

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Varição genética em *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) na região do Alto Rio São Francisco, MG e contribuições para a conservação do grupo.

ALINE GALINDO NUNES

São Carlos
2010

Universidade Federal de São Carlos
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução

ALINE GALINDO NUNES

Varição genética em *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) na região do Alto Rio São Francisco, MG e contribuições para a conservação do grupo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética e Evolução.

Orientação: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

São Carlos
2010

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

N972vg

Nunes, Aline Galindo.

Variação genética em *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) na região do Alto Rio São Francisco, MG e contribuições para a conservação do grupo / Aline Galindo Nunes. -- São Carlos : UFSCar, 2011.
54 f.

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

1. Genética. 2. Conservação. 3. Peixe de água doce. 4. Variação (Genética). I. Título.

CDD: 575.1 (20^a)

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

**VARIAÇÃO GENÉTICA EM *SALMINUS HILARII*
(VALENCIENNES, 1849) NA REGIÃO DO ALTO RIO SÃO
FRANCISCO, MG E CONTRIBUIÇÕES PARA A
CONSERVAÇÃO DO GRUPO.**

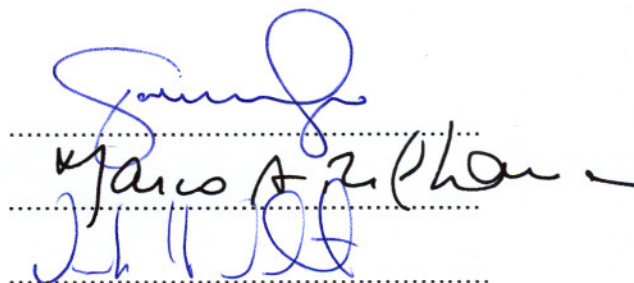
Dissertação de Mestrado de Aline Galindo Nunes

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Prof. Dr. Victor Hugo Valiati

The image shows three handwritten signatures in blue ink, each positioned above a horizontal dotted line. The top signature is a stylized cursive name. The middle signature is more legible, appearing to read 'Marco Antonio Del Lama'. The bottom signature is also a stylized cursive name.

Meus queridos pais, Vamberto e Márcia, a quem eu devo tudo o que sou. Ao meu namorado Guilherme, pelo carinho, compreensão e companheirismo. A vocês, que me incentivaram quando tudo parecia impossível e inatingível. Com muito amor e carinho, dedico esta vitória a vocês!

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Quero expressar aqui meus sinceros agradecimentos a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. A todas essas pessoas fica a minha eterna gratidão, em especial:

Ao meu orientador Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior, pela oportunidade, confiança, apoio e paciência.

Aos colegas e amigos da Citogenética, Laboratório de Genética de Aves, Laboratório de Genética de Populações e Evolução e em especial do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação por toda valiosa ajuda, paciência e sugestões.

Aos meus pais Vamberto e Márcia pelos sacrifícios e pela sabedoria com que me orientaram para a vida. Minhas irmãs, Láira e Tháís e meu sobrinho Gustavinho pela fonte inesgotável de alegria.

A toda minha família que sempre me deu apoio em todos os momentos da minha vida. Amo todos vocês!

Não poderia de deixar de agradecer a Henrique e Maria José pelo carinho e estímulo em todos os momentos.

Ao meu namorado Guilherme, por todos esses anos de muito carinho, amizade, companheirismo e felicidade. Por me dar forças nos momentos mais delicados e por me fazer acreditar sempre. Eu te amo muito!

A todos os amigos que estiveram comigo nessa batalha. Por toda amizade nas horas alegres e tristes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior CAPES pela bolsa concedida durante o mestrado.

Enfim, a Deus por tudo e por mais esta oportunidade.

Meu obrigado e meu carinho a todos.

RESUMO

O Rio São Francisco compõe uma das maiores e mais importantes bacias hidrográficas do território brasileiro e uma de suas principais características é a variedade da ictiofauna. O gênero *Salminus* (Characiformes: Characidae), constitui um grupo de peixes migradores com grande importância econômica, na pesca esportiva e na gastronomia. Dentro desse gênero, destaca-se *Salminus hilarii* (tabarana), devido ao seu alto grau de seletividade pelo ambiente e por ocupar o topo da cadeia alimentar. Isso confere à espécie uma grande importância para o ecossistema e a coloca na posição de uma boa indicadora de impactos ambientais. Muitos estudos sobre genética da conservação e de populações têm sido realizados utilizando marcadores moleculares, tais como os microssatélites, capazes de fornecer dados sobre os processos genéticos que estão atuando em uma determinada população. Esses marcadores possuem sequências flanqueadoras relativamente conservadas, o que permite a utilização de *primers* que foram desenhados originalmente para outra espécie em espécies filogeneticamente próximas. Assim, utilizando nove locos polimórficos de microssatélites isolados de *Salminus franciscanus*, o objetivo do presente estudo foi analisar a variação genética de *S. hilarii* coletados em três localidades na bacia do alto São Francisco e identificar evidências de estruturação populacional, produzindo conhecimentos genéticos aos estudos de conservação deste grupo de peixes e contribuindo de maneira efetiva para a manutenção da biodiversidade desse ecossistema. Os resultados obtidos evidenciaram que a amplificação heteróloga foi eficiente e permitiu identificar uma variação genética relativamente alta na espécie em estudo. Além disso, foi possível observar a ausência de estrutura genética entre as populações, indicando a ocorrência de fluxo gênico entre as populações suficiente para manter a homogeneidade genética entre elas. Esses resultados constituem ferramentas importantes, uma vez que contribuem para o entendimento do comportamento e biologia desses peixes, e para programas de manejo de pesca e conservação da tabarana.

Palavras-chave: peixe de água doce, tabarana, variação genética, conservação

ABSTRACT

The São Francisco river comprises one of the largest and most important river basins of Brazil and one of its main characteristics is the variety of fish species. The genus *Salminus* (Characiformes: Characidae) constitutes a group of migratory fish with great economic importance in fishing and gastronomy. Within this genus, *Salminus hilarii* (tabarana), due to its high degree of selectivity for the environment and to occupy the top of the food chain, of great importance to the ecosystem and a good indicator of environmental impacts. Many studies on conservation and population genetics have been conducted using molecular markers such as microsatellites, which can provide data on the genetic processes that are acting in a given population. These markers have relatively conserved flanking sequences, which allows the use of primers that were originally designed for other phylogenetically related species. In this study, nine polymorphic microsatellite loci isolated from *Salminus franciscanus* were used to assess the genetic variation of *S. hilarii* collected in three localities in the upper São Francisco river basin, aiming to evaluate the level of genetic variation and identify evidence of population structure, providing support for conservation of this group of fish and contributing effectively to maintain the biodiversity of this ecosystem. The cross amplification results were efficient and were able to identify a relatively high level of genetic variation. Moreover, it was possible to observe the absence of genetic structure between populations, suggesting the occurrence of gene flow between them enough to maintenance of the genetic homogeneity of this populations. These results are important tools, since they can provide information for understanding the behavior and biology of these fish to fisheries management and conservation programs.

