoróforo (FAM, TET, NED ou HEX), o responsável pela leitura do fragmento amplificado no seqüenciador automático. A figura 5 exemplifica a técnica utilizada.

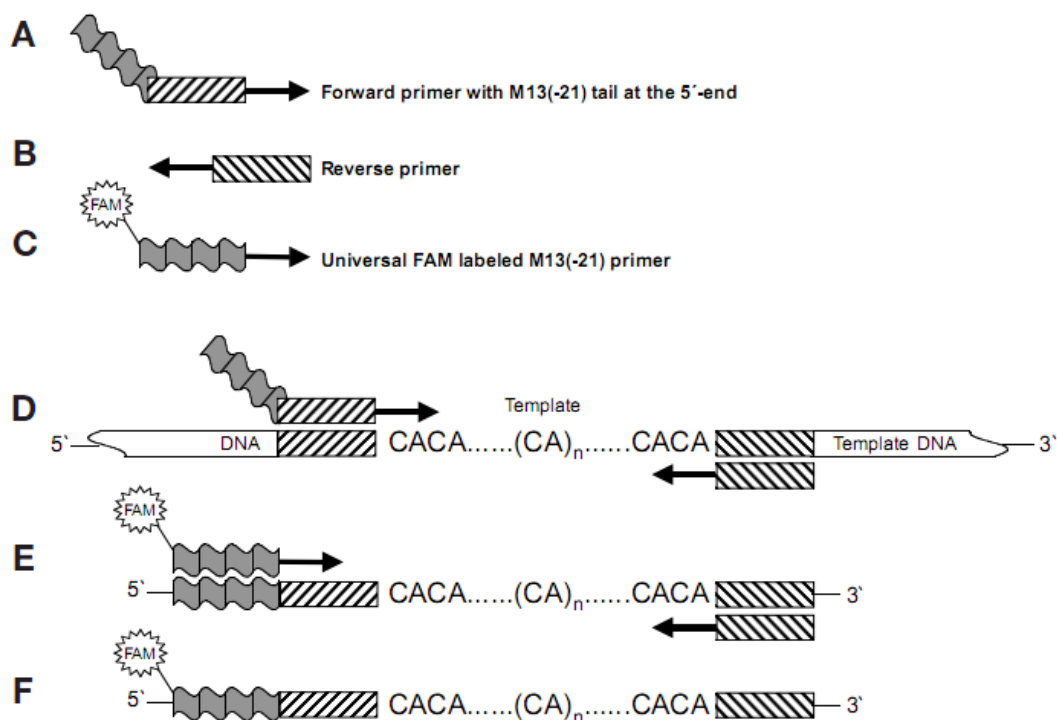


Figura 5. Esquema exemplificando a técnica proposta por Schuelke (2000). A figura (A, B e C) mostra o mix de *primers* (*forward*, *reverse* e M13) utilizados. Em D segue-se os ciclos de amplificação dos *primers* (geralmente 30 ciclos); em E segue o ciclo de amplificação dos fragmentos com a adição da cauda M13; em F é demonstrado o fragmento final formado marcado com fluoróforo. Retirado de Schuelke (2000).

### 3.4. Validação Populacional dos Locos Microssatélites

Todos os locos testados seguiram um protocolo de amplificação, no qual primeiramente foram realizados os testes de transferabilidade (para verificar se houve ou não amplificação) e, posteriormente, os testes de validação populacional e avaliação do possível polimorfismo (ampliação no número amostral utilizado), sendo finalmente realizada a genotipagem dos locos em seqüenciador automático para dez indivíduos. Confirmado o polimorfismo, somente os locos que demonstraram excelente padrão de amplificação (bandas fortes e bem definidas quando visualizadas em gel de agarose 2%)

foram genotipados em um maior número amostral (20 a 40 indivíduos) de *S. brasiliensis*.

Os *primers* descritos para *B. hilarii* (tabela 2) e *B. opalinus* (tabela 3) foram testados para verificar a transferabilidade dos locos em testes de PCR, seguindo-se, inicialmente, os protocolos sugeridos pelos respectivos autores. Os *primers* desenvolvidos para a espécie *S. franciscanus* concomitantemente ao desenvolvimento do presente trabalho também foram testados nas populações de *S. brasiliensis* aqui analisadas (tabela 4).

O melhor padrão de reação foi obtido através de testes de PCR variando-se as concentrações dos reagentes e os ciclos das reações. Foram utilizados 1,25mM de dNTPs, 1x *Taq Buffer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1U da enzima Platinum® *Taq DNA Polymerase* Invitrogen e 8 pmoles de cada *primer* em um volume final de 10µl de reação. Foram realizados também testes de PCR com o MasterMix GoTaq DNA Colorless (Promega) em um volume de reação de 10µl, variando-se as quantidades de DNA (25, 50, 100ng) e de *primers* (2, 5, 8, 10 ou 15 pmoles).

Tabela 2. Lista dos locos caracterizados para a espécie *Brycon hilarii*, com número de alelos (N<sub>A</sub>) e heterozigidade esperada (H<sub>e</sub>) e observada (H<sub>E</sub>) baseadas em uma amostra de 30 indivíduos. Retirado de Sanches e Galetti (2006).

Lócus	Motif	N <sub>a</sub>	Tamanho (pb)	Ho/He
Bh5	(AC) <sub>13</sub>	7	204-220	0,76/0,81
Bh6	(GT) <sub>14</sub>	6	160-184	0,57/0,67
Bh8	(GAT) <sub>5</sub>	8	127-196	0,77/0,76
Bh13	(AT) <sub>7</sub>	5	120-160	0,83/0,78
Bh15	(ATTT) <sub>5</sub>	3	130-142	0,53/0,53
Bh17	(GTTT) <sub>4</sub> (GGTTT) <sub>3</sub>	7	152-212	0,83/0,81

Tabela 3. Lista dos locos caracterizados para a espécie *Brycon opalinus*, com número de alelos ( $N_A$ ), tamanho amostral ( $n$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ). Retirado de Barroso et al. (2003).

Lócus	Motif	N	$N_a$	Tamanho (pb)	$H_e$	$H_o$
BoM1	(CA) <sub>16</sub>	150	18	139-173	0,909	0,573
BoM2	(CA) <sub>45</sub>	94	31	162-242	0,926	0,463
BoM5	(AC) <sub>4</sub> T(AC) <sub>10</sub> AT(AC) <sub>5</sub>	143	16	117-151	0,904	0,713
BoM6	(CA) <sub>5</sub> TA(CA) <sub>10</sub> T(CA) <sub>4</sub>	130	19	142-178	0,895	0,631
BoM7	(CA) <sub>31</sub>	145	25	172-236	0,936	0,701
BoM12	(GT) <sub>15</sub>	137	18	78-118	0,842	0,485
BoM13	(CT) <sub>11</sub>	153	12	154-176	0,717	0,503

Tabela 4. Dados dos locos isolados e caracterizados de *S. franciscanus*. Estão apresentados os *motifs* microssatélites, os tamanhos dos alelos, números de alelos ( $N_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ). Dados retirados de (Rossini et al., 2010).

Locus	Motif	Tamanho (pb)	$N_a$	$H_o$	$H_e$
SFRA02	(GT) <sub>18</sub>	256-296	16	0,97	0,91
SFRA03	(CA) <sub>14</sub>	180-210	9	0,79	0,78
SFRA04	(AC) <sub>6</sub> tctcgctcaca(CACG) <sub>4</sub>	166-176	5	0,25	0,31
SFRA05	(TCTG) <sub>6</sub> (TC) <sub>2</sub>	272-306	10	0,65	0,83
SFRA10	(CTGT) <sub>3</sub> ccgccc(GTCT) <sub>3</sub>	268-324	5	0,53	0,54
SFRA11	(AGAC) <sub>10</sub>	206-226	5	0,19	0,33
SFRA13	(TC) <sub>17</sub>	242-310	21	0,76	0,88
SFRA14	(CT) <sub>13</sub> (CA) <sub>8</sub>	230-290	22	0,71	0,95
SFRA15	(GT) <sub>31</sub> (GA) <sub>10</sub>	226-292	16	0,70	0,91
SFRA18	(GACA) <sub>6</sub> gaa(AGAC) <sub>4</sub>	164-192	6	0,50	0,65
SFRA01	(ACAG) <sub>38</sub>	132	1	-	-
SFRA06	(AAAC) <sub>4</sub>	366	1	-	-
SFRA08	(CAC) <sub>4</sub>	240	1	-	-
SFRA09	(AGAC) <sub>5</sub>	242	1	-	-
SFRA12	(AATG) <sub>7</sub>	284	1	-	-
SFRA07	(GAGT) <sub>4</sub>	-	-	-	-



As temperaturas de anelamento (TA) ideais para cada par de *primers* testado foram determinadas através de testes de gradiente de temperatura realizados em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf) para os locos de *Brycon* e termociclador Veriti 96 well (Applied Biosystems) para os locos de *S. franciscanus* (tabela 5), programados da seguinte forma:

**Ciclo clássico:**

*Step 1:* 5 minutos à 94°C

35 ciclos de:

*Step 2:* 30 segundos à 94°C

*Step 3:* 45 segundos à TA média, com variação de 50 °C a 60°C

*Step 4:* 45 segundos à 72°C

1 ciclo de:

*Step 5:* 20 minutos à 72°C

*Step 6:* 24 horas à 4°C

Tabela 5. Temperaturas pré-estabelecidas para as reações de gradiente de temperatura dos locos de *Brycon* (12 temperaturas, no termociclador Mastercycler Gradient Eppendorf) e para *S. franciscanus* (seis temperaturas, no termociclador Veriti 96 well Applied Biosystems) para a determinação da temperatura de anelamento (TA) dos conjuntos de *primers* testados.

<b>Tubos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>
<b><i>Brycon</i></b>												
<b>Temperatura (°C)</b>	47	47, 2	48,1	49,5	51,8	53,4	55,6	57,8	59,8	61,6	62,8	63,5
<b><i>S. franciscanus</i></b>												
<b>Temperatura (°C)</b>	52	54	56	58	60	62	-	-	-	-	-	-

Após o término das reações, os produtos com amplificação satisfatória foram submetidos à genotipagem em seqüenciador *MegaBACE 1000 DNA Analysis System* de 96 capilares, utilizando-se o *programa Genetic Profiler Suíte version 2.2 (Amersham Biosciences)*. Nas reações para a genotipagem utilizando-se o *primer* M13 contendo fluoróforo, foi utilizado um novo ciclo de reação como segue a seguir:

***Ciclo clássico com adição M13 (Schuelke, 2000)***

*Step 1:* 5 minutos à 94°C

35 ciclos de:

*Step 2:* 30 segundos à 94°C

*Step 3:* 45 segundos à TA média, com variação de 50 °C a 60°C

*Step 4:* 45 segundos à 72°C

10 ciclos de

*Step 5:* 30 segundos à 94°C

*Step 6:* 45 segundos à 53 °C

*Step 7:* 45 segundos à 72°C

1 ciclo de:

*Step 8:* 20 minutos à 72°C

*Step 9:* 24 horas à 4°C

Reações de *Touch-down* de temperatura também foram realizadas para estabelecimento de perfis de amplificação mais satisfatórios. Nestes casos o ciclo de reação foi o seguinte:

***Ciclo Touch-down***

*Step 1:* 5 minutos à 94°C

3 ciclos de:

*Step 2:* 30 segundos à 94°C

*Step 3:* 45 segundos à TA média, com decaimento de 1°C (início em 60°C e término a 50°C), totalizando 30 ciclos

*Step 4:* 45 segundos à 72°C

10 ciclos de

*Step 5:* 30 segundos à 94°C

*Step 6:* 45 segundos à 53 °C

*Step 7:* 45 segundos à 72°C

1 ciclo de:

*Step 8:* 20 minutos à 72°C

*Step 9:* 24 horas à 4°C

Além disso, para minimizar a presença de bandas espúrias, o protocolo proposto por Arruda et al. (2010) foi também avaliado. Este protocolo visa à

diminuição da amplificação de bandas inespecíficas, facilitando o processo de identificação dos alelos na etapa de genotipagem. Neste caso, o ciclo clássico com o *primer* M13 marcado foi utilizado. Nesta reação, foram inicialmente adicionados somente os *primers forward* e *reverse*. Após esta etapa, seguida de uma extensão final de 15 minutos a 72°C, o *primer* M13 marcado com fluoróforo foi adicionado, seguindo-se seus ciclos de amplificação. Esta adição posterior do *primer* marcado com M13 visa à menor amplificação de bandas inespecíficas que por ventura possam existir devido ao *primer* com a cauda M13. Todas as concentrações iniciais dos reagentes foram mantidas para garantir a amplificação do loco analisado.

### 3.5. Estimativas de Erros de Genotipagem

As estimativas de erros de genotipagem foram realizadas baseadas no trabalho descrito por Bonin et al. (2004). Foram selecionados aleatoriamente 3.5% do total de amostras analisadas para serem novamente genotipadas. A partir daí, os erros foram quantificados segundo as fórmulas 1 e 2 (Pompanon et al., 2005) como a seguir:

(1) Taxa de erros por alelo

$$e_a = \frac{m_a}{2nt}$$

Onde:

$e_a$  é a taxa de erros por alelo,

$m_a$  é o número de alelos diferentes,

$nt$  é o número de alelos replicados.

(2) Taxa de erro por locus

$$e_l = \frac{m_l}{nt}$$

Onde:

$e_l$  é a taxa de erros por loco,

$m_l$  é o número de genótipos com pelo menos um alelo diferente, e

$nt$  é o número de réplicas do genótipo.

### **3.6. Análises Estatísticas**

#### **3.6.1. Caracterização da Variabilidade Genética**

As análises estatísticas para os locos que se apresentaram polimórficos foram realizadas utilizando-se o programa Genepop versão 4.0 (Raymond e Rousset, 1995a), disponível na *website* <http://wbiomed.curtin.edu.au/genepop>. A existência de equilíbrio de Hardy-Weinberg se deu através do teste exato (Guo e Thompson, 1992), que tem como hipótese nula a união aleatória dos gametas. O teste de desequilíbrio genotípico também foi realizado neste mesmo programa. Este teste tem como hipótese nula que os genótipos de um loco são independentes dos genótipos do outro loco, ou seja, que os locos não estão ligados.

Os níveis de heterozigosidade observada e esperada, além do número de alelos privados foram calculados utilizando-se o programa GenAlEx 6.0. (Peakall e Smouse, 2006). Valores de diversidade gênica (Nei, 1987) e riqueza

alélica foram calculados com o programa FSTAT 2.93 (Goudet, 1995). Estes valores são parâmetros independentes do tamanho amostral, podendo assim, comparar valores entre amostragens de diferentes tamanhos. Este mesmo programa foi utilizado também para o cálculo do Fis (coeficiente de endocruzamento). O teste de Kruskal-Wallis foi aplicado aos valores de diversidade gênica e riqueza alélica para verificar se houve diferenças significativas em tais valores entre as populações analisadas.

A presença de alelos nulos foi verificada com o programa Micro-Checker versão 2.2.3. (Oosterhout et al., 2004). Este programa identifica uma possível presença de alelos nulos na amostragem, bem como sua frequência e ainda se há ou não presença de alelo *drop-out* ou *stutters*. *Stutters* são comuns em longos locos dinucleotídeos, onde vários picos são gerados por artefatos de PCR, mas, no entanto, apenas um deles é o alelo real. Conseqüentemente, erros devidos a estes artefatos podem ser gerados na contagem de um alelo (identificação errônea do genótipo). O método adotado para a estimativa da frequência de alelos nulos foi o Brookfield 1, proposto por Brookfield (1996), que considera que os alelos nulos podem ser gerados por DNA degradado, problemas de amplificação na PCR (por exemplo, ligação dos *primers* na seqüência alvo) e/ou presença de reais alelos nulos (mutações nos sítios de anelamento dos *primers* flanqueadores).

A correção seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989) foi realizada para confirmar as significâncias dos resultados encontrados em todos os testes realizados. Nesta correção, em comparação à correção padrão de Bonferroni, há um incremento no poder de identificação de mais de uma falsa hipótese aceita, ou seja, este teste passa a detectar mais possíveis falsas  $H_1$ , que

através da correção de Bonferroni convencional seriam consideradas verdadeiras. Deste modo, para a execução do teste, primeiro deve-se escolher um nível de significância  $\alpha$  e depois dispor os valores de P obtidos nos testes de forma crescente. A partir desse ponto, cada valor de P passará a ter um novo valor crítico, obtido da seguinte maneira: para o menor valor ( $P_1$ ), deve-se obter a razão entre o nível de significância  $\alpha$  e o número de testes ( $k$ ) realizados. Se  $P_1 \leq \alpha/k$ , deve-se considerar este valor significativo e deste modo, rejeitar  $H_0$ . Depois deve se considerar o segundo menor valor ( $P_2$ ) e obter a razão entre  $\alpha$  e  $(k-1)$ . Se  $P_2 \leq \alpha/(k-1)$ , então rejeita-se  $H_0$ . Caso o valor de P seja maior que  $P_2$ , então considera-se não significativo e assume-se para todos os outros valores de P que estes também não são significativos. Deve-se fazer isto até  $P_n \leq \alpha/(1 + k - n)$ , ou seja, até que  $P > P_n$ . A partir daí, todos os outros valores devem ser considerados não significantes.

### **3.6.2. Diferenciação Genética entre as Populações**

As análises estatísticas foram conduzidas considerando todas as amostras como uma única população e considerando-se cada população separadamente. Deste modo, pudemos verificar se havia diferenças entre as populações ou se todas se comportavam como uma única população panmítica.

A diferenciação gênica (Raymond e Rousset, 1995b) e genotípica (teste G, Goudet *et al.* 1996) entre as populações foi calculada através do programa Genepop 4.0., onde a hipótese nula parte da premissa de que os alelos ou genótipos são retirados de todas as populações de forma idêntica, ou seja, que

estes são distribuídos entre todas as populações na mesma proporção. O teste G empregado nestas análises detecta diferenças muito tênues nas frequências alélicas, sendo considerado extremamente robusto para realização de tais inferências (Balloux e Lugon-Moulin, 2002). Também foram calculadas a distância e identidade genética das populações (Nei, 1972) através do programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1997).

Para as análises posteriores de  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984), o programa FSTAT 2.9.3. foi utilizado (Goudet, 1995). O  $F_{ST}$  assume o modelo de alelos infinitos (IAM, *Infinite Alleles Model*), onde cada nova mutação gera um novo alelo, podendo envolver qualquer número de repetições nos microssatélites. Em contraste temos o outro modelo proposto para surgimento dos alelos de microssatélites (SMM, *Stepwise Mutation Model*), no qual a mutação ocorre com o ganho ou perda de uma unidade de repetição, o que pode gerar alelos que já estão presentes na população.

Somente o  $F_{ST}$  foi aqui determinado porque esta abordagem vem sendo comumente utilizada para estudos de variabilidade em peixes (O'Connell e Wright, 1997) e também parece ser a mais indicada quando o tamanho amostral é moderado a pequeno (menor que 50) e quando poucos locos (dez locos, como por exemplo) são analisados (Gaggiotti et al., 1999).

O valor de diferenciação real,  $D_{EST}$  (Jost, 2008), foi calculado com o programa SMOGD (Crawford, 2010). Este valor tem interpretação sobre a diferenciação populacional (valor variando entre 0 e 1) semelhante aos valores de  $F_{ST}$  (Wright, 1951),  $G_{ST}$  (Nei, 1973), valores propostos quando as técnicas de detecção de polimorfismos estavam surgindo, principalmente com análises de alozimas. Desse modo, estas estatísticas estão relacionadas a locos onde a

diversidade é baixa e segundo Nagylaki (1998) os valores de diferenciação  $G_{ST}$  são apropriados se, e somente se, a diversidade gênica é baixa. No entanto, o  $D_{EST}$  é uma estatística em que melhor se encaixa sob a nova perspectiva de detecção de polimorfismo dos novos marcadores, como os microssatélites (que sabidamente possuem taxas de mutação muito superiores aos locos de alozimas). Jost (2008) demonstra que os valores de  $G_{ST}$  podem na verdade, apesar de existir completa diferenciação entre as populações, apontar que a diferenciação é perto de zero, uma vez que sua estatística é baseada nos níveis de heterozigosidade.  $D_{EST}$  por sua vez, sobrepõe este problema pelo cálculo da diferenciação genética independentemente da variação nas frequências alélicas entre as subpopulações, baseado na proporção dos alelos que são únicos para uma subpopulação e é sugerido como um substituto para as medidas convencionais de diferenciação genética (Davis et al., 2010).

A análise de AMOVA (*Analyses of Molecular Variance*) foi realizada no software ARLEQUIN 3.1. (Excoffier et al., 2005), com 20000 permutações. Esta análise é utilizada para avaliar a quantidade de estruturação populacional. Desse modo, foram formados grupos entre as populações, sendo realizadas duas análises: uma entre todas as populações separadas e outra com um grupo entre as populações residentes (RA-10/2007 e RL-04/2009) e as demais populações.

O programa Structure 2.3.1. (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para a verificação da estrutura populacional. Este programa utiliza a abordagem de análise Bayesiana para determinação de possíveis populações existentes (K) na amostragem, considerando-se apenas os genótipos dos indivíduos amostrados. O programa trabalha agrupando os indivíduos em grupos de modo



que o EHW seja maximizado dentro de cada grupo. Deste modo, com base nas frequências alélicas de cada indivíduo, este é alocado em uma possível população, probabilisticamente avaliada através de um teste de atribuição (*assignment test*) quando essas populações são misturadas. No presente trabalho foram considerados os modelos de  $K=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  e  $10$ , com  $10$  réplicas cada, assumindo o “modelo de mistura entre as populações” e “frequências alélicas correlacionadas”. Os testes foram realizados por meio da cadeia de Markov-Monte Carlo, com períodos de *burn-in* de  $30.000$  e  $200.000$  réplicas, inicialmente para todas as populações como um todo. Estes valores de *burn-in* e réplicas foram escolhidos devido ao longo tempo de análise, o qual segundo Pritchard et al. (2000), na análise de um conjunto de dados com sete microssatélites e  $155$  amostras, o tempo de corrida para  $10^6$  réplicas era de  $70$  minutos em média. Posteriormente, novos testes com *burn-in*= $500.000$  e  $1$  milhão de réplicas foram realizados dentro de duas populações específicas e entre as demais populações para identificação de possível sub-estruturação populacional. Os testes do presente trabalho foram realizados em PC Windows® based, Processador Intel Core 2 duo,  $4\text{Gb}$  memória RAM PC durante um tempo estimado de  $80$  horas.

Geralmente a escolha do provável valor de  $K$  é obtida em comparações com as diversas corridas em um gráfico. Quando estes valores atingem um *plateau* (maiores valores de  $\text{LnP}(D)$ ), escolhe-se o valor de  $K$  imediatamente menor a este *plateau*. Estimativas de probabilidades baseados nos logaritmos das probabilidades também são considerados (para maiores detalhes ver Manual do programa Structure). Como no próprio manual do programa há um indicativo de que a escolha do valor mais provável de  $K$  é subjetiva, este

sugere o uso de um método de escolha mais formal e menos subjetivo. Deste modo, correções para se estimar o número de grupos (*clusters*) existentes na amostragem após o uso do programa Structure foram realizadas de acordo com Evanno et al. (2005). Neste método, as diferenças entre cada valor de Ln das probabilidades de K entre sucessivos testes (ex., K=1, 2, 3, ..., K=n) são medidas (Ln[K2]-Ln[K3] e sucessivamente, como por exemplo) e réplicas são realizadas dentro de cada K (para obtermos uma medida de desvio padrão entre os testes). O valor de K que apresentar a maior razão entre essas diferenças e o desvio padrão é o número [delta (K)] mais provável de populações (K) existentes.

A ausência de estruturação, segundo o manual do programa, é sugerida pela probabilidade semelhante de amostras pertencerem a um ou mais grupos, de forma que nenhuma subdivisão possa ser definida (figura 6).



Figura 6. Exemplo de um teste de atribuição em que a estruturação populacional não pode ser evidenciada. Os indivíduos estão representados por barras verticais. Note que cada indivíduo possui a mesma probabilidade de pertencer a cada grupo diferente (representado cada um por uma cor diferente) e que deste modo, não existe subdivisões entre eles.

# ***RESULTADOS***

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Extração e Quantificação de DNA

Foram extraídos DNA de 201 amostras de *S. brasiliensis* coletados na região da Cachoeira de Emas (Município de Pirassununga, SP), sendo 129 amostras pertencentes a populações residentes e 72 pertencentes a populações migradoras.

As amostras de DNA obtidas se mostraram de boa qualidade e quantidade quando analisadas em gel de agarose 0,8%, demonstrando ausência ou baixo grau de degradação e concentrações variando entre 50 e 400ng (Figura 7).