Key-words: freshwater fish, tabarana, genetic variation, conservation

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. Introdução | 12 |
| 1.1. Bacia do Rio São Francisco | 12 |
| 1.2. Considerações gerais do gênero <i>Salminus</i> | 14 |
| 1.3. <i>Salminus hilarii</i> Valenciennes | 16 |
| 1.4. Utilização dos microssatélites em estudos populacionais..... | 18 |
| 2. Objetivos..... | 21 |
| 3. Justificativa..... | 22 |
| 4. Material e Métodos | 23 |
| 4.1. Extração de DNA total..... | 23 |
| 4.2. Isolamento dos locos de microssatélites | 24 |
| 4.3. Caracterização dos locos de microssatélites | 26 |
| 4.4. Transferibilidade dos locos | 27 |
| 4.5. Análises estatísticas | 27 |
| 5. Resultados..... | 30 |
| 5.1. Isolamento e caracterização dos locos de microssatélites..... | 30 |
| 5.2. Transferência dos locos de microssatélites | 32 |
| 5.3. Análises da diversidade genética de <i>Salminus hilarii</i> | 33 |
| 5.4. Análise da estrutura genética populacional de <i>Salminus hilarii</i> | 36 |
| 6. Discussão | 40 |
| 6.1. Isolamento e caracterização dos locos de microssatélites..... | 40 |
| 6.2. Transferibilidade dos locos de microssatélites | 41 |
| 6.3. Diversidade e estrutura genética de <i>Salminus hilarii</i> | 42 |
| 6.4. Implicações para conservação..... | 45 |
| 7. Conclusões..... | 46 |
| 8. Referências Bibliográficas..... | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Características dos 16 locos isolados de <i>Salminus franciscanus</i> | 31 |
| Tabela 2. Validação populacional de <i>S. franciscanus</i> | 32 |
| Tabela 3. Transferibilidade para <i>S. hilarii</i> | 33 |
| Tabela 4. Caracterização dos nove locos de microssatélites de <i>S. franciscanus</i> usados nos indivíduos de <i>S. hilarii</i> amostrados no Rio São Francisco..... | 34 |
| Tabela 5. Caracterização dos nove locos de microssatélites de <i>S. franciscanus</i> usados nos indivíduos de <i>S. hilarii</i> amostrados no Rio Samburá | 35 |
| Tabela 6. Caracterização dos nove locos de microssatélites de <i>S. franciscanus</i> usados nos indivíduos de <i>S. hilarii</i> amostrados no Rio do Peixe..... | 36 |
| Tabela 7. Valores de F_{ST} e valores de P entre três amostragens de <i>S. hilarii</i> . RSF = Rio São Francisco; SAM = Rio Samburá; RPX = Rio do Peixe..... | 37 |
| Tabela 8. Valores de F_{ST} e valores de P entre três amostragens de <i>S. hilarii</i> , após a retirada dos locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg . RSF = Rio São Francisco; SAM = Rio Samburá; RPX = Rio do Peixe | 37 |
| Tabela 9. Probabilidade da ocorrência de desequilíbrio de ligação (P) entre os nove locos, considerando as três amostragens conjuntamente, ajustados pela correção sequencial de Bonferroni ($P \leq 0,001389$)..... | 39 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Bacia do Rio São Francisco | 13 |
| Figura 2. Regiões fisiográficas da Bacia do São Francisco..... | 14 |
| Figura 3. Mapa da América do Sul, mostrando a distribuição do gênero <i>Salminus</i> | 16 |
| Figura 4. Aspecto morfológico de um indivíduo da espécie <i>S. hilarii</i> | 17 |
| Figura 5. Mapa do leste da América do Sul, mostrando a distribuição de <i>Salminus hilarii</i> ... | 18 |
| Figura 6. Pontos de coleta na bacia do alto São Francisco..... | 23 |
| Figura 7. Esquema ilustrando a incorporação de fluorescência aos fragmentos de DNA amplificados por PCR, utilizando o protocolo desenvolvido por Schuelke (2000) | 26 |
| Figura 8. Porcentagens dos locos isolados | 30 |
| Figura 9. Estrutura <i>bar plot</i> representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam cada população | 36 |
| Figura 10. Estrutura <i>bar plot</i> representando a atribuição dos genótipos para cada população, após a retirada dos locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. As cores representam cada população..... | 37 |
| Figura 11. (a) Resultados das estimativas de $\ln(P(X/K))$ versus o número de populações (K), analisados no Structure 3.3 (b) Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno <i>et al.</i> , 2005 | 38 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Bacia do Rio São Francisco

A bacia do Rio São Francisco abrange uma área total de 631.133 Km², equivalendo a 7,4% do território nacional (PAIVA, 1982; 1983) (Figura 1). O Rio São Francisco possui 2.780 Km de extensão, sendo considerado o maior curso d'água totalmente brasileiro (SILVA et al., 2003), banhando sete estados e 503 municípios (CODEVASF, 2009). No que diz respeito à localização de sua nascente, o documento emitido pela Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (CODEVASF) em 2006 delimita sua verdadeira posição no rio Samburá, situado na Serra da Confusão, sudoeste do Estado de Minas Gerais, devido a sua calha mais larga e ter maior vazão na confluência. Por outro lado, a nascente histórica ainda é considerada pertencente ao Parque Nacional da Serra da Canastra. O rio desemboca no Oceano Atlântico, entre os estados de Sergipe e Alagoas, tendo cerca de 83% de sua área residente em Minas Gerais e Bahia, uma área com, aproximadamente, 13 milhões de habitantes (PETRERE, 1989; CAPPIO et al., 1995).



Figura 1. Bacia do Rio São Francisco. **Fonte:** PEIXES E PESCA NO RIO SÃO FRANCISCO, 2009.

A bacia do Rio São Francisco tem sido esquematicamente dividida em quatro regiões fisiográficas, como é mostrado na Figura 2, sendo elas: Alto São Francisco (da nascente até a cidade de Pirapora-MG, embora a construção da barragem de Três Marias interrompeu essa região no município de Três Marias), Médio São Francisco (Pirapora a Remanso-BA), Submédio São Francisco (Remanso a Paulo Afonso-BA) e Baixo São Francisco (Paulo Afonso ao Oceano Atlântico). O Alto São Francisco abrange as sub-bacias dos Rios das Velhas, Pará, Indaiá, Abaeté e Jeiquiá. O divisor a leste é formado pelas montanhas da Serra do Espinhaço e a oeste pela Serra Geral de Goiás. Esta região está, portanto, inteiramente contida no estado de Minas Gerais (CODEVASF, 2009).

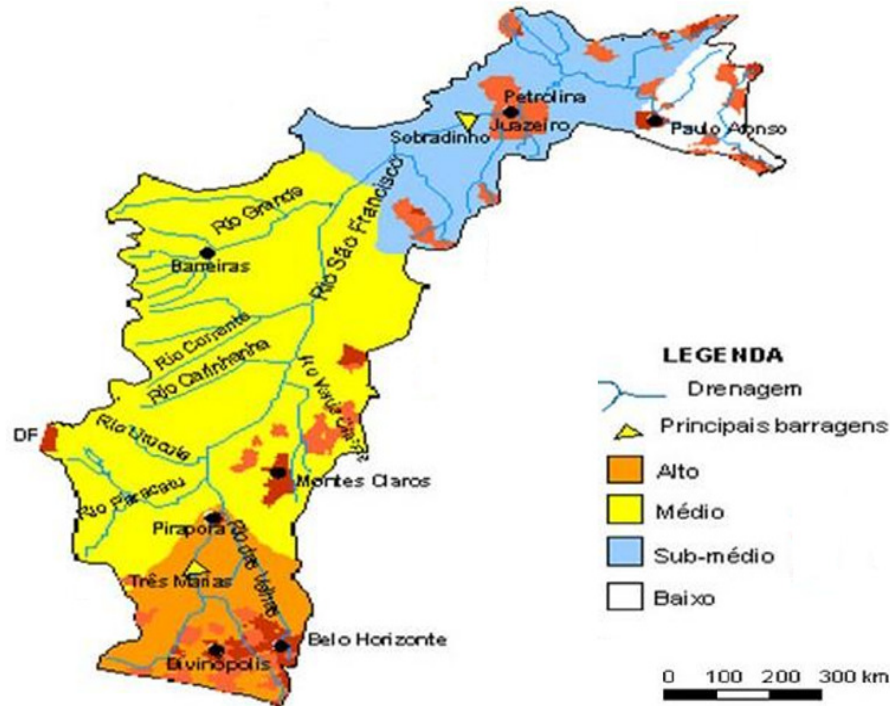


Figura 2. Regiões fisiográficas da Bacia do São Francisco. **Fonte:**

www.soberania.org/Articulos/articulo_3285.htm

O Rio São Francisco está fragmentado por reservatórios, sendo o de Três Marias um dos maiores. A barragem possui 75 metros de altura e não dispõe de nenhum mecanismo para passagem de peixes, fragmentando efetivamente o rio em duas partes (início das obras – 1957. Fim das obras – 1961. Início da operação – 1962). Segundo Sato e Godinho (1999), sua ictiofauna é composta por 152 espécies, sendo muitas dessas espécies caracterizadas pelo alto grau de endemismo. Cerca de 8% dessas espécies migram para reproduzir-se. Isso ocorre geralmente após grandes períodos de chuvas, pois é quando o nível do rio está em ascensão, com as águas bastante turvas e oxigenadas, garantindo assim a proteção dos ovos e larvas contra predadores e quantidade necessária de oxigênio para a fase inicial de desenvolvimento (KRAMER, 1978; BUSSING, 1993).