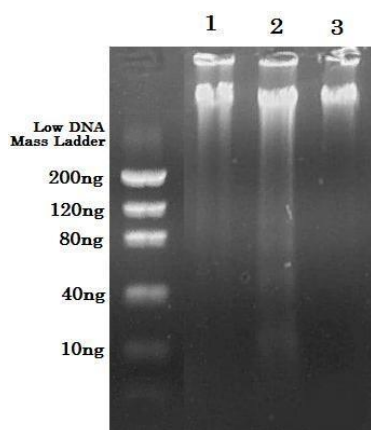


Figura 7. Quantificação de DNA de três indivíduos pertencentes à população residente (RA-10/2007) da barragem de Cachoeira de Emas, Pirassununga – SP. Ao lado está o marcador de peso molecular (Low DNA Mass Ladder, Invitrogen) e suas concentrações em ng.

### 4.2. Testes de PCR

#### 4.2.1. Transferabilidade dos Locos Microssatélites de *Brycon*

As primeiras reações de transferabilidade utilizaram os locos descritos para as espécies de *Brycon* (*B. hilarii*, sete locos; *B. opalinus*, seis locos), uma vez que os locos de *S. franciscanus* ainda estavam em fase inicial de prospecção. Os testes realizados utilizando-se a enzima Platinum® Taq DNA

Polymerase da Invitrogen foram insatisfatórios, com a presença de muitas bandas inespecíficas em quase todos os locos. No entanto, testes de PCR realizados utilizando-se estes mesmos locos, mas com o Kit MasterMix GoTaq DNA Colorless (Promega), evidenciaram melhores resultados de amplificação.

Os locos de *B. opalinus* foram aqueles que evidenciaram os melhores resultados de amplificação heteróloga. Todos os sete locos (BoM1, BoM2, BoM5, BoM6, BoM7, BoM12 e BoM13) dessa espécie testados em *S. brasiliensis* amplificaram. Os locos BoM1 e BoM5, no entanto, apresentaram a presença de bandas inespecíficas e o loco BoM6 apresentou tamanho de alelos muito superior ao descrito pelos autores em *Brycon* (142-178pb em *Brycon* e 300-400pb em *Salminus*), sendo excluídos das análises posteriores. O loco BoM7 não demonstrou ser polimórfico em gel de agarose 3%. Apenas três locos (BoM2, tamanho de fragmento entre 100 a 200pb; BoM12, tamanho de fragmento entre 200 e 350pb e BoM13, tamanho de fragmento entre 100 a 200pb) apresentaram-se polimórficos em gel de agarose 3%. O loco BoM2 foi utilizado nas análises populacionais na espécie *S. brasiliensis* por apresentar um excelente padrão de amplificação em todos os indivíduos testados, com bandas fortes e bem definidas.

Em relação aos locos da espécie *B. hilarii*, do total de seis locos testados (Bh5, Bh6, Bh8, Bh13, Bh15 e Bh17), cinco amplificaram, sendo que quatro (Bh6, Bh8, Bh15 e Bh17) amplificaram fragmentos com tamanho superior ao descrito pelos autores e dois destes locos (Bh15 e Bh17) evidenciaram também a presença de bandas inespecíficas. Deste total, somente o loco Bh13 mostrou-se útil para as análises genético-populacionais em *S. brasiliensis*, com fragmentos obtidos em gel de agarose 2% entre 100 a 150pb.

A tabela 6 e as figuras 8 e 9 resumem os principais resultados obtidos nestes testes iniciais de transferibilidade para esses locos. Alguns locos apresentaram melhor padrão de amplificação utilizando-se uma única temperatura de anelamento do *primer* enquanto outros utilizaram *touch-down* de temperatura. Todos os testes utilizaram 50ng/μl de DNA em cada reação.

Tabela 6. Resumo dos dados de transferibilidade dos locos de *Brycon* para *S. brasiliensis*. Estão detalhados os tamanhos dos fragmentos em gel de agarose 2% e o ciclo utilizado.

Espécie de Origem	Loci						
<b><i>Brycon opalinus</i></b>	BoM1	BoM2	BoM5	BoM6	BoM7	BoM12	BoM13
Amplificação	+	+	+	+	+	+	+
Ciclo utilizado	<i>Touch-down</i>	<i>Touch-down</i>	<i>Touch-down</i>	<i>Touch-down</i>	<i>Touch-down</i>	<i>Touch-down</i>	<i>Touch-down</i>
Temperatura °C	60-50	60-50	60-50	60-50	60-50	60-50	60-50
Tamanho (pb)	100-200 B.E.	100-200	B.E.	300-400	200-300	200-350	100-200
	Loci						
<b><i>Brycon hilarii</i></b>	Bh5	Bh6	Bh8	Bh13	Bh15	Bh17	
Amplificação	-	+	+	+	+	+	
Ciclo utilizado	Clássico	Clássico	Clássico	Clássico	Clássico	<i>Touch-down</i>	
Temperatura °C	-	56	56	56	56	60-50	
Tamanho (pb)	-	±850	±700	100-150	300-450, B.E.	±650, B.E.	

+ Amplificação  
 - Ausência de amplificação  
 B.E. Bandas espúrias

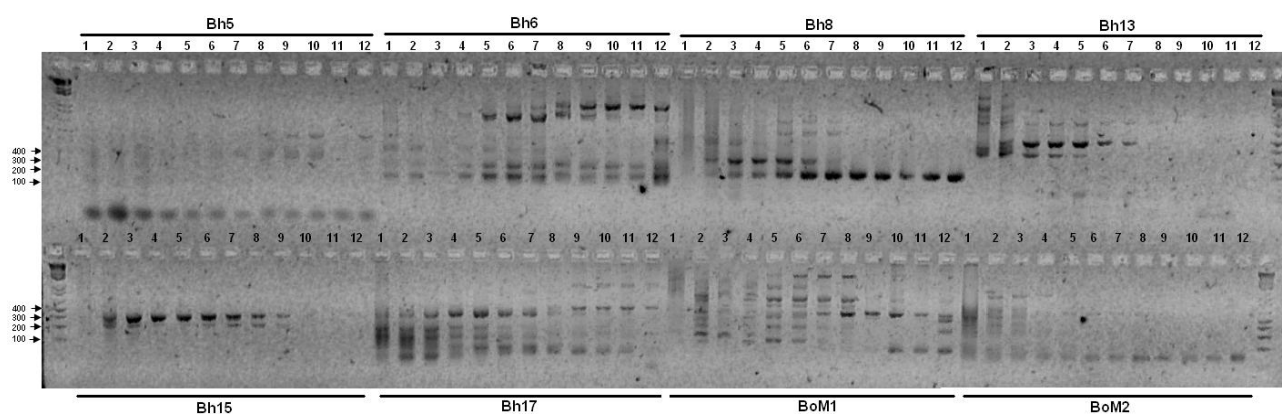


Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando o resultado da reação de PCR em termociclador de gradiente de temperatura com a enzima Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen). Oito dos 14 *primers* já descritos estão demonstrados. Ao lado está indicado em pb o tamanho dos fragmentos (1 KB Plus DNA Ladder, Invitrogen); cada loco está mostrado com barras; Os números de 1 a 12 indicam as temperaturas analisadas segundo a tabela 6. Testes executados no Mastercycler gradient, Eppendorf.

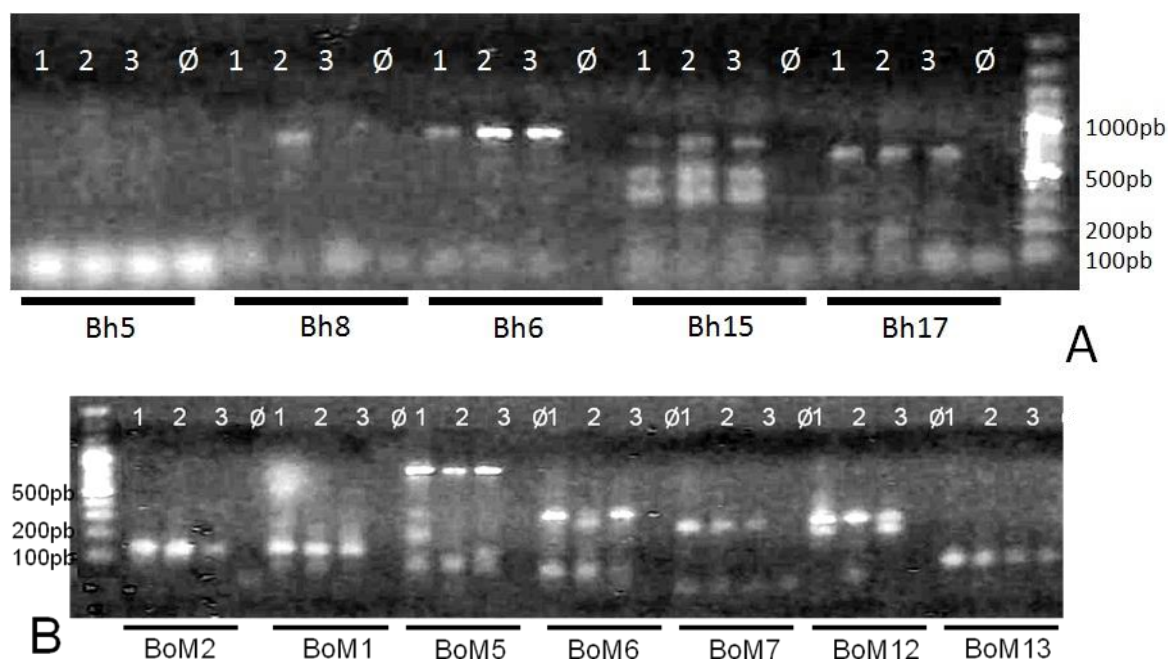


Figura 9. Gel de agarose 2% evidenciando o padrão de amplificação de alguns locos de *Brycon* (*B. hilarii* em A e *B. opalinus* em B). Os testes foram conduzidos com MasterMix GoTaq DNA Colorless, Promega e o ciclo *touch-down*. Acima em cada figura está o número da amostra utilizada seguida de um controle negativo de amplificação (Ø). Ao lado está o marcador molecular de tamanho dos fragmentos (1 KB Plus DNA Ladder, Invitrogen) indicado em pb.

#### **4.2.2. Transferabilidade dos Locos Microsatélites de *S. franciscanus***

Após o isolamento e caracterização de locos microsatélites para a espécie *S. franciscanus*, estes locos também foram utilizados no presente trabalho para avaliação de seu potencial de uso na espécie *S. brasiliensis*. Dos 16 pares de *primers* testados, 15 evidenciaram padrão de amplificação satisfatório nos testes iniciais de gradiente de temperatura.

O loco Sfra01, no entanto, não evidenciou padrão de amplificação eficiente nestes testes, demonstrando amplificação muito fraca e presença de bandas inespecíficas (figura 10). O loco Sfra11 apresentou amplificação com bandas inespecíficas quando analisado em um número amostral maior e foi descartado das análises. Já o loco Sfra02 demonstrou um tamanho de fragmento entre 250 a 350pb quando analisado em gel de agarose 2%. Do mesmo modo, os locos Sfra03 e Sfra04 tiveram tamanho de fragmento entre 200 e 250pb. Os locos Sfra05, Sfra08, Sfra11 e Sfra13 apresentaram tamanho de fragmento entre 200 e 300pb e o loco Sfra06 tamanho de fragmento entre 280 e 350pb. Já o loco Sfra07 apresentou tamanho de fragmento entre 100 a 250pb. Os locos Sfra09, Sfra12, Sfra15 e Sfra18 tiveram fragmentos variando de 100 a 200pb. O loco Sfra10 apresentou tamanho de fragmento entre 250 a 350pb. O loco Sfra14 teve tamanho de fragmento entre 180 a 300pb. A tabela 7 e a figura 10 resumem os principais dados obtidos nesta primeira avaliação de transferabilidade dos locos de *S. franciscanus* para *S. brasiliensis*



Tabela 7. Resumo dos dados obtidos para a transferabilidade dos locos de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*. Estão indicados os locos testados e o número da amostra utilizada em cada teste. A concentração inicial de DNA utilizada para todos os testes foi 50ng/μl. As temperaturas em que houve amplificação também estão demonstradas (segundo tabela 5), a temperatura escolhida para a condução dos testes de validação populacional, e também os tamanhos dos fragmentos em gel de agarose 2%.

<b>Loci</b>	<b>Sfra 01</b>	<b>Sfra 02</b>	<b>Sfra 03</b>	<b>Sfra 04</b>	<b>Sfra05</b>
<b>Amostra</b>	030	031	033	034	035
<b>Temperatura °C</b>	Até 58	TODAS	TODAS	TODAS	TODAS
<b>Temperatura validação</b>	54	58	58	58	58
<b>Tamanho</b>	100-200pb B.E.	250-350pb	200-250pb	200-250pb	200-300pb
<b>Loci</b>	<b>Sfra 06</b>	<b>Sfra 07</b>	<b>Sfra 08</b>	<b>Sfra09</b>	<b>Sfra 10</b>
<b>Amostra</b>	<b>036</b>	<b>037</b>	<b>038</b>	<b>039</b>	<b>040</b>
<b>Temperatura °C</b>	TODAS	TODAS	TODAS	ATÉ 60	TODAS
<b>Temperatura validação</b>	58	56	58	54	58
<b>Tamanho</b>	280-350pb	100-250pb	200-300pb	100-200pb	250-350pb
<b>Loci</b>	<b>Sfra 11</b>	<b>Sfra 12</b>	<b>Sfra 13</b>	<b>Sfra 14</b>	<b>Sfra15</b>
<b>Amostra</b>	<b>041</b>	<b>042</b>	<b>043</b>	<b>044</b>	<b>045</b>
<b>Temperatura °C</b>	TODAS	TODAS	TODAS	ATÉ 60	TODAS
<b>Temperatura validação</b>	54	58	58	56	58
<b>Tamanho</b>	200-300pb	100-200pb	200-300pb	180-300pb	100-200pb
<b>Loci</b>	<b>Sfra18</b>				
<b>Amostra</b>	<b>053</b>				
<b>Temperatura °C</b>	TODAS				
<b>Temperatura validação</b>	60-50				
<b>Tamanho</b>	100-200pb				

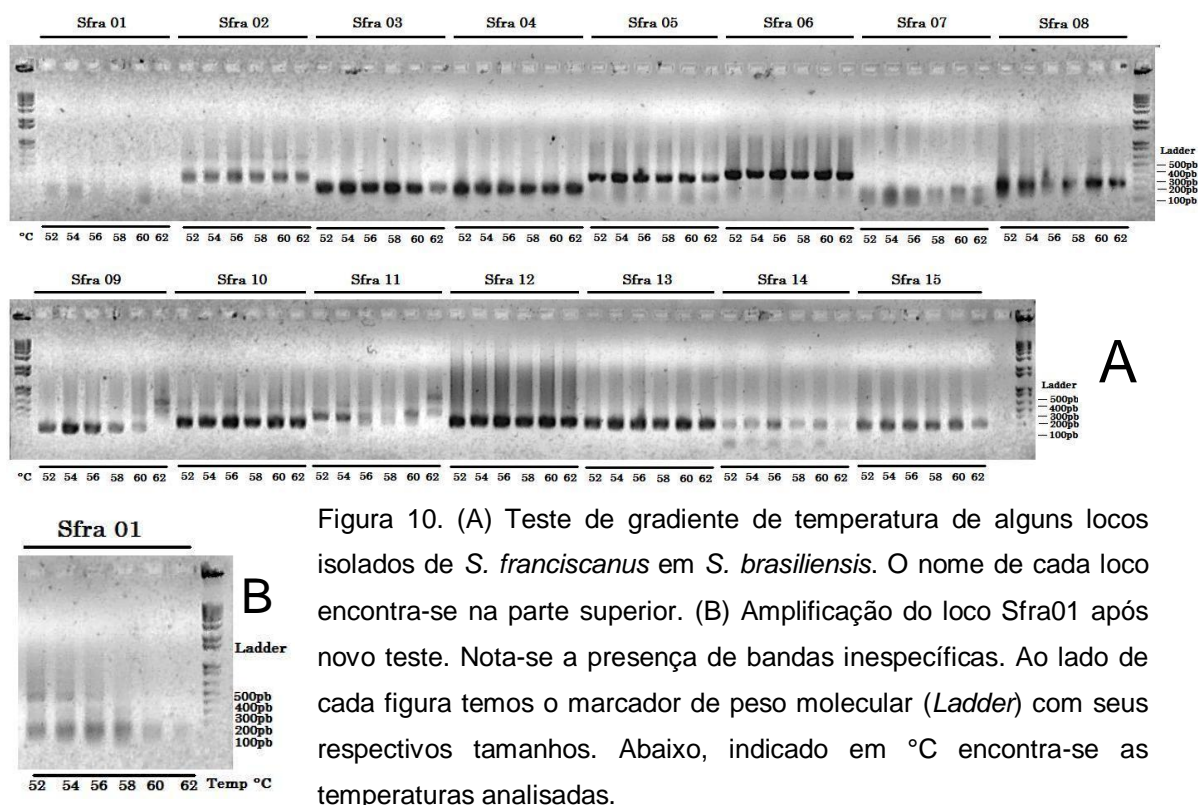


Figura 10. (A) Teste de gradiente de temperatura de alguns locos isolados de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*. O nome de cada loco encontra-se na parte superior. (B) Amplificação do loco Sfra01 após novo teste. Nota-se a presença de bandas inespecíficas. Ao lado de cada figura temos o marcador de peso molecular (*Ladder*) com seus respectivos tamanhos. Abaixo, indicado em °C encontra-se as temperaturas analisadas.

Posteriormente aos testes de transferabilidade, seguiu-se a etapa de validação populacional e avaliação do polimorfismo em gel de agarose 3%, no qual foi possível evidenciar a presença de indivíduos heterozigotos para alguns locos (figura 11). Após a finalização destes testes, 14 locos demonstraram amplificação satisfatória em *S. brasiliensis* e deste modo, todos os locos foram genotipados em seqüenciador automático. A tabela 8 mostra os ciclos utilizados em cada loco, bem como as temperaturas dos testes de PCR.

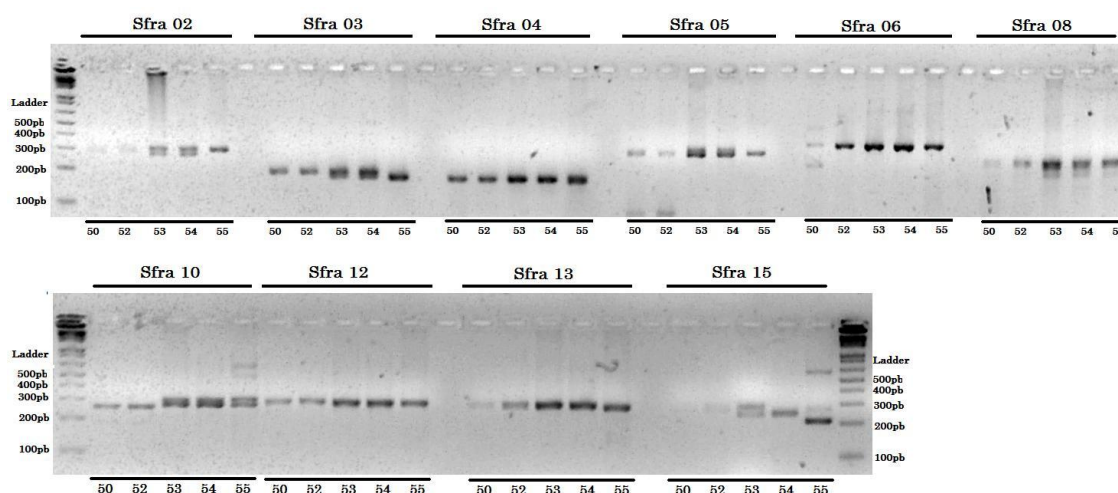


Figura 11. Etapa de validação dos locos isolados de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*. Nos locos Sfra02, Sfra03, Sfra10, Sfra13 e Sfra15 é possível a visualização da presença de heterozigotos ou alelos de diferentes tamanhos. Gel de agarose 3%. Acima da figura está indicado o nome do loco testado; ao lado encontra-se o marcador de tamanho molecular (*Ladder*) e seus respectivos tamanhos em pb; abaixo estão indicados os números das diferentes amostras utilizadas nesse teste.

Tabela 8. Descrição dos ciclos e temperaturas utilizadas para amplificação dos locos de *S. franciscanus* em *S. brasiliensis*.

Loco	Ciclo utilizado	Temperatura (°C)
Sfra01	Clássico com adição M13	56
Sfra02	Clássico com adição M13	58
Sfra03	Clássico com adição M13	58
Sfra04	<i>Touch-down</i>	60-50
Sfra05	Clássico com adição M13	58
Sfra06	Clássico com adição M13	54
Sfra07	Clássico com adição M13	58
Sfra08	Clássico com adição M16	58
Sfra09	Clássico com adição M13	54
Sfra10	Clássico com adição M13	58
Sfra11	Clássico com adição M13	54
Sfra12	Clássico com adição M13	58
Sfra13	Clássico com adição M13	58
Sfra14	<i>Touch-down</i>	60-50
Sfra15	<i>Touch-down</i>	60-50
Sfra18	<i>Touch-down</i>	60-50

### **4.3. Genotipagem dos Locos**

Foram realizadas genotipagens de 14 locos de *S. franciscanus* para um mínimo de 17 e máximo de 41 exemplares de *S. brasiliensis* pertencentes a cada uma das oito populações residentes e migradoras, analisadas no presente trabalho. Destes locos genotipados, nove locos (Sfra02, Sfra03, Sfra04, Sfra05, Sfra10, Sfra13, Sfra14, Sfra15 e Sfra18) apresentaram polimorfismo após a genotipagem. Os locos Sfra06 e Sfra09 evidenciaram padrão monomórfico nas populações avaliadas. Os locos Sfra07, Sfra08 e Sfra12 apresentaram-se monomórficos, exibindo múltiplos picos após análise em mais de 30 de indivíduos. Por este motivo, o protocolo proposto por Arruda et al. (2010) foi implementado, mas no entanto, não foram obtidos resultados satisfatórios, sendo que estes locos foram excluídos das análises posteriores e também considerados como monomórficos (Figuras 12 e 13).

Dos locos descritos para as espécies de *Brycon* apenas um deles (BoM2), com bandas fortes e bem definidas, foi incluído nas genotipagens, uma vez que foi dada preferência aos locos descritos para a espécie *S. franciscanus*, congênere de *S. brasiliensis*. Deste modo, no total foram considerados dez marcadores microssatélites heterólogos e polimórficos para as análises populacionais (sendo nove descritos para *S. franciscanus* e um para *B. opalinus*).

O número de alelos variou de 8 (Sfra18) a 48 (Sfra02), com número médio 21 alelos por loco (total de 210 alelos identificados para os 10 locos). O loco Sfra02 teve tamanhos de fragmento variando de 210 a 356pb. O loco Sfra03 apresentou 16 alelos, com tamanho de fragmento variando de 178 a

210pb. O loco Sfra04 teve tamanho de fragmentos entre 156 a 176pb, apresentando 10 alelos no total. Já o loco Sfra05 apresentou 19 alelos, com tamanho variando entre 274 a 354pb. O loco Sfra10 teve tamanho de fragmentos variando de 208 a 324pb, com um total de 15 alelos identificados. O loco Sfra13 apresentou 27 alelos, com tamanho entre 232 a 300pb. O loco Sfra14 teve 19 alelos identificados com tamanho entre 238 a 280pb. O loco Sfra15 teve tamanho de fragmentos entre 198 a 296pb, com um total de 38 alelos. O loco Sfra18 apresentou oito alelos com tamanho de fragmentos entre 116 a 180pb e o loco BoM2 apresentou 10 alelos com tamanho variando entre 152 a 182pb.

Os demais locos apresentaram-se monomórficos, sendo que o loco Sfra06 apresentou um tamanho de fragmento de 366pb, o loco Sfra07 teve fragmento de tamanho 198pb, o loco Sfra08 apresentou tamanho de fragmento de 250pb, o loco Sfra09 teve tamanho de fragmento de 236pb e o loco Sfra12 apresentou fragmento de tamanho de 284pb. A tabela 9 resume os resultados obtidos após genotipagem dos 10 locos heterólogos.

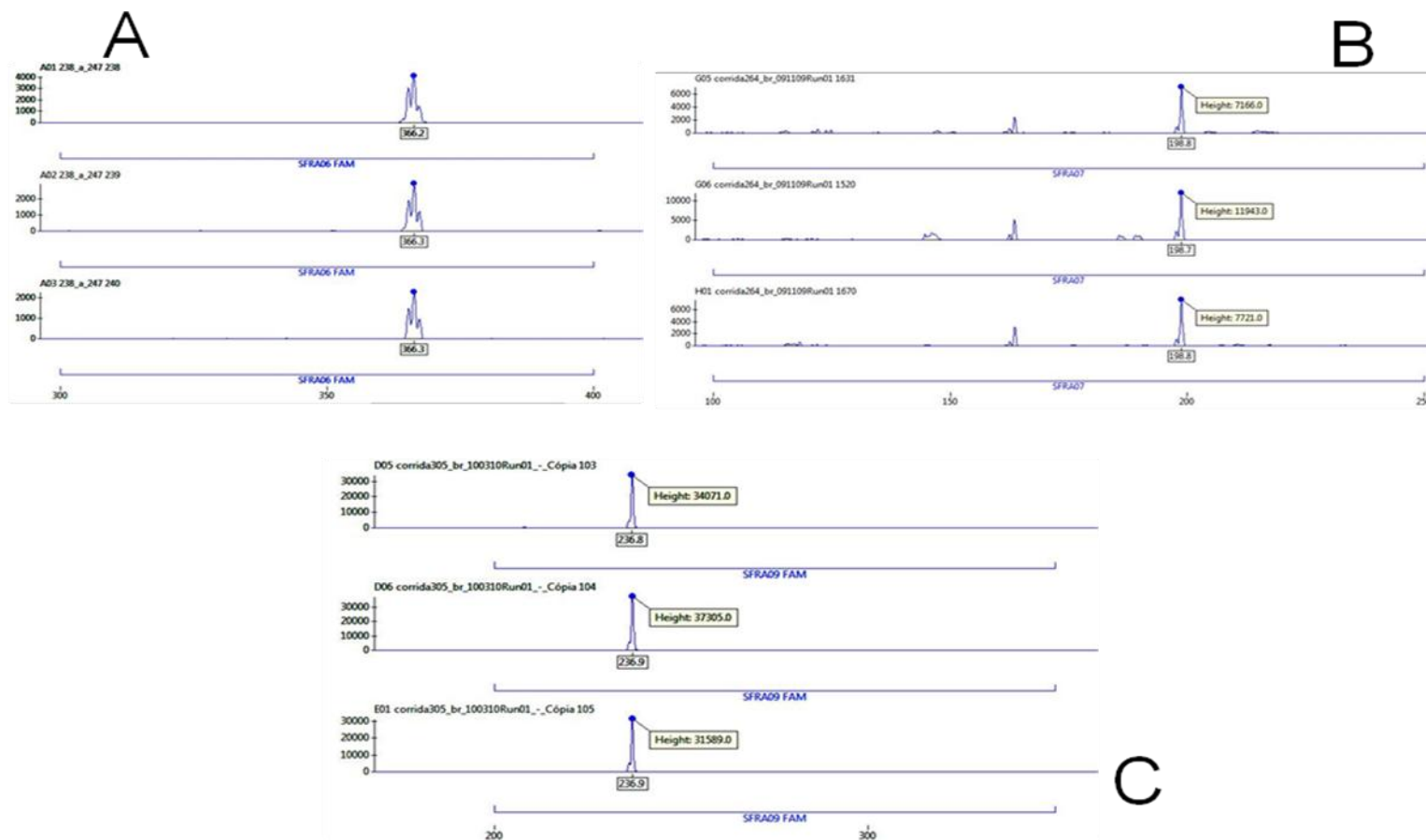


Figura 12. Resultados da genotipagem de três locos monomórficos (Sfra06, Sfra07 e Sfra09) demonstrados em apenas três indivíduos. Todos os locos estão marcados com o fluoróforo FAM. Os locos foram considerados como monomórficos após análises em pelo menos 15 indivíduos. (A) O loco Sfra06 apresentou tamanho de alelo para todos os indivíduos de 366pb, (B) o loco Sfra07 de 198pb e (C) o loco Sfra09 de 236pb.

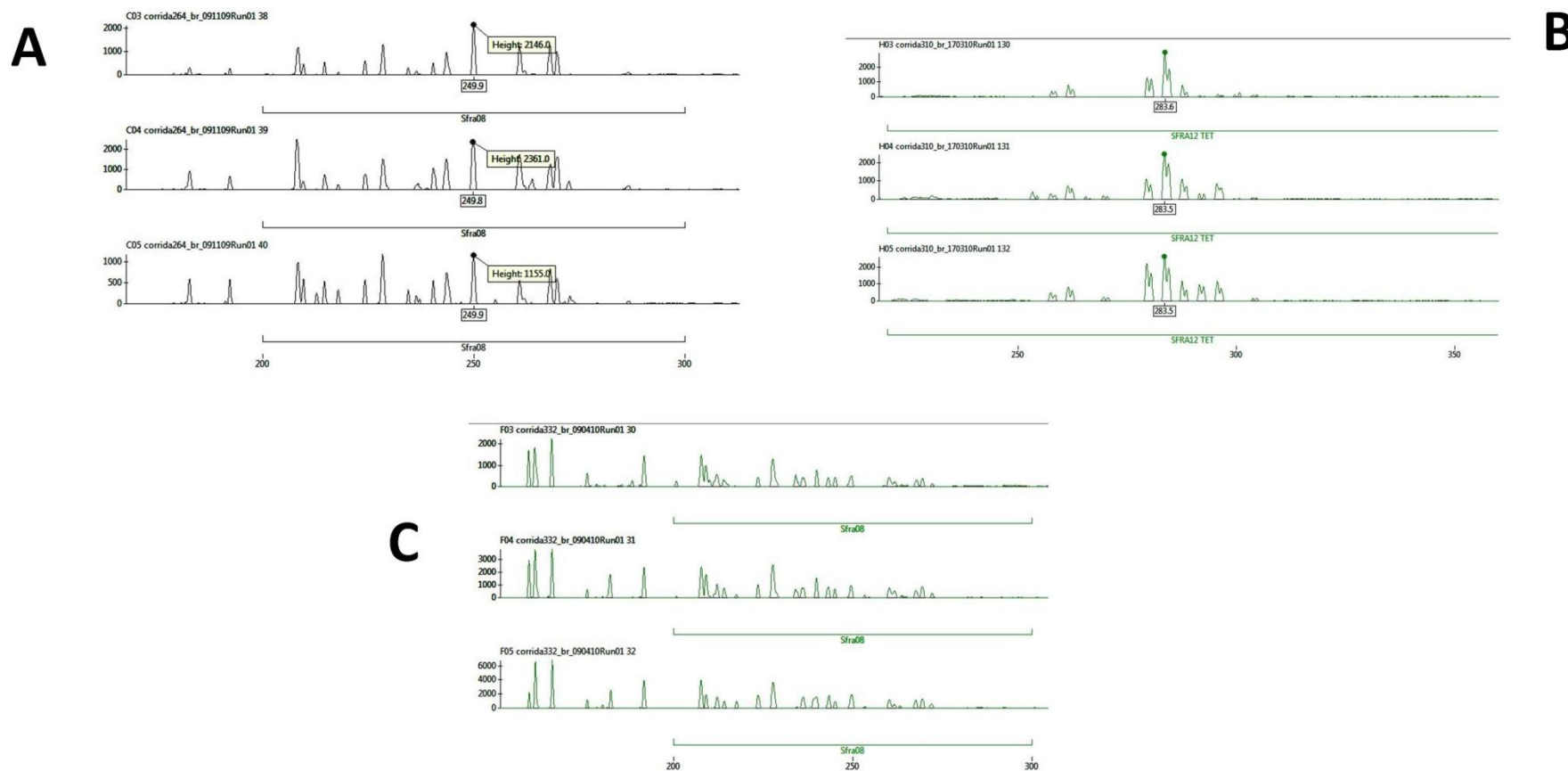


Figura 13. Análise da genotipagem de dois locos considerados monomórficos pela presença de múltiplas bandas em todos os indivíduos testados. (A) Loco Sfra08 amplificado com ciclo clássico com adição M13, marcado com fluoróforo HEX. (B) Loco Sfra12 amplificado com clássico com adição M13, marcado com fluoróforo TET. (C) Loco Sfra08 amplificado com ciclo proposto por Arruda et al. (2010). Verifica-se que não houve redução do sinal de bandas inespecíficas.

Tabela 9. Relação de todos os locos heterólogos em *S. brasiliensis*. Para alguns dos locos não foi realizada a etapa de genotipagem, apenas a avaliação de transferabilidade. Estão indicados se houve ou não genotipagem dos locos, se houve avaliação de polimorfismo em tais locos e se possível, determinado o tamanho dos alelos. O número de alelos por loco, obtidos com base em todas as amostragens realizadas, está presente na última coluna à direita.

<b>Loci</b>	<b>Genotipagem</b>	<b>Polimorfismo</b>	<b>Tamanho dos alelos (pb)</b>	<b>Número de alelos</b>
Bh5	Não	N.A.	-	-
Bh6	Não	N.A.	-	-
Bh8	Não	N.A.	-	-
Bh13	Não	N.A.	-	-
Bh15	Não	N.A.	-	-
Bh17	Não	N.A.	-	-
BoM1	Não	N.A.	-	-
BoM2	Sim	Sim	152-182	10
BoM5	Não	N.A.	-	-
BoM6	Não	N.A.	-	-
BoM7	Não	N.A.	-	-
BoM12	Não	N.A.	-	-
BoM13	Não	N.A.	-	-
Sfra01	Não	N.A.	-	-
Sfra02	Sim	Sim	210-356	48
Sfra03	Sim	Sim	178-210	16
Sfra04	Sim	Sim	156-176	10
Sfra05	Sim	Sim	274-354	19
Sfra06	Sim	Não	366	1
Sfra07	Sim	Não	198	1
Sfra08	Sim	Não	250	1
Sfra09	Sim	Não	236	1
Sfra10	Sim	Sim	208-324	15
Sfra11	Não	N.A.	-	-
Sfra12	Sim	Não	284	1
Sfra13	Sim	Sim	232-300	27
Sfra14	Sim	Sim	238-280	19
Sfra15	Sim	Sim	198-296	38
Sfra18	Sim	Sim	116-180	8

N.A.: não avaliado



A taxa média de erros de genotipagem estimada para os locos foi de 1,6% e a taxa média de erros por alelos foi de 2,4% (tabela 10).

Tabela 10. Estimativas de erros de genotipagem. ( $e_a$  refere-se a taxa de erros por alelo;  $e_l$  refere-se a taxa de erros por locus)

<b>Loco</b>	<b><math>e_a</math></b>	<b><math>e_l</math></b>
<b>Sfra02</b>	0,000	0,000
<b>Sfra03</b>	0,000	0,000
<b>Sfra04</b>	0,000	0,000
<b>Sfra05</b>	0,071	0,036
<b>Sfra10</b>	0,000	0,000
<b>Sfra13</b>	0,000	0,000
<b>Sfra14</b>	0,000	0,000
<b>Sfra15</b>	0,100	0,050
<b>Sfra18</b>	0,036	0,036
<b>BoM2</b>	0,036	0,036
<b>Média</b>	2,4%	1,6%

#### **4.4. Análises Estatísticas**

##### **4.4.1. Caracterização da Variabilidade Genética**

A análise de desequilíbrio genotípico demonstrou que nenhum par de locos aqui analisados encontra-se ligado após a correção seqüencial de Bonferroni. Deste modo, todos os 10 locos selecionados se mostraram úteis para realização das análises estatísticas. Testes para desvios de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) demonstraram que ao menos dois locos apresentam-se fora de equilíbrio nas diferentes populações analisadas. A única população que se apresentou sob o EHW para todos os locos foi a MT-12/2008 (tabela 11).

Tabela 11. EHW calculados com o programa Genepop versão 4.0. Para cada população está descrito os valores de P (P-val) obtidos pelo programa. S.E. (erro padrão); Os valores marcados com \* mostraram desvio do EHW após a correção seqüencial de Bonferroni ( $p < 0,05$ ). Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.

Pop RA-10/2007			Pop RT-07/2008			Pop MT-12/2008			Pop MT-01/2009		
lócus	P-val	S.E.	lócus	P-val	S.E.	lócus	P-val	S.E.	lócus	P-val	S.E.
SFRA02	0*	0	SFRA02	0*	0	SFRA02	0,0284	0,0034	SFRA02	0,0241	0,0023
SFRA03	0,0009*	0,0002	SFRA03	0,0189	0,0007	SFRA03	0,3389	0,0035	SFRA03	0,9135	0,0007
SFRA04	0,0183	0,0001	SFRA04	0,0725	0,0006	SFRA04	0,4073	0,0007	SFRA04	0,0825	0,0004
SFRA05	0*	0	SFRA05	0,3485	0,0025	SFRA05	0,1752	0,0024	SFRA05	0,0003*	0,0001
SFRA10	0,001	0,0001	SFRA10	0,094	0,001	SFRA10	0,686	0,0015	SFRA10	0,0029*	0,0002
SFRA13	0*	0	SFRA13	0,0802	0,0035	SFRA13	0,4861	0,0046	SFRA13	0,0919	0,0019
SFRA14	0*	0	SFRA14	0*	0	SFRA14	0,613	0,004	SFRA14	0,0082	0,0007
SFRA15	0*	0	SFRA15	0,0035*	0,0006	SFRA15	0,0103	0,0013	SFRA15	0,1144	0,0045
SFRA18	0,0134	0,0003	SFRA18	0,8889	0,0007	SFRA18	0,1083	0,0008	SFRA18	0,7194	0,001
BOM2	0,0322	0,0006	BOM2	0,9697	0,0005	BOM2	0,591	0,0018	BOM2	0,9052	0,001

Pop RL-04/2009			Pop RT-10/2009			Pop MT-11/2009			Pop MT-12/2009		
lócus	P-val	S.E.	lócus	P-val	S.E.	lócus	P-val	S.E.	lócus	P-val	S.E.
SFRA02	0,0173	0,0018	SFRA02	0,0002*	0,0002	SFRA02	0,0002*	0,0001	SFRA02	0,0291	0,0025
SFRA03	0,0414	0,0007	SFRA03	0,0156	0,0005	SFRA03	0,8437	0,0016	SFRA03	0,0049*	0,0002
SFRA04	0,0113	0,0003	SFRA04	0,0057*	0,0002	SFRA04	0,0086	0,0001	SFRA04	0,0252	0,0003
SFRA05	0,0028*	0,0002	SFRA05	0,2681	0,0055	SFRA05	0,5351	0,0021	SFRA05	0,4884	0,002
SFRA10	0,0691	0,0018	SFRA10	0,2944	0,0019	SFRA10	0,9034	0,0009	SFRA10	0,8533	0,0008
SFRA13	0,0002*	0,0001	SFRA13	0*	0	SFRA13	0,2501	0,0065	SFRA13	0,6738	0,0058
SFRA14	0,0194	0,0009	SFRA14	0,5547	0,0028	SFRA14	0,26	0,0027	SFRA14	0,017	0,0009
SFRA15	0,0001*	0	SFRA15	0,0007*	0,0003	SFRA15	0*	0	SFRA15	0*	0
SFRA18	0,2519	0,0009	SFRA18	0,0622	0,0009	SFRA18	1	0	SFRA18	0,1089	0,0008
BOM2	0,5227	0,002	BOM2	0,0169	0,0004	BOM2	0,1567	0,0015	BOM2	0,5406	0,0019

Os valores médios de heterozigosidade observada e esperada variaram, respectivamente, de 0,668 (RT-07/2008) a 0,776 (MT-01/2009) e 0,739 (RL-04/2009) a 0,818 (RT-10/2009) (tabela 12). O número de alelos privados para cada população variou de 1 a 13, sendo observada uma média de 5,4 alelos privados por loco para cada uma das populações amostradas. A figura 14 demonstra o padrão dos alelos nas populações, com suas respectivas médias em cada uma delas. A lista de alelos privados, com suas respectivas freqüências pode ser vista na tabela 13 e as freqüências de cada alelo em todas as populações estão descritas em detalhes na seção APÊNDICE.

Os valores de diversidade gênica variaram de 0,76 (RL-04/2008) a 0,84 (MT-01/2009). Já os valores de riqueza alélica variaram de 8,72 (RL-04/2009) a 10,72 (MT-12/2008). O teste de Kruskal-Wallis não identificou nenhuma diferença significativa entre as amostras (para diversidade gênica [GD],  $GD=2,034$ ;  $\chi^2=2,167$ ; para riqueza alélica [AR],  $AR=0,931$ ,  $\chi^2=2,167$ ). Os valores de Fis indicaram déficit de heterozigotos significativos para seis populações (RA-10/2007, RT-07/2008, RL-04/2009, RT-10/2009, MT-11/2009 e MT-12/2009, com valores variando de 0,105 (RL-04/2009) a 0,149 (MT-11/2009). Para as outras duas populações (MT-12/2008 e MT-01/2009) estes valores não foram significativos (tabela 14).

Tabela 12. Valores de heterozigosidade observada e esperada para cada loco em cada população analisada. N é o número amostral; Na: número de alelos; Ho: heterozigosidade observada; He: heterozigosidade esperada; \* indica déficit significativo de heterozigotos. Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.

Pop		SFRA02	SFRA03	SFRA04	SFRA05	SFRA10	SFRA13	SFRA14	SFRA15	SFRA18	BOM2	Média
<b>RA-10/2007</b>	<b>N</b>	36	36	35	35	35	36	35	36	35	36	<b>35,50</b>
	<b>Na</b>	24	12	3	12	7	20	12	23	6	7	<b>12,60</b>
	<b>Ho</b>	0,861	0,694	0,486	0,514*	0,629	0,861	0,886	0,667*	0,600	0,778	<b>0,698</b>
	<b>He</b>	0,948	0,807	0,660	0,838	0,715	0,929	0,896	0,941	0,612	0,682	<b>0,803</b>
<b>RT-07/2008</b>	<b>N</b>	29	26	28	29	29	27	25	29	29	27	<b>27,80</b>
	<b>Na</b>	27	10	5	11	7	19	12	21	5	8	<b>12,50</b>
	<b>Ho</b>	0,759*	0,538	0,500	0,931	0,690	0,889	0,320*	0,724*	0,517	0,815	<b>0,668</b>
	<b>He</b>	0,951	0,777	0,659	0,864	0,706	0,916	0,870	0,923	0,469	0,759	<b>0,789</b>
<b>RL-04/2009</b>	<b>N</b>	20	22	22	23	23	23	18	18	23	21	<b>21,30</b>
	<b>Na</b>	20	8	6	9	9	15	11	13	4	7	<b>10,20</b>
	<b>Ho</b>	0,900	0,636	0,409*	0,957	0,478*	1,000	0,667	0,778*	0,304	0,667	<b>0,680</b>
	<b>He</b>	0,931	0,794	0,670	0,776	0,601	0,865	0,832	0,883	0,370	0,666	<b>0,739</b>
<b>RT-10/2009</b>	<b>N</b>	41	41	40	40	41	41	35	41	41	41	<b>40,20</b>
	<b>Na</b>	32	9	7	17	8	22	12	31	7	8	<b>15,30</b>
	<b>Ho</b>	0,732*	0,683	0,525*	0,825	0,707	0,659*	0,829	0,854*	0,561	0,707*	<b>0,708</b>
	<b>He</b>	0,953	0,760	0,702	0,860	0,742	0,928	0,866	0,943	0,669	0,760	<b>0,818</b>
<b>MT-12/2008</b>	<b>N</b>	15	17	17	17	17	17	17	17	17	17	<b>16,80</b>
	<b>Na</b>	21	10	4	11	8	15	14	20	5	8	<b>11,60</b>
	<b>Ho</b>	0,867	0,765	0,706	0,706	0,882	0,941	0,882	0,765*	0,471	0,765	<b>0,775</b>
	<b>He</b>	0,929	0,740	0,680	0,853	0,806	0,920	0,888	0,933	0,465	0,806	<b>0,802</b>
<b>MT-01/2009</b>	<b>N</b>	17	18	18	18	18	18	18	18	17	18	<b>17,80</b>
	<b>Na</b>	20	7	4	9	7	12	12	19	6	9	<b>10,50</b>
	<b>Ho</b>	0,824	0,889	0,556	0,611	0,722	0,889	0,722	0,889	0,824	0,833	<b>0,776</b>
	<b>He</b>	0,927	0,759	0,674	0,815	0,724	0,878	0,870	0,931	0,751	0,813	<b>0,814</b>
<b>MT-11/2009</b>	<b>N</b>	19	17	19	19	19	19	18	19	19	19	<b>18,70</b>
	<b>Na</b>	19	9	4	10	7	20	10	17	5	7	<b>10,80</b>
	<b>Ho</b>	0,632*	0,882	0,316*	0,842	0,789	0,895	0,667	0,579*	0,526	0,632	<b>0,676</b>
	<b>He</b>	0,932	0,770	0,622	0,877	0,691	0,921	0,818	0,924	0,463	0,686	<b>0,770</b>
<b>MT-12/2009</b>	<b>N</b>	18	14	18	16	17	15	18	18	18	18	<b>17,00</b>
	<b>Na</b>	22	8	5	9	7	17	12	16	5	7	<b>10,80</b>
	<b>Ho</b>	0,833	0,571	0,389*	0,813	1,000	0,933	0,778	0,556*	0,611	0,667	<b>0,715</b>
	<b>He</b>	0,943	0,819	0,650	0,854	0,804	0,924	0,875	0,895	0,588	0,690	<b>0,804</b>

Figura 14. Gráfico de distribuição dos alelos entre as populações analisadas. Número médio de alelos por loco encontrados em cada população ( $N_a$ ); número médio de alelos privados por loco ( $N_{ap}$ );  $H_e$  e  $H_o$  referem-se às heterozigosidade esperada e observada, respectivamente. No eixo da ordenadas à esquerda temos os números de alelos e à direita, os valores de heterozigosidade. Abaixo estão as populações analisadas. Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.

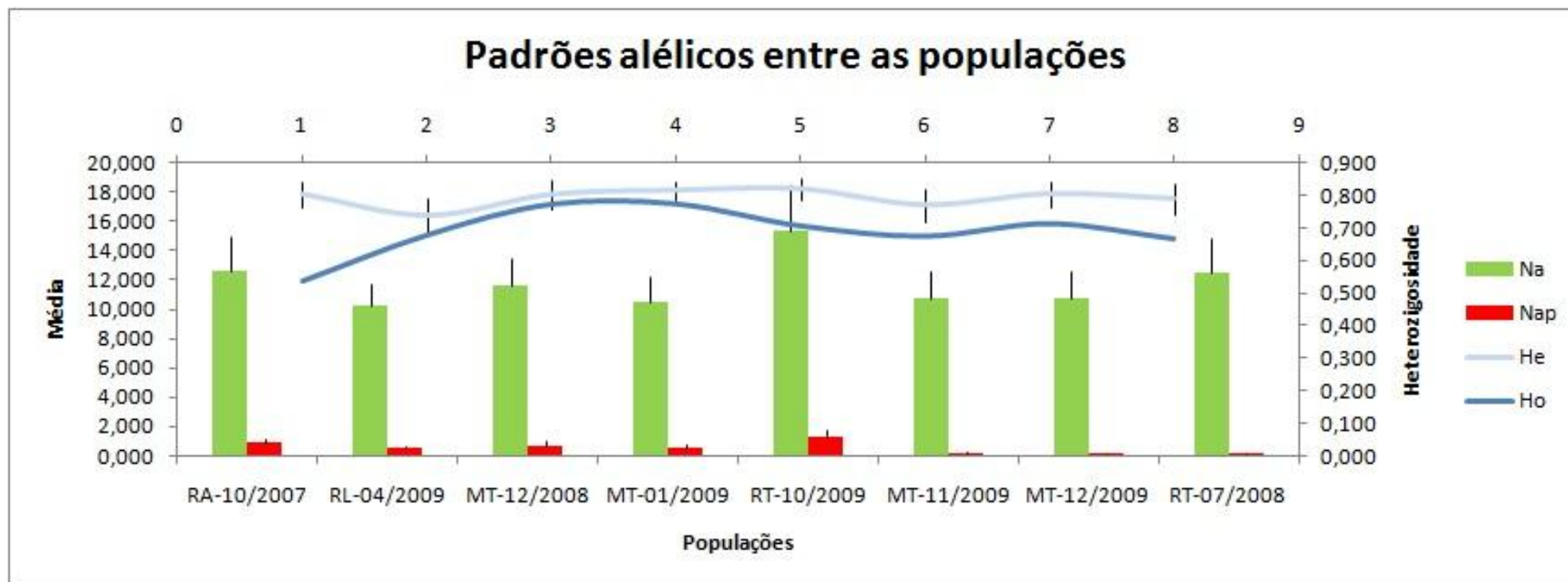


Tabela 13. Lista dos alelos privados com suas respectivas frequências em cada população amostrada

<b>Pop</b>	<b>Locus</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frequência</b>
RA-10/2007	SFRA02	248	0,014
	SFRA02	330	0,042
	SFRA03	206	0,014
	SFRA05	284	0,029
	SFRA10	252	0,029
	SFRA15	198	0,028
	SFRA15	232	0,014
	SFRA15	294	0,028
	SFRA18	116	0,014
RL-04/2009	SFRA03	210	0,045
	SFRA04	166	0,023
	SFRA10	208	0,022
	SFRA10	284	0,043
	SFRA13	248	0,022
MT-12/2008	SFRA02	238	0,033
	SFRA02	334	0,033
	SFRA02	352	0,033
	SFRA03	208	0,029
	SFRA05	290	0,029
	SFRA10	268	0,029
	BOM2	154	0,029
MT-01/2009	SFRA02	236	0,029
	SFRA02	356	0,029
	SFRA10	256	0,028
	SFRA10	272	0,111
	BOM2	172	0,028
RT-10/2009	SFRA02	210	0,012
	SFRA02	242	0,012
	SFRA02	260	0,012
	SFRA04	156	0,088
	SFRA04	162	0,013
	SFRA05	274	0,013
	SFRA05	292	0,025
	SFRA05	318	0,013
	SFRA05	344	0,013
	SFRA05	354	0,025
	SFRA10	280	0,037
	SFRA15	292	0,012
	SFRA15	296	0,012
MT-11/2009	SFRA03	178	0,029
	SFRA14	280	0,028
MT-12/2009	SFRA15	288	0,083
RT-07/2008	SFRA13	296	0,019

Tabela 14. Valores de diversidade gênica (DG), riquezas alélicas (RA) e Fis. \* refere-se a valores significativos de Fis (déficit de heterozigotos). Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.