Grande parte dos peixes de importância para a pesca é de piracema, isto é, realizam migrações anualmente entre os locais de alimentação e reprodução. As barragens hidroelétricas, desta forma, têm sido uma das principais causas da diminuição da pesca por impedir o livre deslocamento dos peixes de piracema entre esses dois pontos (GODINHO et al, 2007).

1.2. Considerações gerais do gênero *Salminus*

Dentre os Characiformes, o gênero *Salminus* está agrupado na família Characidae, que compõe aproximadamente 55% dos peixes dessa ordem. Embora muitos grupos dentro da ordem Characiformes tenham sido objeto de vários estudos de taxonomia e sistemática, o conhecimento das relações filogenéticas da maioria de seus táxons é muito restrito. Assim,

ainda que a maior parte das famílias que compõem a ordem Characiformes já possa ser identificada por caracteres sinapomórficos (REIS et al., 2003), Characidae é, atualmente, reconhecida como uma família não monofilética.

Este gênero é caracterizado por predadores de médio a grande porte, ictiófagos e que habitam principalmente os grandes rios (BRITSKI, 1988; TAKAHASHI, 2006), sendo representado por cinco espécies (LIMA, 2006) e apresentando a seguinte posição taxonômica:

Reino: Animalia
 Filo: Chordata
 Classe: Actinopterygii
 Ordem: Characiformes
 Família: Characidae
 Gênero: *Salminus*
 Espécies: *Salminus affinis* Steindachner, 1880
 Salminus brasiliensis (Cuvier, 1816)
 Salminus hilarii Valenciennes, 1850
 Salminus iquitensis (Nakashima, 1941)
 Salminus franciscanus

Segundo Godoy (1975), as espécies de *Salminus* são muito similares, tanto em cor, como em forma e tamanho. Entretanto, *S. affinis* é mais parecida com a espécie *S. iquitensis*, que também é a espécie mais próxima filogeneticamente, tendo um colorido claro com brilho prateado; nadadeira caudal vermelha; nadadeiras dorsal, anal, adiposa, peitorais e pélvicas alaranjadas. *S. brasiliensis* e *S. franciscanus* são os únicos legítimos dourados, sendo as demais espécies de *Salminus* prateadas em vida. Essas duas espécies se diferenciam entre si principalmente pela contagem de escamas ligeiramente maior em *S. brasiliensis*. *S. hilarii* se diferencia das demais principalmente por apresentar menor número de escamas na linha lateral e nas séries transversais (LIMA, 2006).

As espécies desse gênero possuem ampla distribuição geográfica, ocorrendo nas bacias da Amazônia, Orinoco, La Plata e do Rio São Francisco, na América do Sul cisandina, no Rio Magdalena e em algumas outras drenagens em porções transandinas do continente (LIMA; BRITSKI, 2007) (Figura 3). Entretanto, *S. franciscanus* está restrita à bacia do Rio São Francisco, tendo sido descrita recentemente por Lima e Britski (2007) como uma espécie válida.

Os representantes do gênero *Salminus* são peixes de água movimentada, comumente encontrados na boca de cachoeiras, choros d'água e corredeiras (SANTOS, 1987). Realizam migrações periódicas para alimentação, nos lares de alimentação, ou para reprodução, em busca dos chamados lares de reprodução (GODOY, 1975). Procriam no leito dos rios em

estações chuvosas, apresentando período reprodutivo altamente sazonal, alta fecundidade, ovos livres e ausência de cuidado parental. (AGOSTINHO; JÚLIO JR, 1999; SATO; TAKAHASHI, 2006).



Figura 3. Mapa da América do Sul, mostrando a distribuição do gênero *Salminus*. Fonte: LIMA; BRITISKI, 2007.

1.3. *Salminus hilarii* Valenciennes, 1849

Salminus hilarii, popularmente conhecida como dourado branco, tubarana ou tabarana, foi descrita cientificamente há tempos (a primeira vez foi em 1849 por Valenciennes). Estes peixes são planctófagos nas primeiras fases da vida larval, na fase de alevino, passam a ser insetívoro e, posteriormente, nas fases de jovem e adulto, tornam-se carnívoros (piscívoros) (GODOY, 1975).

Agostinho *et al.* (2004b) destacam essa espécie por ser uma das migradoras na região do alto Paraná, considerada como peixe de piracema e reofílico. Aspectos do ciclo reprodutivo de *S. hilarii* estudados em diversas bacias mostraram que o período reprodutivo

acontece entre o final da primavera e do verão (GODOY, 1975; TAKAHASHI, 2006). Este período coincide com as épocas mais quentes e chuvosas, sendo este um padrão adotado por diversas espécies de Characiformes na região Sudeste do Brasil (VAZZOLER; MENEZES, 1992). A Figura 4 abaixo representa uma ilustração de um indivíduo dessa espécie.

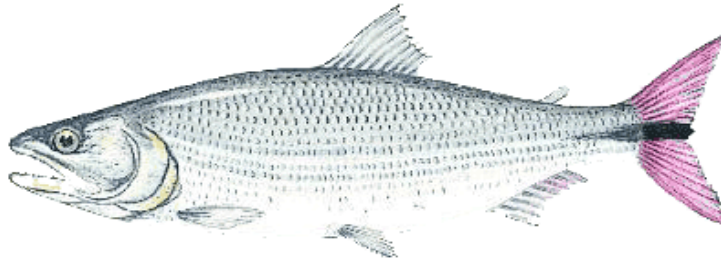


Figura 4. Aspecto morfológico de um indivíduo da espécie *S. hilarii*. Fonte: BRASIL PESCARIAS, 2009

A tabarana difere das outras espécies de *Salminus* por possuir um colorido em geral cinza, mais claro ventralmente, com brilho prateado; nadadeira caudal vermelha; nadadeiras peitorais, pélvicas, dorsal e anal são levemente tingidas de vermelho (LIMA, 2006). A nadadeira caudal é pouco furcada, com mancha negra ao longo dos raios medianos (GODOY, 1975). Esta espécie ocorre na bacia do Rio Paraná (estados de Goiás, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná), bem como no Paraguai (rios Monday e Acary) e na bacia do alto Rio São Francisco (estado de Minas Gerais e Distrito Federal) (LIMA, 2006). Também há registros de ocorrência dessa espécie na Argentina, Rio Iguazu, abaixo das cataratas e ainda na bacia do Rio Jaguaribe, estado do Ceará (FOWLER, 1941; LÓPEZ et al., 2003) (Figura 5).

Vários autores discutem que a tabarana pode ser utilizada como uma boa indicadora ambiental, dado o seu alto grau de seletividade pelo ambiente (necessitam de águas ricas em oxigênio) e por ser uma espécie predadora do topo de cadeia alimentar (CETRA, 2003; LIMA-JÚNIOR, 2003). Além disso, constitui um importante recurso pesqueiro, sendo emblemática para o rio São Francisco, pois se desloca por longas distâncias na bacia. Contudo, por se tratar de um peixe de piracema, corre grande risco de redução na sua população em função de ações antrópicas. Não só a tabarana, como toda a ictiofauna da bacia do Rio São Francisco, encontra-se bastante ameaçada, principalmente devido à poluição, assoreamento, desmatamento ciliar, construção de barragens, poluição industrial e doméstica e drenagens para aproveitamento agrícola, os quais causam comprometimento ou desequilíbrio dos ambientes naturais onde esses peixes ocorrem (SATO; GODINHO, 1999).