<b>Pop</b>																
	<b>RA-10/2007</b>		<b>RT-07/2008</b>		<b>RL-04/2009</b>		<b>RT-10/2009</b>		<b>MT-12/2008</b>		<b>MT-01/2009</b>		<b>MT-11/2009</b>		<b>MT-12/2009</b>	
<b>Loci</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>	<b>DG</b>	<b>RA</b>
SFRA02	0,963	17.100	0,972	18.741	0,957	16.583	0,967	18.585	0,964	19.864	0,96	17.868	0,966	16.614	0,974	19.005
SFRA03	0,821	8.697	0,797	7.783	0,817	7.018	0,771	7.091	0,763	8.914	0,778	6.546	0,79	8.241	0,86	8.000
SFRA04	0,672	3.000	0,674	4.444	0,693	5.145	0,713	5.235	0,7	3.824	0,698	3.956	0,648	3.736	0,676	4.911
SFRA05	0,855	9.737	0,878	9.227	0,79	7.373	0,871	10.796	0,884	10.214	0,845	8.457	0,902	9.623	0,883	8.859
SFRA10	0,727	5.574	0,719	6.307	0,618	7.327	0,752	6.437	0,829	7.444	0,745	6.509	0,708	6.545	0,824	6.919
SFRA13	0,944	14.773	0,934	15.082	0,881	11.866	0,943	15.093	0,949	14.146	0,904	11.175	0,947	16.568	0,957	16.391
SFRA14	0,909	10.460	0,899	10.024	0,861	10.183	0,879	9.794	0,915	12.851	0,9	10.827	0,846	9.087	0,904	11.181
SFRA15	0,958	16.161	0,943	14.995	0,912	11.946	0,956	17.376	0,967	17.892	0,959	16.611	0,959	15.163	0,931	14.518
SFRA18	0,621	4.963	0,477	4.202	0,379	3.792	0,678	5.560	0,48	4.620	0,772	5.817	0,474	4.459	0,605	4.982
BOM2	0,691	5.274	0,772	6.753	0,682	5.959	0,77	7.320	0,833	7.470	0,837	8.109	0,706	6.542	0,711	6.289
<b>Média total</b>	<b>0,82</b>	<b>9,57</b>	<b>0,81</b>	<b>9,75</b>	<b>0,76</b>	<b>8,72</b>	<b>0,83</b>	<b>10,33</b>	<b>0,83</b>	<b>10,72</b>	<b>0,84</b>	<b>9,59</b>	<b>0,79</b>	<b>9,66</b>	<b>0,83</b>	<b>10,11</b>
<b>Fis</b>	<b>0.145*</b>		<b>0.171*</b>		<b>0.105*</b>		<b>0.147*</b>		<b>0.065</b>		<b>0.076</b>		<b>0.149*</b>		<b>0.141*</b>	

A possível presença de alelos nulos foi constatada para alguns locos em todas as populações. As frequências dos alelos nulos variaram de 3,54% (Sfra13, RA-10/2007) a valores superiores a 29% (Sfra14, RT-07/2008). A possibilidade de erros devido a *stutter* em locos dinucleotídeos apresentou-se significativa para os locos Sfra03, Sfra05, Sfra13, Sfra14 e BoM2. A tabela 15 integra os dados de heterozigosidade observada com a presença e a frequência de possíveis alelos nulos em cada população.

#### **4.4.2. Diferenciação Genética entre as Populações**

Os testes de diferenciação gênica e genotípica realizados com base nos genótipos estabelecidos para as diferentes populações mostraram valores significativos para 15 dos 28 testes realizados para diferenciação gênica e para 13 dos 28 testes realizados para diferenciação genotípica (tabela 16).

Os valores de  $F_{ST}$ , mesmo sendo baixos, mostraram uma possível divergência entre as populações residentes. Foram observados valores significantes de  $F_{ST}$  entre as populações RA-10/2007 x RL-04/2009 ( $F_{ST}=0,0474$ ,  $P= 0,00179$ ), RA-10/2007 x RT-10/2009 ( $F_{ST}=0,0092$ ,  $P=0,00179$ ), RA-10/2007 x RT-07/2008 ( $F_{ST}=0.0196$ ,  $P=0,00179$ ), RL-04/2009 x RT-10/2009 ( $F_{ST}=0,0321$ ,  $P=0.00179$ ) e RL-04/2009 x RT-07/2008 ( $F_{ST}=0,0279$ ,  $P=0,00179$ ). Entre as populações migradoras, no entanto, estes valores não foram significativos. Para os pares de populações residentes que evidenciaram divergência genética, ambos os testes de diferenciação gênica e genotípica também foram significativos. A tabela 17 mostra os valores de  $F_{ST}$  par a par para cada conjunto de populações.



Tabela 15. Heterozigosidade observada por loco (para maiores detalhes, ver tabela 11), possíveis freqüências de alelos nulos ( $A_n$ ) e possíveis presença de erros devido a *stutters*. \* indica presença de alelos nulos. † indicam déficit de heterozigotos. Residente (R); Migradora (M); região Topava (T); região Liso (L); região Acima da Barragem (A); 1=janeiro a 12=dezembro; 2007, 2008 e 2009 referem-se aos anos de coleta.

	RA-10/2007			RT-07/2008			RL-04/2009			RT-10/2009		
	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>
<b>Sfra02</b>	0,861	0,0446*	-	0,759 <sup>†</sup>	0,0987*	-	0,9	0,0162	-	0,732 <sup>†</sup>	0,1132*	-
<b>Sfra03</b>	0,694	0,0625*	-	0,538	0,1341*	sim	0,636	0,0881*	-	0,683	0,0439*	sim
<b>Sfra04</b>	0,486	0,105*	-	0,5	0,0957*	-	0,409 <sup>†</sup>	0,1565*	-	0,525 <sup>†</sup>	0,1039*	-
<b>Sfra05</b>	0,514 <sup>†</sup>	0,1759*	-	0,931	-0,036	-	0,957	-0,1016	-	0,825	0,0188	-
<b>Sfra10</b>	0,629	0,0505*	-	0,69	0,0094	-	0,478 <sup>†</sup>	0,0767*	-	0,707	0,0198	-
<b>Sfra13</b>	0,861	0,0354*	-	0,889	0,0143	-	1	-0,0725	-	0,659 <sup>†</sup>	0,1399*	sim
<b>Sfra14</b>	0,886	0,0052	-	0,320 <sup>†</sup>	0,294*	-	0,667	0,0901*	sim	0,829	0,0201	-
<b>Sfra15</b>	0,667 <sup>†</sup>	0,1412*	-	0,724 <sup>†</sup>	0,1036*	-	0,778 <sup>†</sup>	0,0557*	-	0,854 <sup>†</sup>	0,0461*	-
<b>Sfra18</b>	0,6	0,0073	-	0,517	-0,0328	-	0,304	0,0476*	-	0,561	0,0645*	-
<b>BoM2</b>	0,778	-0,0566	-	0,815	-0,032	-	0,667	-0,0007	-	0,707 <sup>†</sup>	0,0299*	-

	MT-12/2008			MT-01/2009			MT-11/2009			MT-12/2009		
	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>	Ho	Freq $A_n$	<i>Stutter</i>
<b>Sfra02</b>	0,867	0,0323	-	0,824	0,0539*	-	0,632 <sup>†</sup>	0,1556*	-	0,833	0,0564*	-
<b>Sfra03</b>	0,765	-0,0139	-	0,889	-0,0737	-	0,882	-0,0635	-	0,571	0,136*	-
<b>Sfra04</b>	0,706	-0,0154	-	0,556	0,071*	-	0,316 <sup>†</sup>	0,1887*	-	0,389 <sup>†</sup>	0,1581*	-
<b>Sfra05</b>	0,706	0,0794*	sim	0,611	0,1122*	-	0,842	0,0185	-	0,813	0,0221	-
<b>Sfra10</b>	0,882	-0,0421	-	0,722	0,0009	-	0,789	-0,0581	-	1	-0,1083	-
<b>Sfra13</b>	0,941	-0,0108	-	0,889	-0,0058	-	0,895	0,0137	-	0,933	-0,0046	-
<b>Sfra14</b>	0,882	0,0027	-	0,722	0,0792*	-	0,667	0,0832*	-	0,778	0,0519*	-
<b>Sfra15</b>	0,765 <sup>†</sup>	0,0868*	-	0,889	0,0216	-	0,579 <sup>†</sup>	0,1793*	-	0,556 <sup>†</sup>	0,1792*	-
<b>Sfra18</b>	0,471	-0,0035	-	0,824	-0,0415	-	0,526	-0,0436	-	0,611	-0,0146	-
<b>BoM2</b>	0,765	0,023	-	0,833	-0,0111	-	0,632	0,032*	sim	0,667	0,0137	-

Tabela 16. Valores de P obtidos para os testes de diferenciação gênica e genotípica entre os diferentes pares de populações de *S. brasiliensis*. \* Valores significativos após a correção sequencial de Bonferroni ( $\leq 0,05$ ).

		Diferenciação genotípica (P-value)	Diferenciação gênica (p-value)
MT-01/2009	e RT-07/2008	0,000098*	0,000001*
MT-01/2009	e MT-11/2009	0,095425	0,006732
MT-01/2009	e MT-12/2009	0,142016	0,042351
MT-01/2009	e RT-10/2009	0,677487	0,294796
MT-11/2009	e RT-07/2008	0,466408	0,051029
MT-11/2009	e MT-12/2009	0,667203	0,165787
MT-12/2008	e MT-01/2009	0,018046	0,003982
MT-12/2008	e MT-11/2009	0,169965	0,037165
MT-12/2008	e RT-10/2009	0,557283	0,158642
MT-12/2008	e RT-07/2008	0,689486	0,207382
MT-12/2008	e MT-12/2009	0,698301	0,380447
MT-12/2009	e RT-07/2008	0,570023	0,173826
RL-04/2009	e RT-10/2009	0*	0*
RL-04/2009	e RT-07/2008	0*	0*
RL-04/2009	e MT-12/2009	0,000045*	0*
RL-04/2009	e MT-11/2009	0,000217*	0*
RL-04/2009	e MT-12/2008	0,000319*	0,000004*
RL-04/2009	e MT-01/2009	0,000404*	0,000024*
RA-10/2007	e RL-04/2009	0*	0*
RA-10/2007	e RT-07/2008	0*	0*
RA-10/2007	e RT-10/2009	0,000005*	0*
RA-10/2007	e MT-01/2009	0,000147*	0*
RA-10/2007	e MT-12/2008	0,000267*	0,000001*
RA-10/2007	e MT-12/2009	0,001495*	0,000009*
RA-10/2007	e MT-11/2009	0,018943	0,000051*
RT-10/2009	e RT-07/2008	0,004993	0,000035*
RT-10/2009	e MT-12/2009	0,58425	0,155919
RT-10/2009	e MT-11/2009	0,666346	0,335999

Tabela 17. Valores de  $F_{ST}$  calculados par a par entre as populações. Na diagonal abaixo estão os valores de  $F_{ST}$  e diagonal acima, os valores de P (destaque). Os valores de  $F_{ST}$  significantes estão marcados com asterisco.

$P \leq 0,00179$  (correção seqüencial de Bonferroni)

Pop	RA-10/2007	RL-04/2009	MT-12/2008	MT-01/2009	RT-10/2009	MT-11/2009	MT-12/2009	RT-07/2008
RA-10/2007	-	0.00179*	0.00536	0.00893	0.00179*	0.04464	0.06786	0.00179*
RL-04/2009	0.0474	-	0.01429	0.01429	0.00179*	0.00893	0.00714	0.00179*
MT-12/2008	0.0139	0.0351	-	0.06250	0.82679	0.19286	0.58571	0.58929
MT-01/2009	0.0103	0.0307	0.0152	-	0.81250	0.06786	0.17321	0.00536
RT-10/2009	0.0092	0.0321	0.0032	0.0002	-	0.92500	0.15000	0.03393
MT-11/2009	0.0077	0.0230	0.0140	0.0132	-0.0012	-	0.57857	0.64643
MT-12/2009	0.0086	0.0301	0.0009	0.0076	-0.0019	-0.0035	-	0.20000
RT-07/2008	0.0196	0.0279	0.0025	0.0202	0.0055	-0.0023	-0.0032	-

Os valores de distância e identidade genética variaram de 0,0897 (RT-07/2008 x MT-11/2009) a 0,2736 (RA-10/2007 x RL-04/2009) e 0,7606 (RA-10/2007x RL-04/2009) a 0,9215 (RT-10/2009 x MT-11/2009), respectivamente (tabela 18).

Tabela 18. Distância (diagonal abaixo) e identidade genética de Nei (diagonal acima) entre as populações.

Pop	RA-10/2007	RL-04/2009	MT-12/2008	MT-01/2009	RT-10/2009	MT-11/2009	MT-12/2009	RT-07/2008
RA-10/2007	-	0.7606	0.8396	0.8538	0.8942	0.8844	0.8592	0.8470
RL-04/2009	0.2736	-	0.7818	0.7980	0.8179	0.8365	0.7966	0.8285
MT-12/2008	0.1748	0.2462	-	0.7984	0.8825	0.8292	0.8577	0.8825
MT-01/2009	0.1581	0.2256	0.2251	-	0.8955	0.8322	0.8272	0.8083
RT-10/2009	0.1119	0.2011	0.1250	0.1104	-	0.9215	0.9026	0.9055
MT-11/2009	0.1228	0.1785	0.1873	0.1837	0.0818	-	0.8930	0.9142
MT-12/2009	0.1518	0.2274	0.1535	0.1897	0.1025	0.1132	-	0.9024
RT-07/2008	0.1660	0.1881	0.1250	0.2128	0.0993	0.0897	0.1027	-

Os valores de  $D_{EST}$  calculados foram maiores que os de  $F_{ST}$ , reforçando a idéia de uma possível estruturação populacional (tabela 19). Os pares de populações com valores que foram significantes para  $F_{ST}$  foram 0,1866 (RA-10/2007 x RL-04/2009), 0,0394 (RT-10/2009 x RA-10/2007), 0,0805 (RL-04/2009 x RT-10/2009), 0,0952 (RA-10/2007 x RT-07/2008) e 0,0766 (RT-07/2008 x RL-04/2009). Estes novos valores reforçam ainda mais a possível diferenciação existente entre as populações residentes.

Tabela 19. Tabela com os valores de diferenciação real ( $D_{EST}$ ) estimados para os pares de populações residentes e migradoras. Os valores são estimados em um intervalo de confiança de 95%.

Pop	RA-10/2007	RL-04/2009	MT-12/2008	MT-01/2009	RT-10/2009	MT-11/2009	MT-12/2009	RT-07/2008
RA-10/2007	-	0,1866	0,0612	0,0592	0,0394	0,0492	0,0268	0,0952
RL-04/2009	-	-	0,1099	0,0790	0,0805	0,0501	0,0728	0,0766
MT-12/2008	-	-	-	0,0212	0,0008	0,0231	1,16e <sup>+6</sup>	0,0039
MT-01/2009	-	-	-	-	0,0026	0,0493	0,0087	0,0580
RT-10/2009	-	-	-	-	-	3,9e <sup>+6</sup>	0,0064	0,0105
MT-11/2009	-	-	-	-	-	-	0,0036	0,0008
MT-12/2009	-	-	-	-	-	-	-	0,0030
RT-07/2008	-	-	-	-	-	-	-	-

A análise de AMOVA realizada entre todas as populações (tabela 20) revelou que há pouca diferenciação entre as populações (1,40%) e que a maior variação está dentro das populações (98,6%). A segunda análise de AMOVA entre os grupos das populações residentes (RA-10/2007 e RL-04/2009) e as demais populações revelou que a maior parte da variação ainda continua dentro das populações (98,52%) e que somente 1,33% corresponde a variação entre os dois grupos (dados não mostrados).

Tabela 20. Análise AMOVA entre grupos residentes e migradoras. (g.l. significa graus de liberdade; Va é variação entre populações; Vb é variação dentro das populações).

Fonte da variação	g.l.	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Porcentagem da variação
Entre populações	7	41.106	0.04907 Va	1.40
Dentro das populações	394	1358.483	3.44793 Vb	98.60
TOTAL	401	1399.590	3.49985	

Fixation Index FST : 0.01403  
 Significance tests (20022 permutations)  
 Va and FST : P(rand. value > obs. value) = 0.00000  
 P(rand. value = obs. value) = 0.00000  
 P-value = 0.00000+0.00000

A análise Bayesiana que considera todos os genótipos sem informação de origem dos mesmos, revelou em um primeiro momento a presença de oito populações ( $K=8$ ,  $Pr [X/K]=1$ ) de *S. brasiliensis* na região amostrada, conforme apresentado na tabela 21. No entanto, o teste de atribuição não apontou uma separação clara entre tais populações (figura15), sugerindo haver quatro blocos mais ou menos definidos que poderiam compor populações diferenciadas (figura 16). Com base nestes resultados foi feita a correção de Evanno et al. (2005), que apontou para a existência de apenas duas possíveis populações (figura 17).

Tabela 21. Valores de probabilidade,  $Pr(X/K)$ , para cada um dos possíveis modelos populacionais ( $K=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9$  e  $10$  populações) obtidos através do programa Structure 2.3.1. (*burn-in*=30.000, 200.000 réplicas).

K	Média dos valores de ln das probabilidades de K	$Pr(X/K)$
1	-8936,81	8,0458E-103
2	-8864,73	1,62181E-71
3	-8929,37	1,3715E-99
4	-8821,51	9,55448E-53
5	-8807,94	7,47452E-47
6	-8890,05	1,63555E-82
7	-8746,9	2,41501E-20
8	-8701,73	1
9	-8763,85	1,05106E-27
10	-8816,11	2,11542E-50

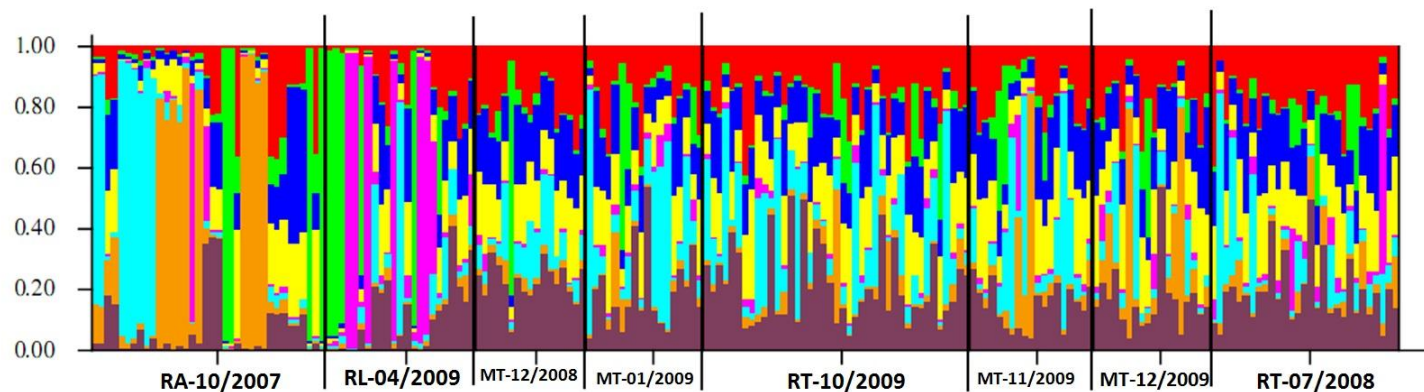


Figura 15. Teste de atribuição de todas as populações para  $K=8$ . Note a presença de grupos populacionais presentes em RA-10/2007 e RL-04/2009. Cada cor indica um grupo diferente e cada barra indica um indivíduo. Ao lado, está indicada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada grupo.

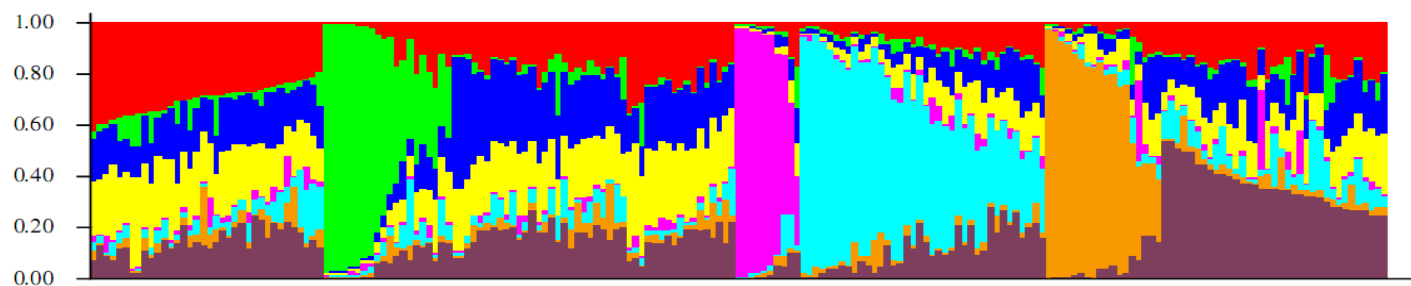
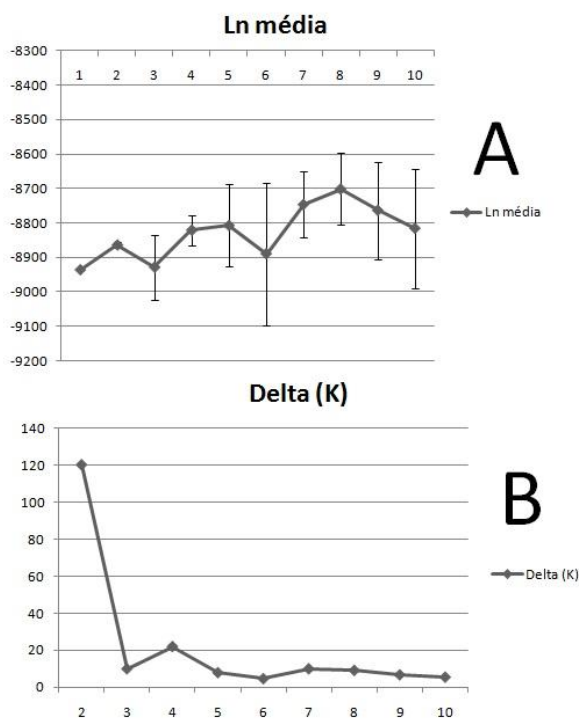


Figura 16. Teste de atribuição das populações ( $K=8$ ) ordenadas por suas probabilidades de pertencer a cada grupo. Desse modo, podemos ver a presença de quatro grupos mais definidos. Repare que estes grupos estão, em sua maioria, presentes nas duas populações residentes (RA-10/2007 e RL-04/2009). As mesmas características da figura anterior foram mantidas.



Apesar da divisão populacional e os resultados obtidos dos valores das probabilidades e do delta (K) não estarem claros, pudemos verificar que entre as populações RA-10/2007 e RL-04/2009 são as que apresentaram a maior parte dessa diferenciação (grupos definidos com cores distintas). Entre as outras populações há uma mistura de cores, indicando grupos com semelhantes probabilidades de ocorrência. Deste modo, corridas independentes foram realizadas dentro das populações RA-10/2007 e RL-04/2009.

Quando realizamos novas análises dentro dos dois grupos sugeridos, após correção de Evanno et al. (2005), encontramos a presença de quatro possíveis populações dentro de RA-10/2007 e três possíveis populações dentro de RL-04/2009 (Figura 18).

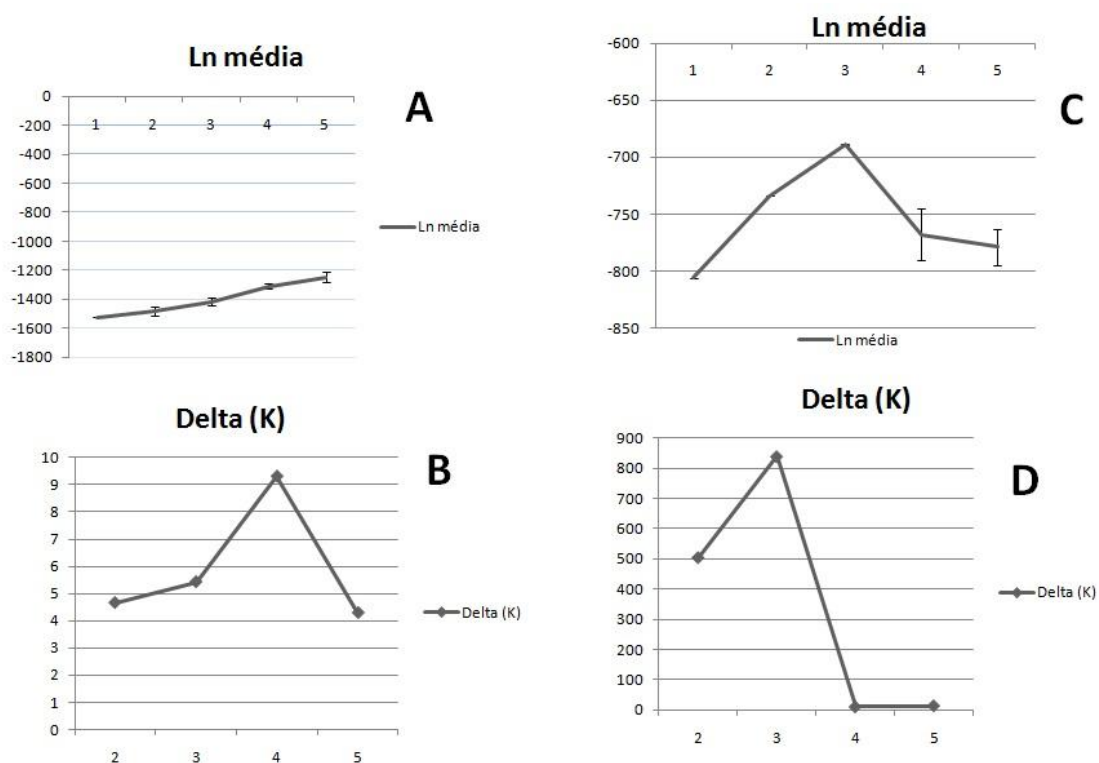


Figura 18. Valores de Ln das probabilidades e correção de Evanno et al. (2005) para cada K testado nas populações RA-10/2007 (A e B) e RL-04/2009 (C e D). O desvio padrão para cada K testado está representado na forma de uma barra vertical.

A partir dos dados da correção de Evanno et al. (2005), o teste de atribuição para cada população demonstrou limites claros de diferenciação dentro de tais populações (K=4 para RA-10/2007, figura 19 e K=3 para RL-04/2009, figura 20). Note, no entanto, que as cores foram utilizadas somente para designar diferentes grupos e que assim, cada cor não corresponde aos mesmos grupos em cada uma das populações, pois tratam-se de indivíduos diferentes e corridas independentes.



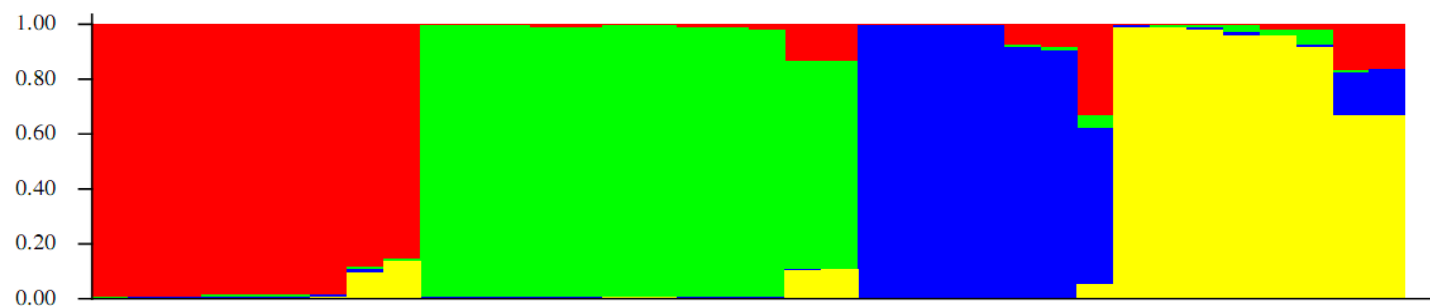


Figura 19. Teste de atribuição realizado somente para a população RA-10/2007, com  $K=4$ . Cada cor indica um grupo diferente e cada barra indica um indivíduo. Ao lado, está indicada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada grupo.

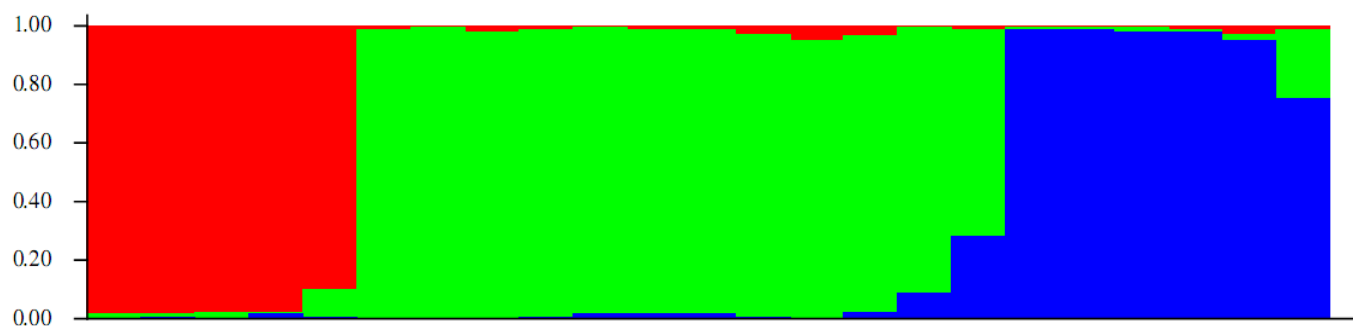


Figura 20. Teste de atribuição realizado somente para a população RL-04/2009. Cada cor indica um grupo diferente e cada barra indica um indivíduo. Ao lado, está indicada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a cada grupo.

Para as outras populações residentes (RT-07/2008 e RT-10/2009), estes mesmo testes não foram significativos, ou seja, não foi observada nenhuma sub-estruturação populacional.

Testes excluindo-se a presença destas duas populações (RA-10/2007 e RL-04/2009) também foram executados para a verificação da confiança destas informações, ou seja, se estaria ocorrendo estruturação apenas nestas duas populações residentes, ou se poderia existir estruturação entre outras populações. Como resultado, verificou-se que possivelmente não existe nenhum tipo de estruturação ou sub-estruturação nas demais populações como encontrado para RA-10/2007 e RL-04/2009. A tabela 22 aponta os valores das probabilidades e a figura 21 os gráficos dos valores de Ln das probabilidades, bem como o gráfico dos valores de delta (K). O resultado do teste de atribuição pode ser visualizado na figura 22.

Tabela 22. Valores das probabilidades [Pr (X/K)] dos testes com os modelos populacionais K=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 para as populações excluindo-se RA-10/2007 e RL-04/2009 das análises.

K	Ln	Pr (X/K)
1	-6323,46	1
2	-6586,1	8,6476E-115
3	-7305,84	0
4	-6669,72	4,1802E-151
5	-6931,3	1,0434E-264
6	-7006,78	1,7294E-297
7	-7095,26	0
8	-7237,4	0

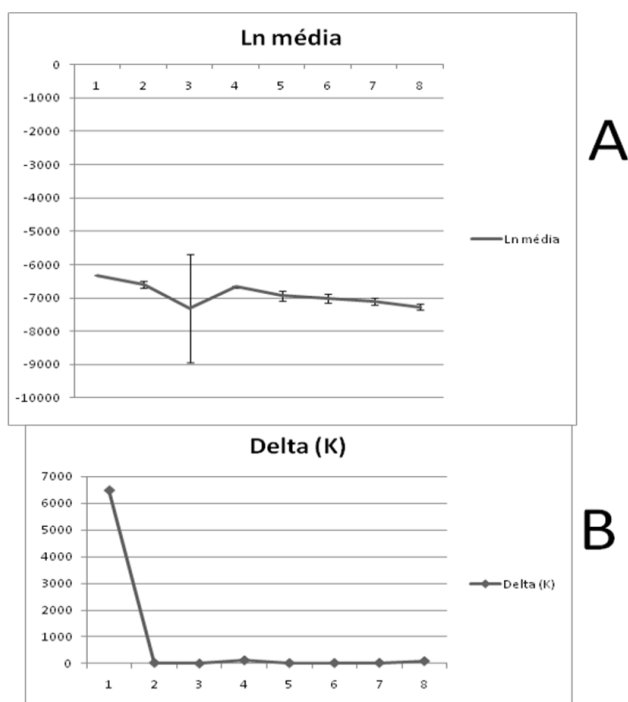


Figura 21. (A) Gráfico dos valores de Ln das probabilidades de K. À esquerda estão os valores de Ln (K) e acima os valores de K. (B) Gráfico dos valores de delta (K). À esquerda estão os valores de delta (K) e abaixo, os diferentes K testados. O desvio padrão para cada K testado está representado na forma de uma barra vertical.

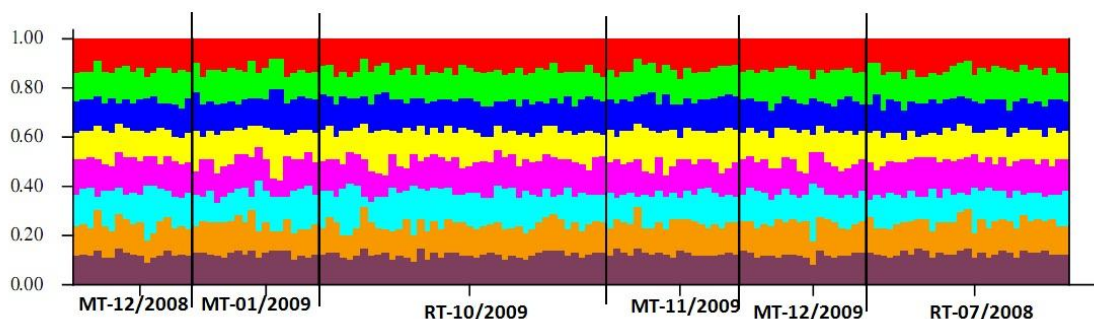


Figura 22. Resultado do teste de atribuição sem as populações RA-10/2007 e RL-04/2009. Note que a probabilidade de cada indivíduo (representado por uma barra vertical) estar presente em cada uma das K=8 possíveis populações é semelhante para todas, ou seja, todos os indivíduos têm semelhantes probabilidades de estarem presentes em qualquer uma das K=8 populações.

Após verificação de possível subdivisão populacional, novos testes com a divisão destas sub-populações confirmaram a presença de quatro possíveis grupos em RA-10/2007 e apenas dois em RL-04/2009 (figura 23).

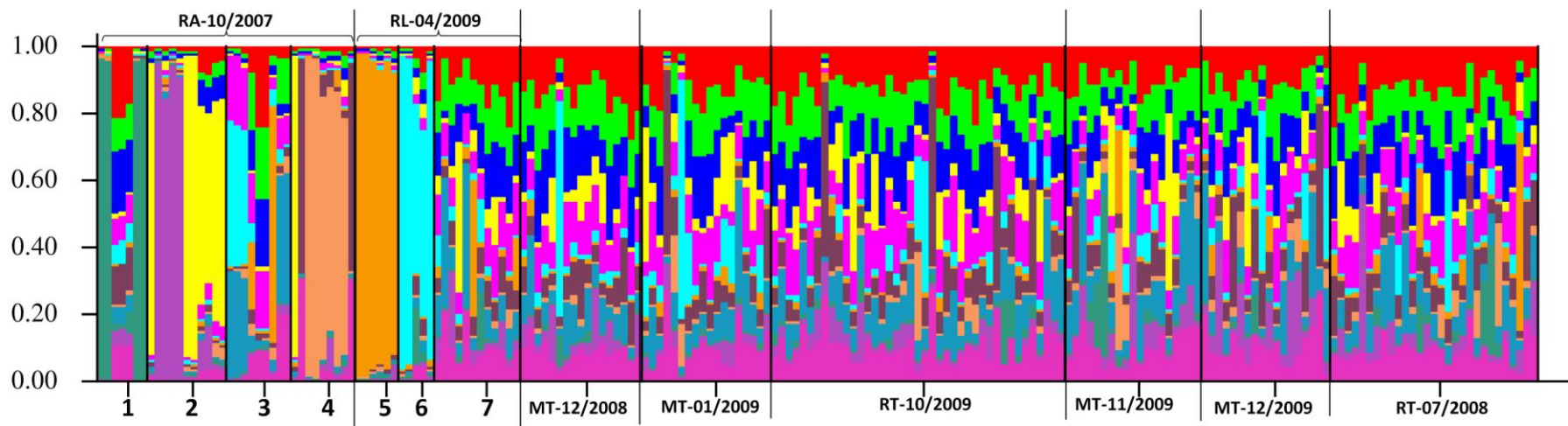


Figura 23. Testes com cada possível sub-população dentro de RA-10/2007 e RL-04/2009, com  $K=13$ . Os números de 1 a 4 indicam cada sub-população dentro de RA-10/2007 e os números de 5 a 7 as sub-populações dentro de RL-04/2009. Note que há formação de grupos dentro de cada uma dessas populações subdivididas e para o restante das populações, esta subdivisão não é definida.

# ***DISCUSSÃO***

## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Transferabilidade de Locos Microsatélites**

Transferabilidade de locos microsatélites tem sido avaliada em muitas espécies, sendo observadas altas taxas tanto em grupos animais quanto vegetais, e em especial em plantas fanerógamas. O grau de transferabilidade desses locos, no entanto, costuma ser maior entre organismos relacionados, sendo que quanto maior a distância filogenética entre as espécies analisadas, mais reduzidos tendem a ser estes valores (Barbará et al. 2007).

Em peixes, estudos de transferabilidade de locos microsatélites realizados para várias espécies, ainda na década de 90, demonstraram resultados bastante satisfatórios. Rico et al. (1996) avaliando a transferabilidade de locos microsatélites entre espécies de diferentes gêneros, ordens e até classes (Agnatha até Osteichthyes), evidenciaram uma conservação das regiões flaqueadoras dos locos microsatélites analisados entre grupos com mais de 470 milhões de anos de divergência. Uma possível hipótese para explicação desta alta conservação das regiões flaqueadoras pode ser de que estas regiões sejam de regiões codificantes do genoma, mas, no entanto, as taxas de mutação de sequências flaqueadoras em regiões gênicas possuem taxas de substituição próximas à de regiões intrônicas, ou seja, as taxas de evolução são semelhantes entre regiões gênicas e não codantes no genoma (Brohede e Ellegren, 1999).

Estudos mais recentes também têm demonstrado grande sucesso na transferabilidade de locos SSRs entre espécies congêneres ou mesmo pertencentes a gêneros diferentes. Mäkinen et al. (2007), utilizando conjuntos

de *primers* desenvolvidos especificamente para o genoma de *Gasterosteus aculeatus* (“three-spined stickleback”), revelou a transferabilidade de aproximadamente 32% (18 de 57 no total) locos microssatélites para a espécie *Pungitius pungitius* (“nine-spined stickleback”). No entanto, apenas 19% (11) do total de locos testados demonstraram-se polimórficos quando testados populacionalmente, sendo assim, úteis para análises genético-populacionais.

No presente estudo, a taxa de transferabilidade observada para gêneros diferentes foi de aproximadamente 54% (locos de *Brycon*), sendo que dos 13 locos testados, sete apresentaram padrões de amplificação satisfatórios na espécie *S. brasiliensis*. Os demais locos (6) não amplificaram ou apresentaram ampliações de muitos fragmentos inespecíficos, inviabilizando o processo de genotipagem dos alelos e conseqüentemente as análises estatísticas populacionais. Dos quatro locos com padrões de amplificação satisfatório, apenas BoM2 foi avaliado quanto ao seu grau de polimorfismo. O maior sucesso de transferabilidade, considerando-se o total de locos de *Brycon* testados foi para *B. opalinus*, com 23% (3) de locos amplificados possivelmente úteis para análises populacionais em *S. brasiliensis*. Para *B. hilarii*, este valor correspondeu a apenas 7,6% (1).

Apesar do estudo de Calcagnotto et al. (2005) agrupar *S. brasiliensis* e *B. hilarii* como espécies altamente relacionadas (espécies irmãs, com altos valores de *bootstrap*), muitos locos dessa espécie produziram um alto número de bandas inespecíficas, reduzindo o número de marcadores eficientes para utilização em *S. brasiliensis*. Análises posteriores de otimização das reações de amplificação desses locos poderiam confirmar o real potencial de uso destes marcadores. Entretanto, neste estudo optamos por concentrar maiores

esforços na transferabilidade de locos de *S. franciscanus*, já que estes foram disponibilizados durante o decorrer do desenvolvimento do presente trabalho.

As taxas de transferabilidade dos locos microssatélites entre as espécies congêneres *S. brasiliensis* e *S. franciscanus* foi de 87,5%, sendo que dos 16 locos de *S. franciscanus* amplificados satisfatoriamente em *S. brasiliensis*, nove deles apresentaram-se polimórficos, correspondendo a uma eficiência de validação de 65% para esses locos. Os outros dois locos restantes amplificaram, mas apresentaram bandas inespecíficas e foram descartados. Para os locos de *Brycon*, não houve avaliação do grau de polimorfismo dos mesmos, não sendo possível mensurar a eficiência de validação destes, com exceção do loco BoM2, o qual foi utilizado nas análises populacionais e evidenciou um total de 10 alelos e valores médios de heterozigosidade observada de 0,61 para o conjunto de populações aqui analisado. Comparando estes valores com aqueles obtidos pelos autores que descreveram este loco, observa-se um menor número de alelos, os quais foram relatados como sendo de 31 alelos, mas um maior valor médio de heterozigosidade observada (0,43) em populações de *Brycon* com número amostral igual a 94. Relatos de déficit nos números de alelos para locos heterólogos parecem ser comuns, apesar de haver exceções.

Yue e Orban (2010) também encontraram um déficit no número de alelos observado para 10 locos polimórficos da espécie *Poecilia reticulata*. Em comparação, em espécies de gêneros diferentes, a média de alelos por loco caiu de 4,9 na espécie de origem para 4,1 na espécie testada. Além disso, o número de locos polimórficos também foi menor (90%, nove locos). Em tainhas, a taxa de transferabilidade de locos microssatélites entre espécies



congêneres foi de 100%. A maioria dos locos testados (60%) demonstrou um déficit acentuado no número de alelos observado, no entanto, os demais locos demonstraram número de alelos superior ao observado na espécie para a qual os *primers* haviam sido originalmente desenhados (Galaraza et al., 2007).

Para peixes brasileiros da ordem dos Siluriformes, Rodrigues et al. (2009) testando a transferabilidade de 15 locos microssatélites entre espécies congêneres de *Brachyplatystoma*, verificou que esta taxa de amplificação variou de 80% (12) até 93% (14). Dentro de Characiformes, estudos de transferabilidade também demonstram grande potencial de utilização de locos heterólogos. Na família Serrasalminidae, 14 locos de tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram testados em piranha (*Pygocentrus nattereri*), pacu (*Mylossoma aureum*) e pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) apresentando taxas de transferabilidade próximas a 57%, 72% e 65%, respectivamente. Além disso, praticamente todos os locos foram polimórficos, evidenciando excelentes taxas de validação populacional. Apenas um dos locos testados não evidenciou polimorfismo em *P. brachypomus*, provavelmente, devido seu reduzido número amostral (N=4) (Santos et al., 2009).

Estudos em *Leporinus macrocephalus* (família Anostomidae) também sugeriram grande sucesso de amplificação cruzada em espécies do mesmo gênero. De um total de oito locos testados, todos apresentaram polimorfismo. Ao comparar estes resultados com os de uma espécie pertencente a outra família (*Cyphocharax modesta*, Curimatidae), o número de locos amplificados diminuiu drasticamente, sendo observado apenas um loco polimórfico (Morelli et al., 2007a).

Dentro da família Characidae, Sanches e Galetti (2006) testaram a transferabilidade de sete locos de *Brycon hilarii* em cinco outras espécies do mesmo gênero e conseguiram cerca de 60% (quatro locos) de amplificação satisfatória em uma das espécies analisadas (*B. falcatus*). Para *B. cephalus* estes valores atingiram 100%, com aproximadamente 72% dos locos polimórficos. Em outro estudo com *Brycon*, estes valores foram ainda maiores, sendo observada uma taxa de 100% de transferabilidade entre todas as espécies testadas, com um mínimo de 57% de locos polimórficos (Barroso et al., 2003). Matsumoto e Hilsdorf (2009) também testaram sete locos de *Brycon* (quatro de *B. opalinus* e três de *B. cephalus*) em *B. insignis* e os resultados demonstram mais de 70% (5) de transferabilidade com todos os locos polimórficos.

Barbará et al. (2007) relataram que em peixes os valores de transferabilidade, em geral, correspondem a aproximadamente 70% de transferabilidade entre espécies relacionadas, 60% entre gêneros dentro de uma mesma família, e cerca de 20% entre ordens relacionadas. Em relação aos locos heterólogos que são polimórficos, estes valores ficam em torno de 70% entre espécies do mesmo gênero, caindo para cerca de 50% entre gêneros dentro de uma mesma família.

Se levarmos em consideração que no presente trabalho, 54% dos locos de *Brycon* amplificaram em *Salminus* e que 65% dos locos de *S. franciscanus* foram polimórficos em *S. brasiliensis*, estes dados parecem estar de acordo com outros estudos populacionais similares realizados em peixes. Desta forma os valores obtidos no presente trabalho parecem corroborar os dados que têm sido relatados na literatura para diferentes grupos de peixes. Portanto, os locos

heterólogos avaliados aqui se mostram úteis para serem utilizados para as análises genético-populacionais de *S. brasiliensis* propostas neste estudo.

## **5.2. Caracterização da Estrutura Populacional de *S. brasiliensis***

Os altos valores de heterozigosidade observada (1,00, como observado para Sfra10 em MT-12/2009), além do alto número de alelos observado, demonstram uma grande variabilidade genética para as populações de dourado aqui analisadas. Estes resultados ficam também bem explicitados quando se considera os índices de diversidade gênica e riqueza alélica observados para toda a amostragem, onde alguns locos, como o Sfra02, não atingiram valores menores que 0,95 em todas as amostragens, evidenciando um valor médio de 0,81 para todas as populações amostradas. No entanto, estes valores de diversidade gênica e riqueza alélica não foram significativamente diferentes entre as populações, sugerindo então, a princípio, que estas populações possuem níveis de variação genética equivalentes.

Segundo Laikre et al. (2005), altos valores de variação genética obtidos para diferentes populações refletem a variabilidade genética total de uma espécie, variação esta, essencial para permitir diferentes mecanismos de adaptação frente às possíveis mudanças ambientais.

O número de alelos por loco é bastante variável em peixes. Na truta, *Oncorhynchus mykiss*, altos números de alelos para locos microssatélites (147 alelos para seis locos, com média de 24,5 alelos por loco) e riqueza alélica de 14,5 já foram relatados (Narum et al., 2004). Em espécies neotropicais, como *Brycon opalinus*, Barroso et al. (2005) encontraram um total de 162 alelos (para

sete locos), sendo observados de 12 a 31 alelos por loco e média de 23,1 alelos por loco.

Em *Prochilodus argenteus* o valor médio de alelos por loco foi 12,4 (Hatanaka et al., 2006), enquanto Sanches (2007) encontrou apenas 57 alelos (para sete locos), com média de 5,91 alelos por loco na espécie *B. hilarii*. Outro estudo realizado em *Piaractus mesopotamicus*, evidenciou um total de 68 alelos, para oito locos, com média de 8,5 alelos por loco (Calcagnotto e DeSalle, 2009). Deste modo, o número médio de alelos por loco encontrado no presente trabalho (21) parece ser comparável aos valores encontrados para outras espécies de peixes em estudos similares.