Figura 5. Mapa do leste da América do Sul, mostrando a distribuição de *Salminus hilarii*. **Fonte:** LIMA; BRITISKI, 2007

1.4. Utilização dos microssatélites em estudos populacionais

A utilização de metodologias moleculares em estudos sobre populações naturais e cultivadas de peixes tem aumentado nesses últimos anos, possibilitando o estudo genético de espécies ameaçadas de extinção. Atualmente, diversos marcadores moleculares estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética, dentre os quais, destacam-se os microssatélites (TAUTZ; RENS, 1984). As alozimas, as sequências de DNA mitocondrial e nuclear são outros exemplos de marcadores moleculares que têm sido empregados para determinar muitos parâmetros de interesse para a ecologia, tais como: identificação do tamanho efetivo populacional, estrutura populacional, nível de fluxo gênico, expansão e contração populacional, relações filogenéticas, padrões de biogeografia histórica e análise de parentesco, entre outras (FÉRAL, 2002; SELKOE; TOONEM, 2006).

De acordo com Oliveira *et al.* (2006), os microssatélites, também conhecidos como *Simple Sequence Repeats* (SSR) ou *Short Tandem Repeats* (STR), têm sido a classe de marcadores moleculares mais utilizados em genética da conservação e genética de populações, principalmente ao tipo de informações fornecidas para estudos de estimativas de migração, para distinguir entre altas taxas de migração e panmixia, e para estimar a relação de parentesco entre os indivíduos. Os microssatélites correspondem a unidades nucleotídicas de 1 a 6pb, repetidas em *tandem* e distribuídas através dos genomas de eucariotos e procariotos (TAUTZ; RENZ, 1984; TAUTZ, 1989). Os microssatélites são classificados de acordo com o número de nucleotídeos presentes nas unidades repetitivas em mononucleotídeos, dinucleotídeos, trinucleotídeos, tetranucleotídeos, pentanucleotídeos e hexanucleotídeos. Em relação à composição das unidades repetitivas, eles são divididos em quatro tipos: perfeitos, quando a sequência repetitiva não é interrompida por qualquer base (por exemplo: CTCTCTCTCTCTCT); imperfeitos, quando há um par de bases entre a unidade repetitiva (por exemplo: CTCTCTCTATCTCTCTCTCT); interrompidos, quando há uma pequena sequência dentro da unidade repetitiva (por exemplo: CTCTCTCTACTGCTCTCTCT); e compostos, os quais contêm duas unidades repetitivas adjacentes (por exemplo: CTCTCTCTCTCTATATATATATATAT) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

As taxas de mutação dos microssatélites são extremamente altas, aproximadamente 10^{-3} eventos por loco por geração (JARNE; LAGODA, 1996). Esta alta taxa de mutação pode ser explicada, principalmente, pelo pareamento errado após o deslizamento ou *slippage* da DNA polimerase durante a replicação (LEVINSON; GUTMAN, 1987), ou pelo *crossing-over* desigual (SMITH, 1976).

O sucesso de tais marcadores nos estudos genéticos populacionais se deve à sua abundância, grande distribuição no genoma e por permitir a detecção de alto grau de polimorfismo, além da sua herança mendeliana e de se tratar de marcadores co-dominantes, sendo possível a visualização de ambos os alelos em um indivíduo heterozigoto. Esses fatores, combinados ao multialelismo dos microssatélites, os colocam como o marcador molecular com maior conteúdo de informação de polimorfismo (O'REILLY; WRIGHT, 1995; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além disso, o relativo conservadorismo das sequências flangeadoras dos microssatélites permite a utilização de *primers* heterólogos (desenhados originalmente para outra espécie) entre espécies filogeneticamente próximas. Em genomas animais, a constatação da conservação desses sítios em espécies relacionadas torna possível, em alguns casos, a transferência de marcadores entre espécies de mesmo gênero (FERREIRA; GRATAPAGLIA, 1996; MIA *et al.*, 2005).

Segundo Yan *et al.* (2005), nas últimas décadas, as análises por microssatélites expandiram devido à sua grande sensibilidade em detectar variações genéticas dentro e entre populações. Eles são sensíveis indicadores da homozigose resultante de cruzamentos consanguíneos e, deste modo, aplicáveis na distinção de sutis diferenciações populacionais. Diversos estudos demonstram que este tipo de marcador é ideal para avaliar a variabilidade genética de populações naturais de peixes (HATANAKA; GALETTI JR, 2003; CARVALHO-COSTA *et al.*, 2006; SANCHES; GALETTI JR, 2006; SANCHES; GALETTI JR, 2007).

A aplicação destes marcadores em estudos do grupo *Salminus* possui grande importância, visto que estudos atuais mostram que espécies de peixes migradores, em diferentes bacias hidrográficas, podem apresentar padrões distintos de estruturação genética, distribuindo-se em grandes e únicas populações genéticas panmíticas (REVALDAVES *et al.*, 1997) ou em diversas populações geneticamente diferenciadas (WASCO; GALETTI JR, 2002; HATANAKA; GALETTI JR, 2003; HATANAKA *et al.*, 2006). Assim, destaca-se a suma importância de estudos que possam contribuir para a identificação de unidades relativas e subdivisão de populações panmíticas em metapopulações, cuja integridade deve ser preservada, visando conservação destas espécies.

2. OBJETIVOS

O presente estudo tem como objetivo:

- Testar a transferência de locos de microssatélites entre as espécies *S. francicanus* e *S. hilarii*;
- Avaliar a variação genética de *S. hilarii* na região do Alto São Francisco e identificar evidências de estruturação populacional;
- Produzir conhecimentos aos estudos de conservação deste grupo de peixes, contribuindo de maneira efetiva para a manutenção da biodiversidade desse ecossistema.

3. JUSTIFICATIVA

O declínio da diversidade biológica aquática não deve ser preocupante somente pela queda do número de indivíduos de uma espécie, mas primeiramente pela perda de sua variabilidade populacional (HILSDORF, 1997). Em alguns sistemas hidrográficos, tem sido observada uma redução do número de indivíduos nas populações locais de algumas espécies de peixes migradores que, possivelmente, podem estar ameaçadas de extinção devido a diversas ações antrópicas. Tendo em vista a importância ecológica e econômica do grupo dos dourados, é relevante reconhecer as unidades genéticas existentes para a contribuição em programas de conservação. Estes estudos tornam-se ainda mais úteis, pois apesar do comportamento de migração de alguns peixes, estudos recentes mostram que espécies em diferentes bacias hidrográficas podem apresentar padrões distintos de estruturação genética.

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

4. MATERIAL E MÉTODOS

Foram coletadas amostras de nadadeiras de 44 indivíduos de *Salminus hilarii* na bacia do Alto São Francisco, sendo seis no Rio Samburá (Medeiros, MG), seis no Rio do Peixe (São Roque de Minas, MG) e 32 no Rio São Francisco (Figura 6). As amostras foram armazenadas em etanol 100% a -20°C para posterior extração do DNA genômico.

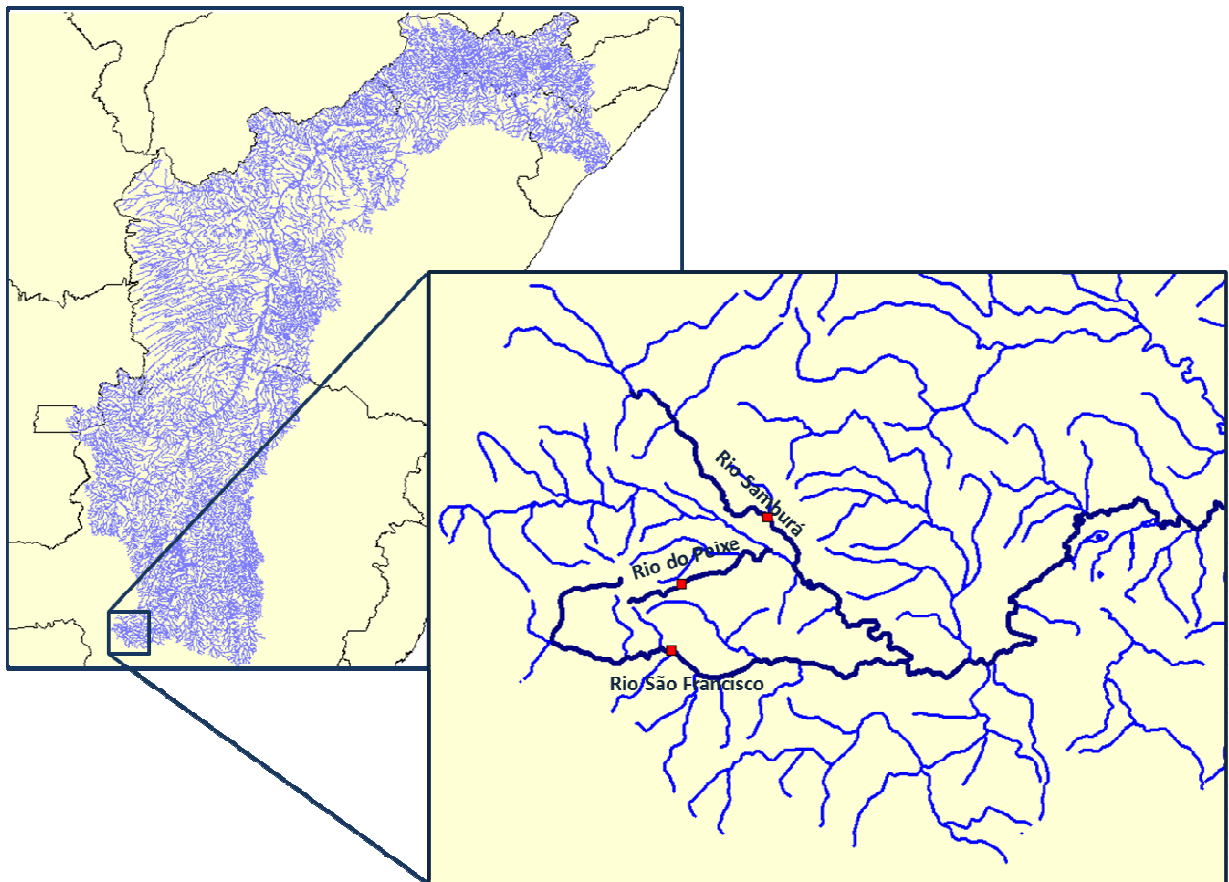


Figura 6. Pontos de coleta na bacia do alto São Francisco.

4.1. Extração de DNA total

A extração do DNA genômico total foi realizada com fenol:clorofórmio, seguindo o protocolo de Sambrook (1989) com modificações, onde um pedaço do tecido de aproximadamente 0,5 cm² foi submetido a digestão em solução de lise (NaCl 0,4M, EDTA 0,1M, Proteinase K 100µg/ml, SDS 0,1%), posterior purificação do DNA com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e precipitação com etanol absoluto. O DNA foi ressuspendido em 50µl de água MilliQ e tratado com RNase (100µg/ml). Após a extração, as

amostras de DNA foram quantificadas em gel de agarose 1% imerso em tampão TBE 1x (Tris-Base, Ácido Bórico, EDTA), contendo brometo de etídeo (0,5 µg/ml), usando o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen) como parâmetro de quantificação. Após a quantificação, alíquotas de 50ng foram confeccionadas e estocadas a – 20°C para posteriormente serem testadas em reações em cadeia da polimerase (PCR – Polymerase Chain Reaction).

4.2. Isolamento dos locos de microssatélites

É necessário esclarecer que, no início do presente trabalho encontrava-se em andamento a prospecção de microssatélites na espécie do mesmo gênero *Salminus franciscanus* e que foi prestado um auxílio na continuidade do trabalho em paralelo, incorporando-o na descrição dos resultados finais.

Para prospecção dos locos de *S. franciscanus*, utilizou-se uma amostra de nadadeira de um indivíduo, proveniente do Rio São Francisco, coletado no município de Três Marias, Minas Gerais.

O isolamento dos microssatélites foi realizado através de uma biblioteca genômica parcial enriquecida de acordo com o protocolo de Hamilton *et al.*(1999). Uma amostra contendo 20µl de DNA com concentração de 200 ng foi clivada com as enzimas de restrição *Rsa I* e *BstU I*; os fragmentos com tamanho entre 200 e 1000pb foram cortados do gel de agarose 0,8% e eluídos.

Esses fragmentos digeridos foram ligados a oligonucleotídeos de sequências conhecidas (*linkers*), os quais servem de sítios para a ligação de iniciadores para subsequentes PCRs e posterior ligação a vetores para clonagem. Os fragmentos de DNA contendo os *linkers* foram hibridizados a um conjunto de oito sondas biotinizadas de sequência repetitivas para microssatélites tetranucleotídeos. Aqueles fragmentos que hibridizaram com as sondas são os que contêm potenciais locos de microssatélites. Em seguida, foram feitas lavagens em uma solução com partículas paramagnéticas ligadas a uma molécula de estreptavidina, a qual se liga a biotina presente nas sondas. Os fragmentos hibridizados (possivelmente contendo sequências de microssatélites) foram então recuperados com o auxílio de uma coluna magnética. Realizou-se uma nova PCR utilizando os fragmentos enriquecidos de microssatélites para aumentar a quantidade.

O DNA enriquecido foi ligado a vetores utilizando o kit pGem-T Easy Vector (Promega), de acordo com as especificações do fabricante. A ligação foi feita por choque

térmico em células competentes de *Escherichia coli*, linhagem DH5 α , e plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina, X-Gal 2% e IPTG 2,3%. As bactérias cresceram por 15h a 37°C e os clones positivos foram selecionados para crescimento das colônias em meio CG com ampicilina por 24h a 37°. Na etapa posterior, os plasmídeos contendo os fragmentos clonados foram extraídos das bactérias e enviados para a empresa Macrogen Inc, localizada na Coréia do Sul, a qual realizou o sequenciamento em um sequenciador automático ABI3730XL.

As seqüências obtidas foram analisadas no programa CID (FREITAS et al., 2008), disponível em <http://www.shrimp.ufscar.br/cid/index.php>. Esse programa é um compilado de programas que, além de verificar a qualidade do eletroferograma gerado no seqüenciamento por meio do programa Phred, retira as seqüências dos vetores usados na clonagem, identifica os possíveis microsatélites e constrói pares de *primers* para as seqüências com microsatélites identificados.

A síntese dos *primers* e marcações foram realizadas segundo o protocolo de Schuelke (2000). Este protocolo consiste da adição de uma cauda universal de 18 bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) na porção 5' de um dos *primers* (*Forward* ou *Reverse*)(Figura 7). A determinação do *primer* que recebeu a cauda foi baseada no resultado de uma análise da possibilidade de ocorrer *hairpin*, auto e heterodímeros, realizada pelo programa Integrated DNA Technologies (IDT), disponível em www.idtdna.com. Esta cauda serve de sítio de hibridização para um iniciador universal M13 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), o qual é marcado com fluorescência. Deste modo, o *primer* marcado com fluorescência, que possui alto custo, pode ser utilizado para outros pares de *primers* de diversos locos, pois sua função é apenas inserir a fluorescência ao fragmento previamente amplificado.