Desvios do EHW foram encontrados em 80% (8) dos locos analisados, com déficit significativo de heterozigotos em algumas das amostragens (com exceção dos locos Sfra03 e Sfra18). Déficits de heterozigotos também têm sido comumente relatados em estudos com populações naturais e diversos fatores podem explicar estes déficits, incluindo o efeito de Wahlund, a presença de alelos nulos e alelos *drop-out*, erros de genotipagem e erros amostrais, além de acasalamento não-aleatório (Broughton et al., 2002; Narum et al., 2004; Barroso et al., 2005; Balding, 2006; Hatanaka et al., 2006; Chapuis e Estoup, 2007; Calcagnotto e DeSalle, 2009; Morin et al. 2009).

O efeito de Wahlund diz respeito sobre a frequência de homozigotos em populações subdivididas, ou seja, quando duas ou mais populações são fusionadas em uma amostragem, o número de homozigotos tende a ser maior que o número de heterozigotos nesta nova população (uma amostragem é tida como uma única população, mas na verdade ela pode conter várias populações). Deste modo, desvios no EHW com déficits de heterozigotos

podem ser indicativos deste efeito e sugerirem uma possível subdivisão populacional na amostragem (Ridley, 2006).

No presente trabalho, o déficit de heterozigotos observado para maioria dos locos analisados pode estar relacionado com alguns desses fatores, incluindo preferencialmente um possível efeito de Wahlund (como evidenciado através de uma possível sub-estruturação nas populações residentes RT-10/2007 e RL-04/2009). A alta diversidade alélica também pode ter contribuído para desvios na relação entre o número de heterozigotos observado e esperado, uma vez que dependendo dos indivíduos amostrados, estes podem não representar a totalidade de genótipos possíveis para aquele grande conjunto de alelos detectados na amostra (Freitas, comunicação pessoal).

Se considerarmos também a presença de alelos nulos como forte indicativo destes desvios, principalmente nas populações RA-10/2007 e RL-04/2009, que apresentaram valores de frequências para presença destes alelos relativamente altos em alguns locos (como para Sfra04, 18.87%, MT-11/2009; 29,4% para Sfra14, RT-07/2008), um novo fator é adicionado a este cenário. Segundo Calcagnotto e DeSalle (2009), valores semelhantes de frequências de alelos nulos (15.45%) foram encontrados em pacu (*P. mesopotamicus*) para alguns dos locos utilizados, estando estes, possivelmente, relacionados aos desvios observados no EHW. Barroso et al. (2005) também encontraram valores altos de alelos nulos (1.44% a 14.4%) em *B. opalinus*.

O conceito de alelo nulo, foi primeiramente introduzido por Callen et al. (1993), quando estes demonstraram que uma deleção de 8pb em um sítio de ligação de *primers* microssatélites era a responsável pela não amplificação de

marcadores com repetições (AC)<sub>n</sub>, implicando em exclusão de paternidade em humanos, uma vez que não seria possível a identificação de um dos alelos.

Na genética de populações a presença de alelos nulos tem sido comumente relatada e pode interferir em estimativas de variabilidade genética e distâncias genéticas, além de outras inferências sobre a estrutura genética de populações (Falush et al., 2003; Chapuis e Estoup, 2007).

Apesar de desvios no EHW serem comumente atribuídos à presença de alelos nulos, erros de genotipagem associados à presença de alelos *drop-out* (amplificação preferencial de alelos com menor tamanho), decorrentes de baixa qualidade de reagentes, equipamentos mal calibrados (desde pipetas até seqüenciadores) e/ou fatores humanos, como erros de dupla entrada de genótipos de diferentes indivíduos no banco de dados, contagem diferente de alelos por diferentes pesquisadores, contaminação ou mistura de amostras, são bastante comuns, tendo sido relatados mais recentemente (Pompanon et al., 2005).

Dentre os diversos fatores que ocasionam tais erros, o que parece ter maior representação são os erros humanos (Pompanon et al., 2005). Hoffman et al. (2006) relataram que discrepâncias entre genotipagens realizadas por diferentes laboratórios ocorrem em aproximadamente 20% dos casos.

Em análises utilizando DNA extraído de fezes de animais, por exemplo, estes erros são comumente relatados (Fernando et al., 2003; Bonin et al., 2004; Prugh et al., 2005). Em geral, costumam-se atribuir estes erros à baixa qualidade (degradação), quantidade e contaminação das amostras de DNA obtidas nestes estudos (Broquet et al., 2007). Broquet e Petit (2004) em uma revisão relativamente recente mostraram que estudos de DNA baseados em

amostras de fezes ou pêlos podem apresentar altas taxas de identificação de falsos alelos (15,3%) e alelos *drop-out* (31,3%).

No entanto, erros de genotipagem podem também ocorrer em estudos que utilizam amostras de excelente qualidade e quantidade de DNA (Bonin et al., 2004; Morin et al., 2009). Estudos realizados em urso e sapo, baseados em análises de microssatélites e AFLP, respectivamente, evidenciaram taxas de erros de genotipagem estimadas em 0,8% para alelos de locos microssatélites e de 3,4% para AFLP (Bonin et al., 2004).

No presente trabalho, análises similares evidenciaram estimativas de erros por alelo próximo a 2,4% e de erro por loco próximo a 1,6%. Estes valores são menores que aqueles reportados para baleias por Morin et al. (2009), que evidenciaram uma taxa de 2,8% de erro por alelo e parecem ser aceitos dentro da abordagem proposta.

Para alguns autores estes erros de genotipagem parecem ter pouco efeito para genética de populações quando comparados a estudos que incluem identificação individual (Bonin et al., 2004; Hoffman e Amos, 2005; Pompanon et al., 2005). Um exemplo disso é o apontado para a planta *Betula nana*, em um estudo onde dois pesquisadores analisaram o mesmo conjunto de dados com marcadores AFLP, obtendo apenas 38% de genótipos iguais entre eles. Neste estudo, no entanto, as mesmas conclusões biológicas de diferenciação populacional foram obtidas (Bonin et al., 2004).

Já Morin et al. (2009) relatam que estes erros em grande escala poderiam alterar as freqüências alélicas e as estimativas de  $F_{ST}$  como, por exemplo, a de Weir e Cockerham (1984), que é baseada em distribuições de freqüências alélicas para estimativa de diferenciação, refletindo assim em

valores distorcidos de  $F_{ST}$ . Entretanto, é sabido que a presença de alelos nulos também influencia nas estimativas de  $F_{ST}$ , onde superestimções de tais valores e de distância genética já foram evidenciadas em estudos de diferenciação populacional (Chapuis e Estoup, 2007).

No presente trabalho, os erros de genotipagem aqui encontrados são muito baixos e não parecem influenciar nas análises estatísticas. Por outro lado, a presença de alelos nulos e *stutters* observada para alguns locos em algumas populações, além de um possível efeito de Wahlund, parecem ser os principais responsáveis pelos desvios observados no EHW.

Apesar dessas considerações, fatores relacionados especificamente com as populações também podem contribuir efetivamente para desvios na relação de equilíbrio das freqüências genotípicas de uma população. São exemplos: (i) a redução do número de peixes devido à sobre-pesca, (ii) a presença massiva de barragens na região do Alto Paraná, (iii) as técnicas de repovoamento de rios a partir de estoques provenientes da aquicultura (Calcagnotto e DeSalle, 2009) e (iv) o grande número de alelos observados em alguns locos, como o Sfra02 (48 alelos) em populações com tamanho amostral reduzido (24 alelos identificados em 36 indivíduos, RA-10/2009), por exemplo. Entretanto, identificar com precisão a fonte responsável pelos desvios observados é uma tarefa difícil, uma vez que vários fatores podem estar atuando conjuntamente.



### 5.3. Diferenciação Genética entre Populações

Estudos de diferenciação populacional em peixes vêm sendo realizados para a identificação e manejo de diferentes *pools* genéticos. Segundo Laikre et al. (2005), a diferenciação populacional pode ocorrer sob diferentes formas (desde populações geneticamente distintas até populações panmíticas) e deste modo, a unidade básica de conservação seria representada por um grupo geneticamente homogêneo de indivíduos, como por exemplo, a existência de diferentes populações locais.

No presente estudo, os valores de diferenciação gênica e genotípica, baseados nas frequências alélicas e genotípicas observadas, indicaram uma possível diferenciação genética existente nas populações analisadas. A partir dessa indicação de diferenciação, os valores de  $F_{ST}$  encontrados entre pares de populações variaram de -0.0035 (MT-12/2009 x MT-11/2009) a 0.0474 (RA-10/2007 x RL-04/2009, valor significativo após correção seqüencial de Bonferroni  $p \leq 0.05$ ). Além do par RA-10/2007 x RL-04/2009, estes valores foram significantes para mais quatro pares de populações, sendo que todas estavam fora do período reprodutivo.

Deste modo, baseado nos testes de diferenciação gênica, genotípica e  $F_{ST}$ , parece existir uma pequena diferenciação entre indivíduos coletados fora da época reprodutiva, o que não foi verificado para populações coletadas durante a época reprodutiva, nas quais foram observados valores de  $F_{ST}$  não significantes, sugerindo ausência de estruturação.

Os valores de  $D_{EST}$  reforçam os dados obtidos pela estatística  $F$ , demonstrando haver ainda mais diferenciação do que apontado pelo valo de

$F_{ST}$ . Esta abordagem ainda é muito recente, mas parece estar sendo aceita com a idéia de melhor mensurar a variação existente em locos mais variáveis que as alozimas, com taxas superiores de mutação, como os microssatélites, por exemplo. Davis et al. (2010) estudando abelhas de hábito solitário (*Colletes floralis*) identificaram altas diferenciações genéticas entre as populações estudadas com apenas nove locos microssatélites, evidenciando valores significativos de  $F_{ST}$  variando de 0,032 até 0,53, enquanto que a estatística proposta por Jost (2008),  $D_{EST}$ , apontou valores variando de 0,016 até 1,00, ou seja, com completa diferenciação entre as populações analisadas.

Além disso, as análises de AMOVA demonstram que entre as populações há pouca variação (1,40%) e que entre todos os testes realizados também não há grande variação de acordo com a formação dos grupos. Mesmo mantendo-se apenas um grupo formado entre as populações residentes (RA-10/2007 e RL-04/2009) e as demais populações formando outro grupo, os valores pouco se modificam e desse modo, há pouca variação entre os dois grupos (1,33%), sugerindo apenas uma pequena diferenciação entre eles. Isto nos reforça a idéia de que a maior parte da variação encontra-se nessas duas populações e que as demais realmente formam um grupo não estruturado, como sugerido pelo Structure.

O número de alelos privados permaneceu baixo em quase todas as populações analisadas, variando de 0,005% a 0,061% do total de número de alelos considerados. A média geral das freqüências de tais alelos foi de 2,9% nas populações analisadas, porém freqüências de até 11% também foram encontradas (Sfra10, população MT-01/2009, alelo 272 - tabela 13). Estes alelos podem ser considerados raros para esta amostragem, mas somente

poderiam ser confirmados sob esta condição se ampliado o número amostral, como sugerido por Barroso et al. (2005). Portanto, com os valores das freqüências de alelos privados sendo muito baixos (0,012%, Sfra02 alelo 210, na população RT-10/2009), os efeitos destes sob a diferenciação populacional podem ser diminuídos, uma vez que a representatividade deles nas populações é muito pequena (Sfra15, alelo 296 com freqüência 0,012% corresponde a apenas um alelo amostrado na população RT-10/2009 entre 31 possíveis, por exemplo). No entanto, a presença destes alelos na amostragem não pode ser descartada como indicativa de uma possível diferenciação entre as populações.

Estudos populacionais realizados em *Salmo trutta* utilizando 15 locos microsatélites não evidenciaram diferenças significativas entre populações residentes e anadrômicas durante o período reprodutivo, a despeito destes peixes co-existirem em uma mesma bacia e apresentarem diferenças morfológicas e ecológicas, com tamanhos e locais de desova preferencialmente distintos (Charles et al., 2005). Estudos realizados em *Salvelinus alpinus* (Westgaard et al. 2004) e *Oncorhynchus mykiss* (Narum et al., 2004), no entanto, evidenciaram, respectivamente, diferenças significativas entre morfotipos em simpatria e entre populações residentes e anadrômicas dessas espécies.

Para peixes da fauna neotropical, os estudos genéticos têm apontado para presença tanto de populações panmíticas quanto de populações estruturadas em um mesmo sistema hidrográfico. Os primeiros casos de populações panmíticas foram evidenciados para o peixe migrador *P. lineatus*, através de análises enzimáticas. Neste estudo foram observados baixos

valores de  $F_{ST}$  (0,018) e altos valores de identidade genética de Nei (0,996) (Revaldaves et al., 1997). Em *P. costatus* do rio São Francisco, o uso de seis locos microssatélites também evidenciou ausência de estruturação populacional nesses peixes com valores de  $F_{ST}=0.006$  e  $p=0.52$  (Carvalho-Costa et al., 2008). Estudos com mtDNA (D-loop) também evidenciaram ausência de estruturações na espécie de pacu *P. mesopotamicus* da bacia do Alto Paraguai ( $\Phi_{ST}=-0.0012$ ;  $p = 0.486$ ), sendo observados altas taxas de migrantes por geração (Iervolino et al., 2010).

Análises de mtDNA (NADH desidrogenase 1 e Citocromo Oxidase 2) e de 14 locos microssatélites sugerem que em *Arapaima gigas* (pirarucu), espécie de grande porte e de hábitos sedentários, diferentes populações locais formam na verdade uma única grande população panmítica, apesar de ter sido observado um pequeno efeito de isolamento por distância (teste Mantel,  $r = 0,619$ ,  $P = 0,012$ ), detectado somente através dos dados microssatélites entre amostragens da bacia Amazônica com no mínimo 2500 km de distância (Hrbek. et al., 2007).

Para o gênero *Prochilodus*, no entanto, Morelli et al. (2007b) encontraram diferenças significativas entre populações residentes e migradoras de *P. lineatus* na região da Cachoeira de Emas, incluindo cardumes reprodutivos de uma mesma piracema. Estes dados foram obtidos tanto com microssatélites (quatro locos) quanto com mtDNA (D-loop). Estudos no rio São Francisco, usando apenas quatro locos microssatélites, também demonstram que *P. argenteus* parece evidenciar uma pequena, mas significativa diferenciação populacional ( $F_{ST}=0.008$ ,  $p=0.0002$ ) durante o período reprodutivo em duas áreas analisadas (Hatanaka et al., 2006), corroborando os

resultados anteriormente obtidos com RAPD para estas mesmas populações (Hatanaka e Galetti, 2003).

Dentro de outros gêneros de peixes considerados migradores, estudos de diferenciação também já foram verificados em *B. lundii* na região da barragem de Três Marias, MG, utilizando marcadores de RAPD e minissatélites (Wasko e Galetti, 2002; Wasko e Galetti, 2003). Nestes trabalhos os autores evidenciaram uma possível estruturação populacional entre duas áreas distantes entre si por apenas 20 km. Em *B. opalinus*, a utilização de sete locos microssatélites permitiu a detecção de estruturação populacional entre diferentes rios, os quais exibiram valores de variação de 4,3% entre populações (AMOVA) e valores de  $R_{ST}$  de 0,023 (Barroso et al., 2005). Além disso, Sanches e Galetti (2007) utilizando locos baseados em RAPD, identificaram a existência de diferentes populações de *B. hilarii* co-existindo e migrando dentro de uma mesma bacia hidrográfica (Sub-bacia do rio Miranda, bacia do Paraguai). Estes dados foram posteriormente confirmados através de análises utilizando sete locos microssatélites (Sanches, 2007).

Estudos conduzidos em áreas de alta densidade de barragens, como o realizado na bacia do Alto Paraná por Calcagnotto e DeSalle (2009), alertam para os efeitos destas nas migrações de peixes. Neste trabalho, os autores levantaram a hipótese de que a presença de barragens nas regiões dos rios Paranapanema e Paraná, as quais começaram a ser construídas em 1901, seriam responsáveis pelo isolamento e diferenciação populacional observados em pacus ( $F_{ST}=0,06526$ ,  $p<0,05$  após correção seqüencial de Bonferroni). Além da presença de barragens, a grande distância entre algumas das localidades estudadas (Pantanal x Paraná, diferentes bacias Paraguai e Paraná,

respectivamente), pode ter contribuído para as diferenciações observadas. Entretanto, deve-se ressaltar, que para algumas populações analisadas na bacia do Paraguai, não foi detectada nenhuma diferenciação genética, mesmo ao considerar rios com distâncias superiores a 800 km e o fato de que o pacu realiza migrações de curtas distâncias, percorrendo uma média de apenas 100 km.

Em dourado, estudos genéticos têm revelado, em geral, baixos níveis de variabilidade genética para estes peixes. Machado et al. (2005) ao analisarem o gene mitocondrial NADH desidrogenase 2 em diferentes populações pertencentes a rios do Brasil e Argentina, encontraram baixa diversidade genética, identificando apenas oito haplótipos em cinco rios distintos. Apesar disso, estas populações evidenciaram níveis de diferenciação genética significativos, os quais foram atribuídos à presença de haplótipos exclusivos, embora os autores tenham ressaltado a necessidade de uma maior amostragem para confirmar os dados obtidos.

Em dourados (*S. brasiliensis*) do rio Paranapanema, Lopes et al. (2007) utilizando marcadores de RAPD compararam diferentes populações do complexo de Canoas (Canoas I e Canoas II), no estado de São Paulo, durante o período reprodutivo de três anos consecutivos. Os valores de variabilidade genética foram menores que 45% (86 locos polimórficos de um total de 192) e os autores concluíram que os níveis de diferenciação das populações entre as áreas analisadas e ao longo dos anos era baixo ( $F_{st}=0,018$ ,  $p<0,05$ ), sendo estas consideradas como uma única população dentro deste complexo. No entanto, Ramella et al. (2006) também em estudo com o dourado (*S. brasiliensis*) baseados em RAPD, encontraram altos níveis de variabilidade

genética (100% de locos polimórficos de um total de 45) em populações da bacia do alto rio Uruguai, as quais exibiram uma possível estruturação populacional, uma vez que dois grupos distintos puderam ser evidenciados.

No presente trabalho, a evidência de ausência de estruturação populacional entre indivíduos coletados em distintas épocas reprodutivas (2007, 2008, 2009) pode estar relacionada com uma potencial presença de representantes de distintas populações que se encontram durante a migração realizada no período reprodutivo. A região de Cachoeira de Emas parece se constituir em uma zona de contenção de peixes (Heras, 1998; Barbieri et al., 2000), acumulando diferentes populações no período reprodutivo que exibiriam juntas altos índices de variabilidade genética e baixa frequência de alelos exclusivos.

Heras (1998) através de análises citogenéticas verificou a presença de três citótipos ( $2n=46$ , 47 e 48) na região de Cachoeira de Emas para *Astyanax fasciatus*, fato este que poderia ser resultado de uma zona de inter-graduação. Com base nestes dados, concluiu-se que a barragem poderia funcionar como uma zona de contenção de cardumes desta espécie, onde indivíduos de várias populações dos tributários, ao migrarem para a calha principal, ficariam retidos à jusante da barragem.

Barbieri et al. (2000), estudando aspectos fisiológicos de exemplares de *S. brasiliensis* (citado no texto como *S. maxillosus*) na Cachoeira de Emas, também verificaram a possível presença de acúmulo de diferentes populações nesta região, uma vez que foram observados peixes em diferentes estágios de desenvolvimento gonadal. Neste estudo, a presença de animais migrantes e animais ainda em fase prévia de preparação à migração, parecem confirmar a

hipótese da existência de uma área de acúmulo de diferentes populações de dourado durante o período reprodutivo.

Zaniboni-Filho e Schulz (2003) relatam que durante a época reprodutiva diferentes populações de dourado da bacia do rio Uruguai concentram-se em corredeiras ou próximos de obstáculos naturais para aguardarem o nível de água subir. Durante outras épocas do ano, no entanto, os peixes costumam exibir hábitos solitários, formando, no máximo, pequenos cardumes.

Desta forma, assim como verificado em estudos prévios com dourados e lambaris, o presente estudo parece indicar que na região de Cachoeira de Emas pode ocorrer durante o período reprodutivo um acúmulo de indivíduos pertencentes a diversas populações dos diferentes rios que compõem o sistema Mogi-Pardo-Grande e que ao migrarem ficariam retidos na área da barragem. Por outro lado, as populações aqui estudadas, fora do período reprodutivo, consideradas residentes, apresentaram certo grau de diferenciação genética (indicado pela estatística  $F$  e pelas análises no Structure), sugerindo, neste caso, que se há fluxo gênico durante o período reprodutivo, este não é suficientemente grande para homogeneizar estas populações.

#### **5.4. Inferências de valores de $K$ pelo programa Structure 2.3.1. (Pritchard et al., 2000)**

Na última década, muitos estudos genético-populacionais passaram a utilizar o Structure (Pritchard et al., 2000) para realizar inferências sobre o grau de estruturação ou diferenciação genética entre populações com base em



dados moleculares. Bentley et al. (2008), por exemplo, encontraram diferenciação populacional entre populações de fungos *Fusarium pseudograminearum* de diferentes regiões de cultivares de trigo na Austrália, com base em análises de AFLP. Em humanos, o uso massivo de marcadores microssatélites, também permitiu a detecção de diferenciações de diversas populações espalhadas pelos continentes (Rosenberg et al., 2002; Wang et al., 2007).

Em outros estudos, no entanto, níveis claros de diferenciação genética nem sempre são obtidos através de análises realizadas neste programa. Martien et al. (2007), por exemplo, ao estudar baleias nos mares do ártico mostraram que o programa identificou apenas um único estoque para esta região. Entretanto, segundo os pesquisadores, há pelo menos dois estoques notadamente diferentes, apresentados em estudos anteriores e comprovados em análises baseadas em  $F_{ST}$  e  $\chi^2$ .

Outro exemplo em que não foi possível estabelecer um número claro de grupos ou populações distintas foi um estudo realizado em *Drosophila sechellia*. Segundo Legrand et al. (2009), análises de seqüências de mtDNA e de genes nucleares de populações amostradas em ilhas oceânicas, distantes entre si por até 60 km, não evidenciaram nenhum padrão de estruturação, mesmo após efetuadas as correções sugeridas por Evanno et al. (2005), as quais produziram múltiplos valores de  $\Delta K$  muito próximos ( $K=2$ ,  $K=4$  e  $K=9$ ).

A determinação do número  $K$  mais provável de populações existentes pressupõe tradicionalmente a ocorrência de um *plateau* dos valores logaritmos de probabilidades e ainda a estimativa das probabilidades de cada  $K$  (Rosenberg et al., 2002; Evanno et al., 2005; Chen et al., 2007). Deste modo,

uma boa estimativa é o valor de  $K$  que maximiza a probabilidade de  $\ln(P(X|K))$ , sendo então a escolha para o número de populações presentes nos dados (Pritchard et al., 2000). Os valores obtidos no presente trabalho, no entanto, não seguiram este padrão, pois não houve a identificação clara de um *plateau*. Nestes casos, uma busca alternativa deste valor é sugerida pelo método de correção proposto por Evanno et al. (2005). Se não considerarmos esta correção, os dados demonstram a possibilidade de existência de oito grupos, como apontado pelo cálculo das probabilidades  $\Pr(X|K)$  (tabela 20). Entretanto, após a correção de Evanno et al. (2005), são obtidos dois únicos grupos envolvendo os residentes e as demais populações.

Resultados semelhantes foram encontrados por Duan et al. (2008) estudando SNPs em populações de *Plasmodium falciparum*, onde os diferentes haplótipos foram agrupados pelo programa em seis grupos ( $K=6$ ) e após realizada a correção de Evanno et al. (2005), apenas duas populações foram evidenciadas. Os autores atribuíram que esse valor de  $K=2$  seria o mais provável, uma vez que apenas duas populações (nomeadas 1 e 2) foram mantidas estáveis quando o valor de  $K$  aumentou, comportando-se como populações únicas fortemente suportadas em cada valor de  $K$  testado. Da mesma forma que observado para *P. falciparum*, o presente estudo também revelou que a ocorrência de diferenciação se manteve presente a maior parte do tempo somente em duas populações (RA-10/2007 e RL-04/2009) (figuras 22 e 23).