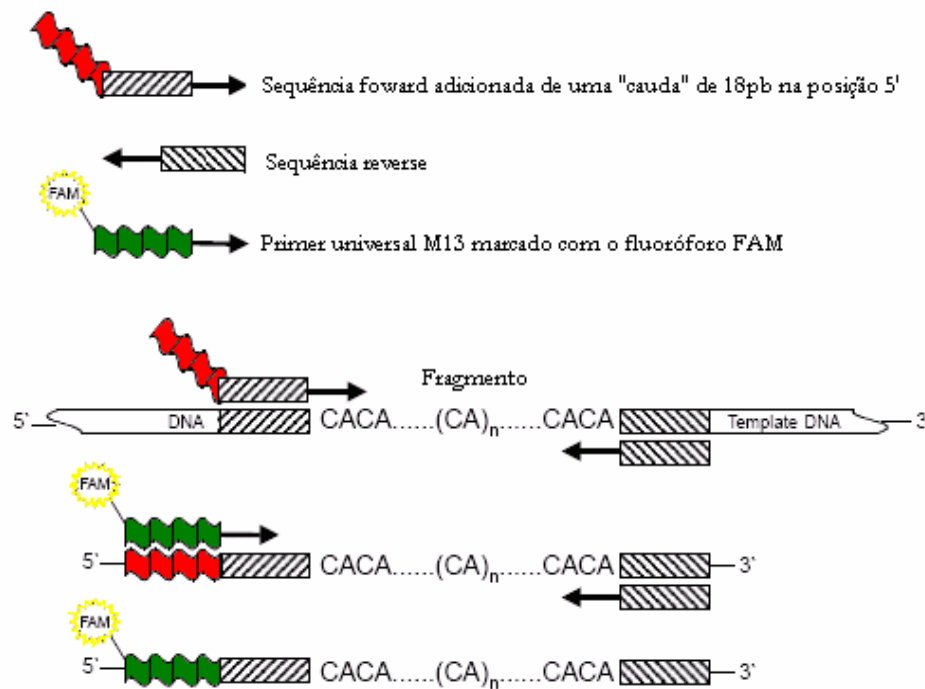


Figura 7. Esquema ilustrando a incorporação de fluorescência aos fragmentos de DNA amplificados por PCR, utilizando o protocolo desenvolvido por Schuelke (2000).

4.3. Caracterização dos locos de microssatélites

Amostras de 25 indivíduos de *Salminus franciscanus* coletados à jusante da barragem de Três Marias foram usadas para a caracterização dos locos isolados.

Depois de extraído o DNA total, foi realizada PCR em volume final de 10µL, utilizando 5µL de *GoTaq Colorless Master Mix* (Promega), contendo 1,5mM de MgCl₂ e 200µM de cada dNTP; 1µL do *primer* M13 com fluorescência FAM, TET ou HEX, à concentração de 8pmol/µL; 1µL do *primer* sem a cauda à 8pmol/µL; 1µL do *primer* com a cauda M13 a 2pmol/µL; e 1µL de DNA a 50ng. Inicialmente, utilizou-se um termociclador de gradiente de temperatura com o propósito de ajustar a temperatura ideal para o anelamento de cada par de *primer*. Determinadas essas temperaturas, foi realizada a PCR para cada par de locos, com a temperatura adequada, utilizando todos os indivíduos. Os ciclos utilizados na PCR encontram-se descritos a seguir: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 45 segundos; anelamento à temperatura específica do par de *primers* por 45 segundos; e extensão a 72°C por 45 segundos. Posteriormente, iniciaram-se outros 10 ciclos com a temperatura ideal de hibridização da sequência da cauda M13 para aumentar a eficácia de sua hibridação aos produtos da PCR anterior. Estes ciclos foram de desnaturação a 94°C por 30 segundos; anelamento a 53°C por 45 segundos; extensão a 72°C por 45

segundos; extensão final a 72°C por 10 minutos e mantido a 4°C até armazenamento em freezer -20°C.

Os produtos obtidos pela PCR foram analisados em gel de agarose 3%, corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz UV. Empregou-se um marcador de peso molecular de 1Kb para verificar o tamanho dos fragmentos, possibilitando a verificação da amplificação das amostras e uma análise prévia da existência de polimorfismo para o loco em questão. As amostras foram armazenadas para, posteriormente, serem genotipadas.

Os fragmentos amplificados com a fluorescência foram genotipados em um seqüenciador automático MegaBace pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil) e analisados com o programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science), onde os alelos foram visualizados. Os genótipos dos locos polimórficos obtidos foram utilizados para a realização das análises estatísticas.

4.4. Transferibilidade dos locos

Assim, após a conclusão do isolamento dos locos de microssatélites de *S. franciscanus* esses foram testados para transferibilidade em *S. hilarii* e, posteriormente, usados para as análises da variação genética.

As condições de PCR usadas foram as mesmas descritas no item 4.3, testando primeiramente um gradiente de temperatura para ajustar a temperatura ideal para o anelamento de cada par de *primers*.

Os produtos obtidos pela PCR foram analisados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Empregou-se um marcador de peso molecular de 1 Kb para verificar o tamanho dos fragmentos. Os fragmentos amplificados foram genotipados da mesma forma descrita no item acima.

4.5. Análises estatísticas

A variação genética da população de *S. hilarii* foi estudada utilizando nove locos de microssatélites polimórficos de *S. franciscanus* (SFRA 02, SFRA 03, SFRA 04, SFRA 05, SFRA 10, SFRA 13, SFRA 14, SFRA 15 e SFRA 18).

As análises estatísticas desses locos polimórficos foram realizadas, primeiramente, com o *software Genepop* versão 3.4, disponível em <http://genepop.curtin.edu.au/>, onde foi

calculado o número de alelos por loco, heterozigosidade esperada e observada, a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o Nm (número de migrantes). O mesmo programa foi utilizado para calcular a ocorrência de desequilíbrio de ligação entre os locos, para isso, foram feitas tabelas de contingência para cada par de locos, utilizando o *Fisher Exact Test*.

Para as análises de diversidade genética (NEI, 1987) e da riqueza alélica (PETIT et al., 1998) foi usado o *software* FSTAT (GOUDET, 1995). Esses valores são independentes do tamanho amostral e podem ser comparados mesmo entre amostras de tamanhos diferentes, ao contrário dos valores obtidos com a heterozigosidade e número de alelos.

Ainda através do FSTAT foram calculadas as estimativas do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) (WEIR; COCKERHAM, 1984), a fim de verificar se os valores F_{IS} diferiam significativamente de zero, populações de genótipos foram recriadas aleatoriamente através do programa, partindo da hipótese nula de união aleatória de gametas. Os valores de F_{IS} presentes nesta distribuição que foram maiores que o valor observado (P_L) nos indica se há ou não déficit de heterozigotos. Ao contrário, a proporção de valores de F_{IS} menores que o valor observado (P_S) nos indica se há excesso de heterozigotos.

A existência de diferenciação genética entre as populações foi estimada através dos valores de F_{ST} (WEIR; COCKERHAM, 1984). Tal estimativa se baseia no modelo de alelos infinitos (KIMURA; CROW, 1964), para seus cálculos recriando populações de genótipos para verificar se os valores diferem significativamente de zero. A significância dos valores encontrados foi avaliada por meio das randomizações estipuladas no próprio programa. A existência de diferenciação significativa quanto à distribuição gênica e genotípica entre as populações foi verificada com a utilização do *software* FSTAT. Para se testar a hipótese nula de que a “distribuição alélica ou genotípica é idêntica entre as populações” tabelas de contingência são construídas e no caso da diferenciação gênica, é utilizado o teste exato de Fisher, para a diferenciação genotípica, o teste G (GOUDET et al., 1996) e os valores de “p” estimados pela cadeia de Markov.

O F_{ST} , além de ser o índice mais utilizado para estimar a distância genética entre populações de peixes (O’CONNEL; WRIGHT, 1997), é o mais indicado em estudos que contenham amostras de tamanho moderado a pequeno (menor que 50) e utilize menos do que 10 locos (GAGGIOTTI et al., 1999).

A análise de agrupamento bayesiano para avaliar a existência de estruturação populacional foi examinada utilizando o programa Structure 3.3 (PRITCHARD et al., 2000). O número de populações (K) foi estimado utilizando o modelo *admixture* com alelos correlacionados, com K variando de 1 a 5. De acordo com Martien *et al.* (2007), o modelo

admixture é apropriado para populações que apresentaram ou ainda apresentam fluxo gênico em taxas suficientes para que os indivíduos possam ter ancestrais de mais de uma população. Os autores também explicam o modelo de alelos correlacionados, que pressupõe que as populações divergiram de um ancestral comum e as diferenças em suas frequências alélicas são o resultado de deriva que ocorreu desde sua divergência. Para determinar o número real de populações, escolhemos o valor de K que maximiza o modelo de probabilidades estimadas $\ln(P(X|K))$. $P(X|K)$ equivale à probabilidade de observar os dados (X) condicionados ao número de populações (K). Porém, segundo Evanno *et al.* (2005), a estimativa $\ln(P(X|K))$ não fornece um número correto de grupos (K) na maioria dos casos em que a dispersão entre as populações não é homogênea. Por isso, como sugerem os autores, utilizamos uma estatística fundamentada no *delta K*, que se baseia na taxa de mudança no $\ln(P(X|K))$ entre sucessivos valores de K .