Desvios relacionados ao número de possíveis grupos também são visíveis no teste de atribuição, o qual evidenciou a presença de apenas quatro grupos definidos para as amostras analisadas no presente trabalho. Neste

caso, o tipo de modelo de freqüências alélicas correlacionadas proposto por Falush et al. (2003) parece ser o principal responsável por possíveis erros na detecção de estruturação populacional. Este modelo, introduzido como um modo de aperfeiçoamento, permite que populações adicionais sejam encaixadas ao conjunto de dados onde duas ou mais populações com freqüências alélicas muito próximas poderiam existir. Segundo Falush et al. (2003), aspectos relacionados ao endocruzamento e a presença de alelos nulos também podem favorecer a identificação de mais grupos nos dados. Latch et al. (2006), em seu estudo simulado, demonstrou que a habilidade de inferir corretamente o número  $K$  de populações pelo programa Structure está diretamente associada aos valores de  $F_{ST}$ , ou seja, quanto maiores estes valores, melhores as inferências. Os autores apontam ainda que para valores de  $F_{ST}$  próximos de 0,01 o programa não detecta nenhuma estruturação, e que para valores maiores que 0,03 as estimativas de  $K$  e  $\Delta K$  são mais precisas.

Assim, no presente trabalho, tanto a existência de quatro ou oito populações distintas parece merecer ponderações. A presença de  $K=8$  possíveis populações pode ser um simples artefato do modelo estatístico utilizado, uma vez que o teste de atribuição aponta para a existência de apenas quatro grupos bem definidos. Por outro lado, as correções de Evanno et al. (2005) sugerem a existência de apenas duas populações. Neste caso, outra análise realizada no programa revelou que existe a possibilidade de sub-estruturação populacional em duas amostragens, RA-10/2007 (com quatro sub-populações) e RL-04/2009 (com três possíveis sub-populações). Apesar do baixo número amostral analisado dentro de cada população (36 para RA-10/2007 e 23 para RL-04/2009), o programa foi capaz de identificar, na maioria

das inferências, subdivisões populacionais dentro dessas populações. Os novos tamanhos populacionais propostos variaram de 5 a 12 para cada sub-população. Segundo Fogelqvist et al. (2010), simulações computacionais e dados obtidos para *Arabidopsis thaliana*, baseados em 10 locos microssatélites, permitiram estimar com precisão grupos diferenciados nestas amostragens com número amostral de 6 a 10 indivíduos em cada sub-população.

Pröhl et al. (2010) estudando populações de sapos (*Physalaemus pustulosus*) através de marcadores de mtDNA e microssatélites, verificaram a existência de quatro grupos populacionais, apesar dos valores de  $\Delta K$  apontarem para a presença de somente dois grupos. Neste caso, os autores consideraram uma divisão em duas diferentes linhagens (Norte e Sul) separadas por um ambiente inóspito, sendo que os demais grupos seriam resultado de uma sub-estruturação populacional dentro da linhagem Sul.

Assim, com base em todos os aspectos discutidos no presente trabalho, um possível cenário para os dados obtidos para as populações migrantes e residentes de *S. brasiliensis* da região de Cachoeira de Emas aqui estudadas encontra-se descrito a seguir:

(1) Durante a época reprodutiva, indivíduos migrantes são encontrados na área da barragem e caso estes indivíduos pertençam a distintas populações, nesta condição, a amostragem não permite detectar possíveis diferenças, uma vez que estes indivíduos representariam apenas uma pequena porção de cada uma das possíveis populações ali presentes. Esta situação contribui para os altos níveis de diversidade genética observados nestas populações e baixa frequência de alelos privados, e conseqüente ausência de

estruturação populacional nesta região. Esta hipótese estaria de acordo com os resultados obtidos por Heras (1998) e Barbieri et al. (2000) que trataram a região da barragem de Cachoeira de Emas como uma zona de contenção de cardumes, nos quais podem ser encontrados indivíduos pertencentes a vários demes.

(2) Para as populações coletadas fora do período reprodutivo só foi possível detectar a presença de estruturação em duas amostras pertencentes a locais diferentes e a coletas realizadas em anos diferentes (2007 e 2009). Apesar de não podermos atribuir estas diferenças aos locais de coletas, feitas as devidas ponderações, podemos ao menos supor que de fato existem duas populações de *S. brasiliensis* ocupando a região de Cachoeira de Emas, uma vez que 18 meses é tempo insuficiente para que sejam fixadas diferenças significativas nestas populações, sendo estas, portanto, pertencentes a mesma geração. A confirmação da presença de mais de uma população de *S. brasiliensis* coexistindo nesta região só será possível, no entanto, a partir do estudo de populações coletadas nessas localidades sem variação temporal. Entretanto, associando os dados aqui obtidos aos reportados por Bonetto e Castello (1985), na região da Cachoeira de Emas (com marcação e recaptura), e por Hahn (2007) no rio Uruguai (com uso de telemetria) há fortes evidências para supor a existência de mais de uma população residente de dourados nesta região.

(3) Para os outros quatro pares de populações residentes que apresentaram valores significativos de  $F_{ST}$  [RA-10/2007 x RT-10/2009 ( $F_{ST}=0,0092$ ,  $P=0,00179$ ), RA-10/2007 x RT-07/2008 ( $F_{ST}=0,0196$ ,  $P=0,00179$ ), RL-04/2009 x RT-10/2009 ( $F_{ST}=0,0321$ ,  $P=0,00179$ ) e RL-04/2009 x RT-

07/2008 ( $F_{ST}=0,0279$ ,  $P=0,00179$ ), o programa não suportou fortemente esta hipótese, sendo que tal situação provavelmente está relacionada a diferenciação observada entre apenas duas populações (RA-10/2007 e RL-04/2009), idéia reforçada quando estas duas populações são retiradas das análises e as demais passam a não mais evidenciar estruturação.

### **5.5. Implicações para a Conservação**

A diversidade genética é a responsável pelas adaptações e evolução de uma espécie frente às contínuas mudanças ambientais e uma perda desta diversidade implica na redução geral do valor adaptativo (Frankham et al., 2008). A identificação da estrutura populacional de uma espécie é parte fundamental para a condução de programas de conservação, através da determinação das unidades que devem ser conservadas (Laikre et al., 2005).

Frankham et al. (2008) assumem que um tamanho efetivo populacional de no mínimo 500 e um tempo estimado de mil gerações seriam necessários para recuperar a diversidade genética após a perda completa desta. Estes valores estão ligados diretamente a viabilidade populacional, ou seja, a capacidade da espécie sobreviver frente às ameaças sofridas. Deste modo, ações que visem à manutenção das espécies no ambiente natural e sua diversidade genética total são necessárias.

Estudos revelam que espécies sob influência antrópicas, ou que sofreram algum gargalo populacional, em geral, tem sua variabilidade genética diminuída quando comparadas com as espécies não ameaçadas e/ou com grande tamanho populacional. Uma vez que esta variabilidade é também

responsável pelo potencial evolutivo de uma espécie, quando perdida ou reduzida, seu potencial evolutivo também é alterado (Frankham et al., 2008). Desta forma, ações que visem investigar a estrutura e diversidade genética de populações naturais são essenciais para determinação de estratégias conservacionistas.

As populações de dourado de Cachoeira de Emas vêm sofrendo diversas ações antrópicas, como a intensa presença de barragens ao longo do Alto Paraná, além de atividades de sobre-pesca, atividades agrícolas, liberação de esgotos *in natura* e uso de agrotóxicos em lavouras (Godoy, 1975; Agostinho et al., 2003; Sato e Godinho, 2003; Agostinho et al., 2005). Apesar disso, as populações aqui analisadas demonstraram grande variabilidade genética e um cenário com provável ausência de estruturação genética durante o período reprodutivo. No entanto, a ausência de diferenciação deve ser considerada com cautela. Laikre et al. (2005) advertem que a hipótese de ausência de estruturação deve ser aceita somente quando realizado um estudo ao longo de vários anos, com grandes amostragens e número de locos analisados, pois somente assim teremos uma visão mais ampla da diversidade genética da espécie como um todo. A conclusão de ausência de estruturação pode implicar em um mau gerenciamento de planos de manejo, uma vez que toda a área de distribuição de uma espécie pode ser considerada como uma única grande população. No nosso estudo, podem existir diversas populações que não foram detectadas pelos métodos de análise empregados.

A identificação de unidades geneticamente estruturadas em peixes brasileiros é necessária para a conservação, dado que várias espécies demonstram diferenças significativas entre diversas populações analisadas

(Wasko e Galetti, 2003; Hatanaka e Galetti, 2003; Hatanaka et al., 2006; Sanches e Galetti, 2007). Até mesmo pequenos valores de  $F_{ST}$  merecem atenção, como valores encontrados nos estudos para *P. argenteus* ( $F_{ST}=0,008$ ;  $p<0,0001$ ) (Hatanaka et al., 2006) e *B. hilarii* ( $F_{ST}=0,0091$ ;  $p<0,048$ ) (Sanches, 2007).

No presente trabalho, a ausência de estruturação populacional entre coletas durante o período reprodutivo pode ser devida a uma grande mistura de diferentes populações existentes. A evidência de estruturação populacional fora do período reprodutivo é um indicativo de que haja diferenças genéticas entre estas populações, apontando para a hipótese de existência de populações estruturadas de dourado no rio Mogi-Guaçu. Deste modo, atenção especial deve ser dada às populações fora da piracema, principalmente com a conservação dos locais preferenciais de alimentação desses animais, uma vez que a liberação destas áreas para pesca pode acarretar em perdas de unidades únicas existentes no local. Assim, dados de estruturação genética obtidos para a espécie *S. brasiliensis* constituem uma importante ferramenta para auxílio em planos de manejo de pesca e conservação desta importante espécie de peixe migrador.



## 6. CONCLUSÕES

Deste modo, podemos concluir que:

- (1) Os testes de transferabilidade de locos microssatélites para a espécie *Salminus brasiliensis*, realizados no presente trabalho foram satisfatórios, resultando em um conjunto de 10 locos polimórficos (um de *B. opalinus* e nove de *S. franciscanus*) úteis para os estudos genético-populacionais desta importante espécie de peixe.
- (2) Não foi possível evidenciar uma estruturação genética nas populações coletadas durante a época reprodutiva com as amostras analisadas, reforçando a idéia de que a barragem de Cachoeira de Emas parece funcionar como uma zona de contenção de populações durante o período reprodutivo, propiciando um acúmulo de diferentes populações nesta área. Esta idéia é suportada pelos altos índices de variação genética e baixa freqüência de alelos privados, além de desvios significativos no EHW, sugerindo, um possível efeito de Wahlund.
- (3) Para as populações residentes, no entanto, foi verificada a existência de uma pequena diferenciação entre todas as quatro amostras analisadas. Os dados estatísticos, no entanto, deram um maior suporte para a existência de ao menos duas populações, a RA-10/2007 e RL-04/2009, coletadas respectivamente, nos anos de 2007 e 2009, fora do período reprodutivo.

- (4) Foi observada ainda uma possível sub-estruturação dentro das respectivas populações estruturadas (RA-10/2007 e RL-04/2009). Entretanto, este resultado precisa ser visto com cautela devido ao baixo número amostral alocado em cada uma destas sub-populações.
- (5) Sob o ponto de vista conservacionista, as populações de *S. brasiliensis* da região de Cachoeira de Emas, aqui estudadas, parecem apresentar, no geral, alta variabilidade genética ao longo de toda sua extensão, incluindo locais à jusante e à montante da barragem. Entretanto, a despeito de não terem sido detectadas diferenças entre as populações no período reprodutivo, fora deste, houve um indicativo de que estas populações se apresentem diferenciadas. Assim, deve haver uma preocupação em ordenar a atividade de pesca nesta região também fora do período de piracema desta espécie.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO JR, H.F. (2003). Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin Brazil. Em Carolsfeld et al. (ed) Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, DC, Estados Unidos da América, 2:19-98.

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. (2005). Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. Conservation Biology, Volume 19, No. 3, Pages 646–652.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. (2007). Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil. Maringá, Eduem 501p.

AMUTIO, V.G.; ESPINACH ROS, A.; FORTUNY, A. (1986). Field-induced breeding of the dorado, *Salminus maxillosus* Valenciennes. Aquaculture, 59:15-21.

ARRUDA, M.P.; GONÇALVES, E.C.; SCHENEIDER, M.P.C.; SILVA, A.L.C.; VERSUTE, E.M. (2010). An alternative genotyping method using dye-labeled universal primer to reduce unspecific amplifications. Mol Biol Rep, 37:2031–2036.

BALDING, D.J. (2006). A tutorial on statistics methods for population association studies. Nature Reviews Genetics, 7, 781-791.

BALDISSEROTTO, B. (2009). Piscicultura continental no Rio Grande do Sul: situação atual, problemas e perspectivas para o futuro. Ciência Rural, Santa Maria volume 39, (1):291-299.

BALLOUX, F.; LUGON-MOULIN, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology 11(2), 155-165.

BARBARÁ, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G.M.; BERED, F.; FAY, M.F.; LEXER, C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. Molecular Ecology, 16: 3759-3767.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. (2000). Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimbatá, *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). Acta Limnol. Bras. 12:85-91.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A.; TEIXEIRA-FILHO, A.R. (2004). Estratégias reprodutivas do dourado, *Salminus maxillosus* e do curimbatá, *Prochilodus lineatus* no Rio Mogi Guaçu, Estado de São Paulo, com ênfase nos parâmetros matemáticos da dinâmica populacional. Acta Scientiarum, 26(2):169-174.

- BARROSO, R.M.; HILSDORF, W.S.; MOREIRA, L.M.; MELLO, A.M., GUIMARÃES, S.E.F.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, M. (2003). Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Notes* 3, 297-298.
- BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M. et al. (2005) Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, v.247, p.51-65.
- BENTLEY, A.R.; LESLIE, J.F.; LIEW, E.C.Y.; BURGESS, L.W.; SUMMERELL, B.A. (2008). Genetic Structure of *Fusarium pseudograminearum* Populations from the Australian Grain Belt. *PHYTOPATHOLOGY*, 98(2):250-255. doi:10.1094/PHYTO-98-2-0250.
- BONETTO, A.A.; CASTELLO, H.P. (1985). Pesca y piscicultura en aguas continentales de America Latina. Washington, D.C. : Secretaria General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. 118p.
- BONIN, A.; BELLEMAIN, E.; EIDEN P.B.; POMPANON, F.; BROCHMANN C.; TABERLET, P. (2004). How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, 13:3261–3273.
- BROHEDE, J.; ELLEGREN, H. (1999). Microsatellite evolution: polarity of substitutions within repeats and neutrality of flanking sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 266:825-833.
- BROOKFIELD, J.F.Y. (1996). A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5:453-455.
- BROQUET, T.; MÉNARD, N.; PETIT, E. (2007). Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. *Conservation Genetics*, 8:249-260.
- BROQUET, T.; PETIT, E. (2004). Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology*, 13:3601–3608.
- BROUGHTON, R.E.; STEWART, L.B.; GOLD, J.R. (2002). Microsatellite variation suggests substantial gene flow between king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in the western Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. *Fisheries Research* 54:305-316.

- CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. (2005). Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36 135–153.
- CALCAGNOTTO, D.; DESALLE, R. (2009). Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):607-616.
- CALLEN, D.F., THOMPSON, A.D.; SHEN, Y. (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the. (AC)n microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52: 922-927.
- CARVALHO-COSTA L.F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P.M. (2008). Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl), 377-380.
- CETESB (2008). Relatório de qualidade das águas interiores do estado de São Paulo 2007 / CETESB. São Paulo, 537 p.
- CHAMBERS, GK; MACAVOY, ES. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126:455-476.
- CHAPUIS, M.P.; ESTOUP, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3):621–631.
- CHARLES, K.; GUYOMARD, R.; HOYHEIM, B.; OMBREDANE, D.; BEGLINIERE, J. (2005). Lack of genetic differentiation between anadromous and resident sympatric brown trout (*Salmo trutta*) in a Normandy population. *Aquat. Living Resour.* 18, 65–69.
- CHEN, C.; DURAND, E.; FORBES, F.; FRANÇOIS, O. (2007). Bayesian grouping algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, 7:747–756.
- CRAWFORD, N.G. (2010). SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, 10(3):556-557.
- DAVIS, E.S.; MURRAY, T.E.; FITZPATRICK, Ú.; BROWN, M.J.F.; PAXTON, R.J. (2010). Landscape effects on extremely fragmented populations of a rare solitary bee, *Colletes floralis*. *Molecular Ecology*, 19(22): 4922-4935. doi:10.1111/j.1365-294X.2010.04868.x

- DUAN, J., MU, J., THERA, M.A.; JOY, D. et al. (2008). Population structure of the genes encoding the polymorphic *Plasmodium falciparum* apical membrane antigen 1: Implications for vaccine design. PNAS, 105(22):7857–7862.
- ELLEGREN, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. Nature Reviews Genetics, 5:435-445.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. (2005). Detecting the number of grupos of individuals using the programa Structure: a simulation study. Molecular Ecology 14, 2611-2620.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online 1:47-50.
- FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. Genetics, 164, 1567–1587.
- FEITOSA, L.A.; FERNANDES, R.; COSTA, R.S.; GOMES, L.C.; AGOSTINHO, A.A. (2004). Parâmetros populacionais e simulação do rendimento por recruta de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) do Alto Paraná. Acta Scientiarum. Biological Sciences. Maringá, v.26, no.3, p. 317-323.
- FERNANDO, P.; VIDYA, T.N.C.; RAJAPAKSE, C.; DANGOLLA, A.; MELNICK, D.J. (2003). Reliable Noninvasive Genotyping: Fantasy or Reality?. Journal of Heredity, 94(2):115–123.
- FERREIRA, ME; GRATTAPAGLIA, D. (1995). Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1995. pp. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).
- FOGELQVIST, J.; NIITTYVUOPIO, A.; AGREN, J.; SAVOLAINEN, O.; LASCOUX, M. (2010). Cryptic population genetic structure: the number of inferred grupos depends on sample size. Molecular Ecology Resources, 10:314–323.
- FRACALOSSO, D.M.; MEYER, G.; SANTAMARIA, F.M.; WEINGARTNER, M. ZANIBONI FILHO, E. (2004). Desempenho do jundiá, *Rhamdia quelen*, e do dourado, *Salminus brasiliensis*, em viveiros de terra na região sul do Brasil. Acta Scientiarum. Animal Sciences. Maringá, v.26, (3):345-352.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. (2008). Fundamentos de Genética da Conservação. Tradução por Francisco, M.R.; Farias, I.P.; Rodrigues, F.P.; Galetti, P.Mi. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 280p.

- FREITAS, PD; GALETTI JR., PM (2002). PCR-based VNTR core sequences analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 4.
- FREITAS, L.A.C.M. (2010). Diversidade Genética em *Salminus brasiliensis* (Dourado), uma espécie de grande interesse comercial no Pantanal Mato-grossense. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP. 122p.
- GAGGIOTTI, O.E.; LANGE, O.; RASSMANN K.; GLIDDON, C. (1999). A comparison of two methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8:1513-1520.
- GALARAZA, J.A.; TURNER, G.F.; MACPHERSON, E.; CARRERAS-CARBONELL, J.; RICO, J. (2007). Cross-amplification of 10 new isolated polymorphic microsatellite loci for red mullet (*Mullus barbatus*) in striped red mullet (*Mullus surmuletus*). *Molecular Ecology Notes* 7, 230-232.
- GODOY, M.P. (1975). Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu. Volume I. Editora Franciscana, Piracicaba, SP. p. 216.
- GOUDET, J. (1995). FSTAT (version 1.2.): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86: 485-486.
- GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DE MEEÛS, T.; ROUSSET, F. (1996). Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144: 1931-1938.
- GUO, S. W.; E. A. THOMPSON. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48:361-372.
- HAHN, L. (2007). Deslocamento de peixes migradores no rio Uruguai e no sistema misto de migração da barragem de Itaipu. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Maringá, Maringá-PR. 53 p.
- HAIG, S.M. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79(2), pp. 413-425.
- HATANAKA, T.; GALETTI, 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., HENRIQUE-SILVA, F. GALETTI JR., P.M. (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 1-7.

- HERAS, MP. (1998). Estudos citogenéticos em *Astyanax fasciatus* (Pisces, Characidae) de alguns rios do Brasil. Dissertação de Mestrado. São Carlos: UFSCar. 86p.
- HOFFMAN, J.I.; AMOS, W. (2005). Microsatellite genotyping errors: detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14:599–612.
- HOFFMAN, J.I.; MATSON, W.; AMOS, W.; LOUGHLIN, T.R.; BICKHAM, J.W. (2006). Deep genetic subdivision within a continuously distributed and highly vagile marine mammal, the Steller's sea lion (*Eumetopias jubatus*). *Molecular Ecology*, 15:2821–2832.
- HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I.P.; (2007). Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology* 67: 909–917
- IERVOLINO, F.; RESENDE, E.K.; HILSDORF, A.W.S. (2010). The lack of genetic differentiation of pacu (*Piaractus mesopotamicus*) populations in the Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research* 101:27–31.
- IHERING, R. VON. (1968). Dicionário dos animais do Brasil. Editora Universidade de Brasília, São Paulo, 790 p.
- IMSLAND, A.K.; JÓNSDÓTTIR, 1,Ó.D.B.; DANIELSDÓTTIR, 1,A.K. (2004). Nuclear DNA RFLP variation among Atlantic cod in south and south-east Icelandic waters. *Fisheries Research*, 67:227–233.
- JERRY, D.R.; PRESTON, N.P.; CROCOS, P.J.; KEYS, S.; MEADOWS, J.R.S.; LI, Y. (2004). Parentage determination os Kuruma shrimp *Penaeus (Marsupenaeus) japonicus* using microsatellite markers (Bate). *Aquaculture* 235, 237-247.
- KARVE, A.D.; HIPPEL, F.A.; BELL, M.A. (2008). Isolation between sympatric anadromous and resident threespine stickleback species in Mud Lake, Alaska. *Environ Biol Fish*, 81:287–296.
- KLEMETSEN, A.; ELLIOTT, J.M.; KNUDSEN, R.; SORENSEN, P. (2002). Evidence for genetic differences in the offspring of two sympatric morphs of Arctic charr. *Journal of Fish Biology*, 60: 933–950.
- LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. (2005). Genetic Population Structure of Fishes: Implications for Coastal Zone Management. *Ambio* (34)2:111-119.



- LATCH, E.K.; DHARMARAJAN, G.; GLAUBITZ, J.; RHODES JR., O.E. (2006). Relative performance of Bayesian grouping program for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*, 7:295–302.
- LEGRAND, D.; TENAILLON, M.I.; MATYOT, P. ET AL. (2009). Species-Wide Genetic Variation and Demographic History of *Drosophila sechellia*, a Species Lacking Population Structure. *Genetics* 182: 1197–1206. DOI: 10.1534/genetics.108.092080.
- LI, Y-C.; KOROL, A.B.; FAHIMA, T.; NEVO, E. (2004). Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution* vol. 21 no. 6.
- LIMA, F.C.T., MALABARBA, L.R., BUCKUP, P.A. ET AL. (2003). Genera Incertae Sedis in Characidae. 106-169. In: R.E. Reis, S.O. Kullander e C.J. Ferraris Jr (eds) Check list of the freshwater fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, 742p.
- LIMA, FCT. (2006). Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Tese de Doutorado. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. 253 p.
- LIMA, F.C.T.; BRITSKI, H.A. (2007). *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology* 5: 237-244.
- LIU, Y-G.; CHENA, S-L.; LIB, B-F.; WANGA, Z-J.; LIU, Z. (2006). Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(10):993-1005.
- LOPES, C.M.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M;L.; BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; SODRÉ, L.M.K. (2007). Fish passage ladders form Canoas Complex - Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). *Neotropical Ichthyology*, (2):131-138.
- MACHADO, V.; SCHULZ, U.H.; PALMA, L.P.; RODRIGUES, J.J.S. (2005). Mitochondrial DNA variation and genetic population structure of the migratory fish dourado *Salminus brasiliensis* (Characidae). *Acta Biologica Leopoldensia*, 27(2):107-113.
- MAI, M.G.; ZANIBONI FILHO, E. (2005). Efeito da idade de estocagem em tanques externos no desempenho da larvicultura do dourado *Salminus brasiliensis* (Osteichthyes, Characidae). *Acta Scientiarum, Animal Sciences*. Maringá, v.27, (2):287-296.

- MÄKINEN, H.S.; VÄLIMÄKI, K.; MERILÄ, J. (2007). Cross-species amplification of microsatellite loci for nine-spined stickleback *Pungitius pungitius*. *Ann. Zool. Fennici* 44:218-224.
- MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.(eds). (1998). Phylogeny and classification of neotropical fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. 603p.
- MALDINIA, M.; MARZANOVA, F.N.; FORTESA, G.G.; PAPA, R.; GANDOLFIA, G. (2006) Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture*, 261(2):487-494.
- MARQUES, A.A.B.; FONTANA, C.S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G.A.; SCHNEIDER, M.; DOS REIS, R.E. (2002). Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. DECRETO No 41.672, DE 11 DE JUNHO DE 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGEA. 52p. (Publicações Avulsas FZB, 11).
- MARTIEN, K. K.; GIVENS G.H.; ARCHER, E. (2007). A note on the ability of STRUCTURE to correctly infer the number of populations for Bering-Chukchi-Beaufort Seas bowhead whales. International Whaling Commission. Paper SC/59/BRG34.
- MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F.; GALETTI JR, P.M. (2004). Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia* 527: 223–225.
- MATSUMOTO, C. K. ; HILSDORF, A. W. S. (2009). Microsatellite variation and population genetic structure of a Neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology* (Impresso), v. 7, p. 395-402.
- MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (2004). Instrução Normativa nº 005, de 21 de maio de 2004.
- MICKETT, K.; MORTON, C.; FENG, J.; LI, P.; SIMMONS, M.; CAO, D.; DUNHAM, R. A.; LIU, Z. (2003) Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture*, 228(1-4):91-105.
- MORAN, P. (2002). Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods. *Ecology of Freshwater Fish*. Volume 11, Issue 1: 30-55.
- MORELLI, K.A.; REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. (2007a). Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes: Anostomidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes*, 7:32-34.

- MORELLI, K.A.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F., SENHORINI, J.A., FORESTI, F. (2007b). Populational structure of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu river identified by molecular analysis. In: Pompeu PSH, Santos HA, Alves CBM (eds) Proceedings of the international symposium on fish passages in south America, Lavras, UFLA, pp 7–10.
- MORIN, P.A.; LEDUC, R.G.; ARCHER, F.I.; MARTIEN, K.K.; HUEBINGER, R.; BICKHAM, J.W.; TAYLOR, B.L. (2009). Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Molecular Ecology Resources*. 9:498–504.
- NAGYLAKI, T. (1998). Fixation indices in subdivided populations. *Genetics*, 148, 1325–1332.
- NARUM, S.R.; CONTOR, C.; TALBOT, A.; POWELL, M.S. (2004). Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, U.S.A. *Journal of Fish Biology*, 65:471–488.
- NEI, M. (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 106: 283-292.
- NEI, M. (1973). Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 70, 3321–3323.
- NEI, M. (1987) *Molecular Evolutionary Genetics* Columbia University Press: New York, NY.
- O'CONNEL, M.; WRIGHT, J.M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7:331-363.
- OLIVEIRA, E.J.; PÁDUA, J.G.; ZUCCHI, M.I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M.L.C. (2006). Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29 (2): 294-307.
- OLIVEIRA, C. FORESTI, F. HILSDORF, A.W.S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol Biochem*, 35:81–100.
- OOSTERHOUT C.; HUTCHINSON W.F.; WILLS D.P. ; SHIPLEY P. (2004) MICRO-CHECKER: Program for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535-538.
- OKIMOTO, T.; HARA, K.; ISHIHARA, T.; ARANISHI, F. (2008). PCR-RFLP genotyping for Japanese and Korean populations of Pacific oyster using mitochondrial DNA non coding region. *Aquat Ecol*, 42:1–4.

- PEAKALL, R.; SMOUSE P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic programa for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- POMPANON, F; BONIN, A; BELLEMAIN, E; TABERLET, P. (2005). Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature reviews genetics*, volume 6, november 2005, pp. 847-859.
- POUGH, F. H. (1999) *A vida dos vertebrados*. 2. ed. São Paulo: Atheneu.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS M.; DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotypic data. *Genetic*, 155: 945-959.
- PROHL, H.; RON, S.R.; RYAN, M.J. (2010). Ecological and genetic divergence between two lineages of Middle American túngara frogs *Physalaemus* (= *Engystomops*) *pustulosus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10:146.
- PRUGH, L.R.; RITLAND, E.; ARTHUR, S.M.; KREBS, C.J. (2005). Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, 14:1585–1596.
- RAMELLA, M.S.; KROTH, M.A.; MEURER, S.; NUNER, A.P.O.; ZANIBONI-FILHO, E.; ARISI, A.C.M. (2006). Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 49(4):589-598.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F. (1995a). GENEPOP (version 1.2): population genetics programa for exact tests and ecumenecism. *J Heredity* 86: 248-249.
- RAYMOND, M.; ROUSSET, F., (1995b). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1283-1286.
- 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: 381-388.
- RIBEIRO, D.F.O.; NUÑER, A.P.O. (2008). Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds). *Aquaculture* 274: 65-71.
- RICE, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- RICO, C.; RICO, I.; HEWITT, G. (1996). 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of the Royal Society London Series B* 263: 549-557.

RIDLEY, M. (2006). *Evolução*. Editora Artmed, Porto Alegre, 3 ed., 752 p.

RODRIGUES, F.C.; FARIAS, I.P.; BATISTA, J.S.; ALVES-GOMES, J. (2009). Isolation and characterization of microsatellites loci for 'piramutaba' (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes:Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genet Resour*, 1:365–368.

ROSENBERG, N.; PRITCHARD, J.; WEBER, J. ET AL. (2002). Genetic structure of human populations. *Science*, 298:2981-2985.

ROSSINI, B.C.; NUNES, A.G.; FREITAS, P.D.; GALETTI, P.M. (2010). Isolation and characterization of microsatellite loci of the freshwater fish *Salminus franciscanus*. *Molecular Ecology Resources*.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

SANCHES, A.; GALETTI JR., P.M. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1045-1046.

SANCHES, A. (2007). Estrutura genética populacional de i (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 113 f.

SANCHES, A., GALETTI JR., P.M. (2007). Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon*. *Brazilian Journal of Biology*, 67 (4, Suppl.): 889-895..

SANTOS, M.C.F.; HRBEK, T.; FARIAS, I.P. (2009). Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplai. *Molecular Ecology Resources* 9(3):874-876.

SATO, Y.; GODINHO, H.P. (2003). Migratory fishes of the São Francisco River. Em Carolsfeld et al. (ed) *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank, Washington, DC, Estados Unidos da América, 5:195-232.

SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature America Inc*, 18: 233-234.

- SUPLICY, F.M. (2007). Freshwater fish seed resources in Brazil, pp. 129–143. In: M.G. Bondad-Reantaso (ed.). Assessment of freshwater fish seed resources for sustainable aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper. No. 501. Rome, FAO. 2007. 628p.
- VEGA-ORELLANA, O.M.; FRACALLOSSI, D.M.; SUGAI, J.K. (2006). Dourado (*Salminus brasiliensis*) larviculture: Weaning and ontogenetic development of digestive proteinases. *Aquaculture* 252:484– 493.
- VRIJENHOEK, R.C. (1998). Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology*, 53 (Supplement A), 394–412
- WANG, S.; LEWIS JR., C.M.; JAKOBSSON, M. ET AL. (2007). Genetic variation and population structure in native americans. *PLoS Genetics*, 3(11):2049-2067.
- 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 (1-3):131-137.
- WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. (2003). PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. *Journal Applied of Ichthyology*, 19: 109-113.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- WESTGAARD, J.I.; KLEMETSEN, A.; KNUDSEN, R. (2004). Genetic differences between two sympatric morphs of Arctic charr confirmed by microsatellite DNA. *Journal of Fish Biology*, 65:1185–1191.
- WRIGHT, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of eugenics*, 15:323-354.
- YEH, FRANCIS C., YANG, R-C., BOYLE, TIMOTHY, B.J., YE, Z-H., and MAO, JUDY X. (1997). POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada.
- YUE, G.H.; ORBAN, L. (2010). Novel Polymorphic Microsatellites from Guppy (*Poecilia reticulata*) and their Utility in Swordtails (*Xiphophorus helleri*). *Current Research Journal of Biological Sciences* 2(3): 161-163.

ZANIBONI-FILHO, E.; SCHULZ, U. H. (2003), Migratory fishes of the Uruguay river. In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C. and Baer, A. (Eds.). Migratory Fishes of South America- Biology, Fisheries and Conservation Status. IDRC, World Fisheries Trust and World Bank. pp.157-194.

ZHANG, L; YANG, C; ZHANG, Y; LI, L; ZHANG, X; ZHANG, Q; XIANG, J. (2007). A genetic linkage map of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*): sex-linked microsatellite markers and high recombination rates. *Genetica*, 131: 37-49.

ZUCOLOTO, R.B.; VILLELA, P.M.S.; VERDADE, L.M.; COUTINHO, L.L. (2006). Cross-species microsatellite amplification in South American Caimans (*Caiman spp* and *Paleosuchus palpebrosus*). *Genetics and Molecular Biology*, 29,1, 75-78.

8. APÊNDICE (Frequências alélicas distribuídas ao longo das populações):

Lócus: SFRA02																								
Pop	Alelos																							
	210	236	238	242	246	248	250	252	254	256	258	260	262	266	268	270	272	274	276	278	280	282	284	286
RA-10/2007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.014	0.069	0.014	0.056	0.000	0.028	0.000	0.000	0.056	0.042	0.000	0.083	0.000	0.069	0.028	0.000	0.028	0.056	0.014
RL-04/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.075	0.000	0.025	0.000	0.125	0.025	0.075	0.000	0.025	0.075	0.025	0.100	0.000	0.050
MT-12/2008	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.033	0.167	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.033	0.033	0.067	0.033	0.000	0.000	0.000	0.033
MT-01/2009	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.059	0.029	0.176	0.029	0.029	0.088	0.000	0.000
RT-10/2009	0.012	0.000	0.000	0.012	0.000	0.000	0.012	0.012	0.000	0.012	0.049	0.012	0.000	0.024	0.000	0.012	0.098	0.024	0.049	0.049	0.037	0.024	0.049	0.012
MT-11/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.105	0.053	0.000	0.079	0.053	0.026	0.026	0.053
MT-12/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.028	0.000	0.083	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.028	0.028	0.111	0.028	0.028	0.056	0.028	0.000
RT-07/2008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.034	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034	0.034	0.086	0.017	0.034	0.052	0.086	0.069	0.017
Pop	Alelos																							
	288	290	292	294	296	298	300	302	304	306	308	310	312	314	316	320	330	334	336	338	346	352	354	356
RA-10/2007	0.000	0.069	0.069	0.000	0.042	0.000	0.000	0.028	0.000	0.042	0.056	0.028	0.014	0.042	0.000	0.000	0.042	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
RL-04/2009	0.025	0.000	0.025	0.000	0.050	0.000	0.050	0.000	0.100	0.000	0.050	0.000	0.000	0.025	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000	0.025	0.000	0.000	0.000	0.000
MT-12/2008	0.100	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.033	0.000	0.033	0.033	0.033	0.033	0.000	0.000	0.033	0.033	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
MT-01/2009	0.000	0.000	0.059	0.029	0.000	0.059	0.000	0.059	0.059	0.029	0.029	0.000	0.029	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.029
RT-10/2009	0.049	0.024	0.098	0.024	0.000	0.049	0.012	0.049	0.049	0.012	0.024	0.012	0.037	0.024	0.024	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.012	0.000
MT-11/2009	0.053	0.079	0.026	0.132	0.000	0.000	0.053	0.000	0.053	0.000	0.026	0.053	0.026	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
MT-12/2009	0.000	0.028	0.056	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.056	0.056	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.028	0.028	0.028	0.000	0.028	0.000
RT-07/2008	0.052	0.017	0.017	0.000	0.017	0.052	0.000	0.017	0.000	0.034	0.052	0.000	0.069	0.017	0.000	0.034	0.000	0.000	0.034	0.034	0.017	0.000	0.000	0.000

Lócus: SFRA03																
Pop	Alelos															
	178	180	182	184	186	188	190	192	194	196	198	200	204	206	208	210
RA-10/2007	0.000	0.000	0.250	0.319	0.111	0.014	0.014	0.069	0.056	0.056	0.028	0.056	0.014	0.014	0.000	0.000
RL-04/2009	0.000	0.000	0.273	0.182	0.136	0.000	0.023	0.045	0.023	0.000	0.000	0.273	0.000	0.000	0.000	0.045
MT-12/2008	0.000	0.059	0.206	0.441	0.118	0.029	0.000	0.029	0.029	0.029	0.029	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000
MT-01/2009	0.000	0.000	0.222	0.389	0.111	0.000	0.000	0.139	0.083	0.028	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000
RT-10/2009	0.000	0.073	0.268	0.378	0.110	0.024	0.000	0.061	0.024	0.049	0.000	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000
MT-11/2009	0.029	0.059	0.382	0.206	0.176	0.000	0.000	0.029	0.029	0.029	0.000	0.059	0.000	0.000	0.000	0.000
MT-12/2009	0.000	0.036	0.250	0.250	0.179	0.071	0.000	0.107	0.036	0.000	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.000
RT-07/2008	0.000	0.019	0.327	0.269	0.192	0.038	0.038	0.000	0.019	0.038	0.000	0.038	0.019	0.000	0.000	0.000



**Locus: SFRA04**

Pop	Alelos									
	156	160	162	164	166	168	170	172	174	176
RA-10/2007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.343	0.271	0.386	0.000	0.000
RL-04/2009	0.000	0.000	0.000	0.045	0.023	0.455	0.136	0.318	0.000	0.023
MT-12/2008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.353	0.353	0.265	0.029	0.000
MT-01/2009	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.333	0.194	0.417	0.000	0.000
RT-10/2009	0.087	0.013	0.013	0.025	0.000	0.438	0.150	0.275	0.000	0.000
MT-11/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.474	0.132	0.368	0.000	0.026
MT-12/2009	0.000	0.056	0.000	0.056	0.000	0.528	0.167	0.194	0.000	0.000
RT-07/2008	0.000	0.071	0.000	0.000	0.000	0.500	0.232	0.179	0.018	0.000

**Locus: SFRA05**

Pop	Alelos																		
	274	284	288	290	292	294	296	298	300	302	304	306	308	310	312	316	318	344	354
RA-10/2007	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.329	0.086	0.071	0.086	0.086	0.129	0.086	0.014	0.029	0.029	0.029	0.000	0.000	0.000
RL-04/2009	0.000	0.000	0.022	0.000	0.000	0.022	0.065	0.000	0.130	0.109	0.348	0.261	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MT-12/2008	0.000	0.000	0.000	0.029	0.000	0.059	0.029	0.029	0.059	0.206	0.147	0.235	0.118	0.059	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000
MT-01/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.139	0.056	0.111	0.083	0.056	0.333	0.167	0.028	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000
RT-10/2009	0.013	0.000	0.025	0.000	0.025	0.100	0.037	0.113	0.013	0.087	0.287	0.100	0.113	0.013	0.013	0.013	0.013	0.013	0.025
MT-11/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.079	0.105	0.053	0.105	0.079	0.211	0.132	0.079	0.132	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000
MT-12/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.094	0.094	0.094	0.188	0.094	0.250	0.094	0.062	0.031	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
RT-07/2008	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.121	0.034	0.121	0.172	0.207	0.155	0.069	0.034	0.017	0.052	0.000	0.000	0.000

**Locus: SFRA10**

Pop	Alelos														
	208	252	256	260	268	272	276	280	284	288	292	300	304	308	324
RA-10/2007	0.000	0.029	0.000	0.029	0.000	0.000	0.400	0.000	0.000	0.029	0.200	0.000	0.029	0.286	0.000
RL-04/2009	0.022	0.000	0.000	0.043	0.000	0.000	0.609	0.000	0.043	0.043	0.065	0.000	0.022	0.130	0.022
MT-12/2008	0.000	0.000	0.000	0.176	0.029	0.000	0.235	0.000	0.000	0.000	0.265	0.029	0.029	0.176	0.059
MT-01/2009	0.000	0.000	0.028	0.056	0.000	0.111	0.444	0.000	0.000	0.000	0.222	0.000	0.000	0.111	0.028
RT-10/2009	0.000	0.000	0.000	0.061	0.000	0.000	0.415	0.037	0.000	0.000	0.232	0.012	0.024	0.146	0.073
MT-11/2009	0.000	0.000	0.000	0.053	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	0.000	0.158	0.053	0.026	0.158	0.053
MT-12/2009	0.000	0.000	0.000	0.206	0.000	0.000	0.294	0.000	0.000	0.000	0.206	0.059	0.059	0.059	0.118
RT-07/2008	0.000	0.000	0.000	0.138	0.000	0.000	0.483	0.000	0.000	0.000	0.172	0.034	0.052	0.086	0.034

**Locus: SFRA13**

Pop	Alelos																							
	232	246	248	250	252	254	256	258	260	262	264	266	268	270	272	274	276	278	280	282	284	286	288	290
RA-10/2007	0.111	0.000	0.000	0.014	0.028	0.014	0.056	0.042	0.042	0.069	0.000	0.069	0.000	0.056	0.014	0.014	0.139	0.069	0.028	0.069	0.056	0.000	0.056	0.028
RL-04/2009	0.000	0.022	0.022	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.283	0.087	0.022	0.000	0.022	0.043	0.000	0.000	0.043	0.109	0.130	0.022	0.022	0.022	0.065	0.087
MT-12/2008	0.000	0.000	0.000	0.029	0.029	0.000	0.000	0.000	0.118	0.088	0.059	0.029	0.000	0.088	0.088	0.000	0.000	0.029	0.059	0.088	0.118	0.059	0.059	0.059
MT-01/2009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.056	0.028	0.083	0.083	0.028	0.000	0.000	0.111	0.000	0.028	0.222	0.000	0.167	0.000	0.000	0.083	0.056	0.056
RT-10/2009	0.000	0.012	0.000	0.000	0.049	0.012	0.061	0.061	0.159	0.085	0.037	0.037	0.024	0.037	0.012	0.024	0.085	0.037	0.037	0.049	0.024	0.024	0.098	0.024
MT-11/2009	0.026	0.053	0.000	0.000	0.000	0.026	0.158	0.026	0.132	0.026	0.053	0.026	0.000	0.105	0.026	0.000	0.053	0.026	0.053	0.026	0.026	0.026	0.079	0.026
MT-12/2009	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.133	0.000	0.100	0.067	0.000	0.033	0.000	0.033	0.100	0.033	0.033	0.033	0.033	0.033	0.067	0.067	0.000	0.100	0.067
RT-07/2008	0.000	0.037	0.000	0.019	0.093	0.000	0.056	0.000	0.204	0.056	0.037	0.037	0.000	0.074	0.056	0.000	0.037	0.037	0.037	0.037	0.037	0.000	0.074	0.037
Pop	Alelos																							
	292	296	300																					
RA-10/2007	0.000	0.000	0.028																					
RL-04/2009	0.000	0.000	0.000																					
MT-12/2008	0.000	0.000	0.000																					
MT-01/2009	0.000	0.000	0.000																					
RT-10/2009	0.000	0.000	0.012																					
MT-11/2009	0.026	0.000	0.000																					
MT-12/2009	0.033	0.000	0.000																					
RT-07/2008	0.019	0.019	0.000																					

**Locus: SFRA14**

Pop	Alelos																		
	238	240	242	250	252	254	256	258	260	262	264	266	268	270	272	274	276	278	280
RA-10/2007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.057	0.057	0.129	0.086	0.143	0.086	0.143	0.014	0.029	0.043	0.000	0.000	0.100	0.114	0.000
RL-04/2009	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.056	0.111	0.333	0.028	0.056	0.056	0.083	0.000	0.000	0.000	0.028	0.028	0.139	0.000
MT-12/2008	0.000	0.000	0.088	0.029	0.029	0.029	0.059	0.088	0.206	0.029	0.059	0.088	0.059	0.029	0.000	0.000	0.029	0.176	0.000
MT-01/2009	0.028	0.028	0.028	0.000	0.000	0.083	0.139	0.222	0.111	0.028	0.056	0.167	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.083	0.000
RT-10/2009	0.000	0.000	0.057	0.014	0.000	0.057	0.129	0.229	0.043	0.043	0.157	0.057	0.043	0.014	0.000	0.000	0.000	0.157	0.000
MT-11/2009	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.028	0.167	0.333	0.083	0.139	0.083	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.083	0.028
MT-12/2009	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.056	0.111	0.250	0.111	0.083	0.056	0.028	0.000	0.000	0.028	0.028	0.083	0.111	0.000
RT-07/2008	0.060	0.000	0.120	0.040	0.040	0.020	0.200	0.140	0.180	0.120	0.040	0.020	0.000	0.000	0.000	0.020	0.000	0.000	0.000

**Lócus: SFRA15**

Pop	Alelos																							
	198	216	218	220	222	232	234	236	238	240	242	244	246	248	250	252	254	256	258	260	262	264	266	268
RA-10/2007	0.028	0.083	0.014	0.083	0.000	0.014	0.000	0.000	0.042	0.014	0.000	0.000	0.028	0.042	0.097	0.000	0.028	0.000	0.069	0.028	0.014	0.069	0.000	0.000
RL-04/2009	0.000	0.083	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.028	0.083	0.000	0.000	0.083	0.167	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	0.083	0.028	0.056
MT-12/2008	0.000	0.059	0.000	0.147	0.000	0.000	0.000	0.000	0.029	0.029	0.000	0.000	0.029	0.000	0.000	0.088	0.059	0.088	0.029	0.000	0.059	0.029	0.029	0.029
MT-01/2009	0.000	0.028	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.056	0.028	0.000	0.028	0.000	0.083	0.028	0.000	0.028	0.028	0.028	0.000	0.000	0.111	0.083	0.056	0.083
RT-10/2009	0.000	0.049	0.000	0.134	0.012	0.000	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.012	0.037	0.012	0.024	0.085	0.012	0.073	0.037	0.000	0.049	0.037	0.012	0.012
MT-11/2009	0.000	0.132	0.000	0.105	0.000	0.000	0.053	0.000	0.000	0.000	0.000	0.026	0.000	0.026	0.053	0.105	0.000	0.105	0.053	0.053	0.026	0.000	0.053	0.000
MT-12/2009	0.000	0.056	0.000	0.250	0.000	0.000	0.028	0.056	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.056	0.028	0.028	0.000	0.000	0.028	0.000	0.056	0.056	0.000	0.000
RT-07/2008	0.000	0.069	0.000	0.155	0.017	0.000	0.017	0.017	0.000	0.052	0.000	0.000	0.000	0.069	0.017	0.034	0.000	0.069	0.000	0.052	0.121	0.017	0.017	0.034
Pop	Alelos																							
	270	272	274	276	278	280	282	284	286	288	290	292	294	296										
RA-10/2007	0.056	0.083	0.069	0.028	0.042	0.014	0.000	0.000	0.028	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000										
RL-04/2009	0.056	0.000	0.000	0.000	0.056	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
MT-12/2008	0.029	0.029	0.059	0.000	0.029	0.059	0.059	0.000	0.029	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
MT-01/2009	0.000	0.028	0.111	0.000	0.000	0.056	0.028	0.028	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
RT-10/2009	0.073	0.049	0.049	0.024	0.012	0.037	0.049	0.000	0.012	0.000	0.012	0.012	0.000	0.012										
MT-11/2009	0.000	0.053	0.026	0.000	0.053	0.053	0.000	0.026	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000										
MT-12/2009	0.000	0.000	0.083	0.000	0.028	0.056	0.000	0.056	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000										
RT-07/2008	0.000	0.069	0.086	0.034	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000										

**Lócus: SFRA18**

Pop	Alelos							
	116	156	160	164	168	172	176	180
RA-10/2007	0.014	0.029	0.086	0.214	0.571	0.086	0.000	0.000
RL-04/2009	0.000	0.000	0.043	0.109	0.783	0.065	0.000	0.000
MT-12/2008	0.000	0.029	0.059	0.029	0.706	0.176	0.000	0.000
MT-01/2009	0.000	0.088	0.088	0.294	0.353	0.147	0.000	0.029
RT-10/2009	0.000	0.073	0.098	0.110	0.524	0.171	0.012	0.012
MT-11/2009	0.000	0.000	0.026	0.158	0.711	0.079	0.026	0.000
MT-12/2009	0.000	0.083	0.111	0.111	0.611	0.083	0.000	0.000
RT-07/2008	0.000	0.017	0.138	0.034	0.707	0.103	0.000	0.000

---

**Locus: BOM2**

Pop	Alelos									
	152	154	156	160	162	164	166	168	172	182
RA-10/2007	0.167	0.000	0.250	0.056	0.472	0.028	0.014	0.014	0.000	0.000
RL-04/2009	0.024	0.000	0.500	0.024	0.095	0.071	0.262	0.024	0.000	0.000
MT-12/2008	0.029	0.029	0.235	0.118	0.294	0.029	0.118	0.147	0.000	0.000
MT-01/2009	0.111	0.000	0.194	0.111	0.306	0.028	0.167	0.028	0.028	0.028
RT-10/2009	0.073	0.000	0.171	0.061	0.427	0.061	0.085	0.085	0.000	0.037
MT-11/2009	0.105	0.000	0.211	0.053	0.500	0.053	0.026	0.053	0.000	0.000
MT-12/2009	0.139	0.000	0.250	0.028	0.472	0.028	0.056	0.028	0.000	0.000
RT-07/2008	0.074	0.000	0.167	0.111	0.407	0.037	0.019	0.167	0.000	0.019