Em todas as análises múltiplas efetuadas foi feita correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989) para confirmar as significâncias dos resultados encontrados. A correção de Bonferroni é um ajuste estatístico para o nível de significância ($\alpha = 0,05$) em relação ao número de testes realizados, simultaneamente, em um conjunto de dados.

Para os locos que apresentaram desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o programa *Micro-checker* (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004) para identificar a possível causa desses desvios através da presença de alelos nulos.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e caracterização dos locos de microssatélites

A construção da biblioteca enriquecida forneceu 192 clones positivos e foi realizado o sequenciamento de 96 clones, dos quais 41 (42,7%) sequências continham microssatélites. Contudo, devido ao fato de algumas sequências apresentarem mais de uma região repetitiva, foram identificados 66 locos de microssatélites, sendo, 43 perfeitos e 23 compostos. Deste total, 38 possuíam regiões flanqueadoras adequadas para construção dos pares de *primers*. Por fim, foram construídos e testados 16 pares de *primers*, sendo que dez apresentaram padrão de amplificação polimórfico, cinco foram monomórficos e um não foi eficiente por não render produto de amplificação (Figura 8). A Tabela 1 descreve as características de cada loco (o nome do loco, a unidade repetitiva, a sequência dos *primers*, o tamanho do fragmento, a amplitude em pares de bases, presença de polimorfismo e o número de acesso no GenBank).

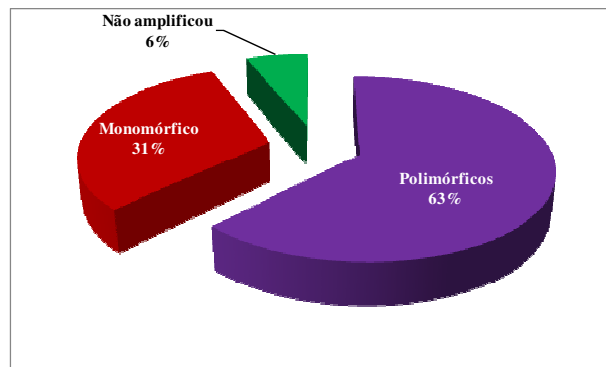


Figura 8. Porcentagens dos locos isolados.

A validação populacional seguiu-se usando os dez locos polimórficos em 25 indivíduos de *Salminus franciscanus* provenientes da bacia do alto São Francisco, à jusante da Barragem de Três Marias, Minas Gerais. A Tabela 2 descreve a temperatura de anelamento, número de indivíduos e de alelos por loco, heterozigosidade esperada e observada, equilíbrio de Hardy-Weinberg e possibilidade de ocorrência de alelos nulos.

Tabela 1. Características dos 16 locos isolados de *Salminus franciscanus*.

| Loco | Unidade Repetitiva (<i>motif</i>) | Sequência dos <i>primers</i> (5'-3') | Tamanho do fragmento (pb) | Tamanho dos Alelos (bp) | Presença de Polimorfismo | Acesso Genbank |
|---------|-------------------------------------|--|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------|
| Sfra 01 | (ACAG)38 | F: CGGAGCTCTAACCACTGA R: GACCTTAAAGCTTAGGCC | 213 | 132 | Não | - |
| Sfra 02 | (GT)18 | F: GCAGTCCTCACTACGTATAGT R: CTCGCTTCAACAACCTGAC | 258 | 256-296 | Sim | HQ317313 |
| Sfra 03 | (CA)14 | F: GCATAGGAGCATTCACTC R: GACACCCAGACTCCAAAC | 164 | 180-210 | Sim | HQ317314 |
| Sfra 04 | (AC)6tctcgctcaca(CACG)4 | F: ATTTAGCTGTTCGGCTGA R: CGGCTTATGTGACGTAGAG | 153 | 166-176 | Sim | HQ317315 |
| Sfra 05 | (TCTG)6 | F: GTTCAGGACGTTAGCTAGC R: GTCGTCGACATTTGGGTA | 380 | 272-306 | Sim | HQ317316 |
| Sfra 06 | (AAAC)4 | F: TCTGTTACAGGATGTCAACG R: TGTAGATGCAGGCAGTTC | 348 | 366 | Não | HQ317317 |
| Sfra 07 | (GAGT)4 | F: GTAGCCTGGTCTGATGGAT R: CTAGTGATTGTTTAAGGCCT | 184 | X | X | - |
| Sfra 08 | (CAC)4 | F: GCTGACAGAAAGGCTACAG R: TCCATCAGACCAGGCTAC | 249 | 240 | Não | HQ317318 |
| Sfra 09 | (AGAC)5 | F: TCACACTCATAGCACACCC R: CATTCTTATACCTCCCAGTC | 222 | 242 | Não | HQ317319 |
| Sfra 10 | (CTGT)3ccgccc(GTCT)3 | F: CTGAACGCAGCTGTCTG R: CCCTGACCTAACCAACG | 257 | 268-324 | Sim | HQ317320 |
| Sfra 11 | (AGAC)10 | F: TGTCCAAACATTTGCATG R: TCCAAATGTCTATCTATCCC | 195 | 206-226 | Sim | HQ317321 |
| Sfra 12 | (AATG)7 | F: TGTCGGACAGGCTGTAAG R: AGATTCCAGCTTCATCCAC | 269 | 284 | Não | HQ317322 |
| Sfra 13 | (TC)17 | F: GACGTTCTGCCTTGAATG R: GACGTCATGTCAGGTTTCA | 236 | 242-310 | Sim | HQ317323 |
| Sfra 14 | (CT)13(CA)8 | F: GAAATCTCCAAGCCTGAG R: GAAAGAACTCGTTTTCTCAG | 232 | 230-290 | Sim | HQ317324 |
| Sfra 15 | (GT)31(GA)10 | F: AGATTCCCGTCAGACCA R: CAAATGAGCTTGCTTAC | 232 | 226-292 | Sim | HQ317325 |
| Sfra 18 | (GACA)6gaa(AGAC)4 | F: GAACAGCAACAACGGACA R: CATCCGAGGTCAGAGGTAG | 175 | 164-192 | Sim | HQ317326 |

X loco sem amplificação

Tabela 2. Validação populacional de *S. franciscanus*. Temperatura de anelamento (Ta), número de indivíduos (N), número de alelos (Na), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He) e valor de P para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

| Loco | Ta (°C) | N | N _a | H _o | H _e | P _{HW} |
|---------|---------|------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Sfra 02 | 60 | 24 | 16 | 0,95 | 0,89 | 0,8914 |
| Sfra 03 | 58 | 24 | 8 | 0,79 | 0,77 | 0,4950 |
| Sfra 04 | 58 | 24 | 5 | 0,25 | 0,33 | 0,0186 |
| Sfra 05 | 62 | 25 | 9 | 0,64 | 0,80 | 0,0713 |
| Sfra 10 | 60 | 24 | 5 | 0,50 | 0,53 | 0,2403 |
| Sfra 11 | 56 | 23 | 5 | 0,13 | 0,24 | 0,0056 |
| Sfra 13 | 60 | 25 | 16 | 0,72 | 0,85 | 0,0066 |
| Sfra 14 | 56 | 23 | 21 | 0,74 | 0,94 | 0,0000* |
| Sfra 15 | 62 | 20 | 16 | 0,70 | 0,88 | 0,0100 |
| Sfra 18 | 58 | 23 | 5 | 0,52 | 0,75 | 0,0108 |
| Média | - | 23,5 | 10,6 | 0,594 | 0,698 | 0,194 |

*Significativamente diferente ($P \leq 0,005$)

A heterozigosidade observada variou de 0,13 (Sfra 11) a 0,95 (Sfra 02) e a esperada de 0,24 (Sfra 11) a 0,94 (Sfra 14). Um loco (Sfra 14) mostrou desvio significativo do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW). Nenhum par de locos analisados nesta população demonstrou estar em desequilíbrio de ligação após a correção sequencial de Bonferroni.

5.2. Transferência dos locos de microssatélites

O teste de transferibilidade foi realizado utilizando 44 exemplares de tabaranas (*S. hilarii*). Dos 16 locos isolados, 15 amplificaram em *S. hilarii*. Destes, nove apresentaram padrão de amplificação polimórfico, dois foram monomórficos e quatro não apresentaram padrão claro de amplificação (Tabela 3).

Tabela 3. Transferibilidade para *S. hilarii*. Loco, temperatura de anelamento, presença de polimorfismo, amplitude.

| Loco | Temperatura de Anelamento | Presença de Polimorfismo | Tamanho do fragmento |
|---------|---------------------------|--------------------------|----------------------|
| Sfra 01 | 60 | - | - |
| Sfra 02 | 58 | Sim | 270-320 |
| Sfra 03 | 62 | Sim | 170-188 |
| Sfra 04 | 62 | Sim | 168-174 |
| Sfra 05 | 62 | Sim | 294-306 |
| Sfra 06 | 62 | Não | 366 |
| Sfra 07 | - | X | - |
| Sfra 08 | 62 | - | - |
| Sfra 09 | 58 | Não | 242 |
| Sfra 10 | 62 | Sim | 272-304 |
| Sfra 11 | 54 | - | - |
| Sfra 12 | 58 | - | - |
| Sfra 13 | 62 | Sim | 248-282 |
| Sfra 14 | 56 | Sim | 231-274 |
| Sfra 15 | 56 | Sim | 170-284 |
| Sfra 18 | 58 | Sim | 150-198 |

- locos sem resultado satisfatório; X loco sem amplificação

5.3. Análises da diversidade genética de *Salminus hilarii*

Os nove locos polimórficos foram utilizados na análise populacional dos 44 indivíduos coletados nos rios São Francisco, Samburá e do Peixe, na bacia do alto São Francisco, apresentando um total de 98 alelos diferentes.

Nos indivíduos no rio São Francisco (RSF) os microssatélites analisados apresentaram um elevado polimorfismo, com média de 9,5 alelos por loco. O número de alelos variou de 4 (Sfra 04) a 21 (SFRA 02). A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,505 (Sfra 10) a 0,918 (Sfra 02), com uma média de 0,721, e a heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,218 (Sfra 04) a 1,000 (Sfra 15) com média geral de 0,635. A riqueza alélica variou de 2,866

(Sfra 04) a 7,333 (Sfra 02) com média de 4,607 alelos. A diversidade genética encontrada esteve entre 0,508 (Sfra 10) e 0,921 (Sfra 02) (Tabela 4).

Os locos Sfra 05, Sfra 10 e Sfra 13 não se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg ($P \leq 0,0055$), após a correção seqüencial de Bonferroni para o ajuste do valor de α . Os valores de F_{IS} foram significativos para déficit de heterozigotos para os locos Sfra 02, Sfra 04 e Sfra 13. As análises realizadas utilizando o *software Micro-Checker* sugeriram uma possível presença de alelos nulos para o loco Sfra 13 (Tabela 4).

Tabela 4. Caracterização dos nove locos de microssatélites de *S. franciscanus* usados nos indivíduos de *S. hilarii* amostrados no Rio São Francisco, número de indivíduos (N); número de alelos (NA); riqueza alélica (RA); diversidade genética (DG), heterozigosidade observada (H_O); heterozigosidade esperada (H_E); valor de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endocruzamento (F_{IS}); probabilidade de déficit de heterozigotos (P_L); probabilidade de excesso de heterozigoto (P_S)

| Loco | N | NA | RA | DG | H_O | H_E | P_{HW} | F_{IS} | P_L | P_S |
|----------|------|-----|-------|-------|-------|-------|----------|----------|----------|--------|
| Sfra 02 | 32 | 21 | 7,333 | 0,921 | 0,718 | 0,918 | 0,0119 | 0,220 | 0,0011* | 0,9996 |
| Sfra 03 | 32 | 8 | 4,589 | 0,779 | 0,937 | 0,781 | 0,9983 | -0,204 | 0,9970 | 0,0159 |
| Sfra 04 | 32 | 4 | 2,866 | 0,591 | 0,218 | 0,584 | 0,0134 | 0,630 | 0,0004* | 1,0000 |
| Sfra 05 | 32 | 6 | 4,093 | 0,759 | 0,718 | 0,757 | 0,0051* | 0,052 | 0,3737 | 0,7733 |
| Sfra 10 | 32 | 7 | 2,981 | 0,508 | 0,375 | 0,505 | 0,0001* | 0,262 | 0,0344 | 0,9878 |
| Sfra 13† | 32 | 13 | 5,692 | 0,846 | 0,562 | 0,841 | 0,0008* | 0,335 | 0,00044* | 1,0000 |
| Sfra 14 | 32 | 7 | 3,664 | 0,621 | 0,656 | 0,621 | 0,7580 | -0,057 | 0,7907 | 0,3941 |
| Sfra 15 | 19 | 13 | 6,525 | 0,887 | 1,000 | 0,890 | 1,0000 | -0,127 | 1,0000 | 0,1037 |
| Sfra 18 | 32 | 7 | 3,721 | 0,601 | 0,531 | 0,600 | 0,3210 | 0,117 | 0,1759 | 0,9222 |
| Média | 30,5 | 9,5 | 4,607 | 0,723 | 0,635 | 0,721 | 0,3454 | 0,136 | 0,3748 | 0,688 |

† loco com presença de alelos nulos; * valor significativo ($P \leq 0,0055$)

Para os exemplares do rio Samburá (SAM), o número de alelos encontrados variou de 3 (Sfra 04, Sfra 10 e Sfra 18) a 8 (Sfra 02), obtendo um total de 42 alelos com média de 4,6 alelos por loco. A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,530 (Sfra 18) a 0,893 (Sfra 02) com uma média de 0,718 e a heterozigosidade observada (H_O) variou de 0,333 (Sfra 04 e Sfra 10) a 1,000 (Sfra 05, Sfra 13 e Sfra 15), com média geral de 0,740. A riqueza alélica variou de 2,833 (Sfra 18) a 6,985 (Sfra 02) e a diversidade genética de 0,517 (Sfra 18) a 0,917 (Sfra 02), com média de 4,319 e 0,716, respectivamente (Tabela 5). Nenhum loco apresentou desvios das expectativas de Hardy-Weinberg, presença de alelos nulos e déficit de heterozigotos para essa localidade.

Tabela 5. Caracterização dos nove locos de microssatélites de *S. franciscanus* usados nos indivíduos de *S. hilarii* amostrados no Rio Samburá, número de indivíduos (N); número de alelos (NA); riqueza alélica (RA); diversidade genética (DG), heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada (H_E); valor de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endocruzamento (F_{IS}); probabilidade de déficit de heterozigotos (P_L); probabilidade de excesso de heterozigoto (P_S)

| Loco | N | NA | RA | DG | H_o | H_E | P_{HW} | F_{IS} | P_L | P_S |
|---------|---|-----|-------|-------|-------|-------|----------|----------|--------|--------|
| Sfra 02 | 6 | 8 | 6,985 | 0,917 | 0,666 | 0,893 | 0,0559 | 0,273 | 0,0793 | 0,9948 |
| Sfra 03 | 6 | 4 | 3,667 | 0,667 | 0,833 | 0,681 | 0,9311 | -0,250 | 0,9396 | 0,3741 |
| Sfra 04 | 6 | 3 | 2,970 | 0,567 | 0,333 | 0,545 | 0,1723 | 0,412 | 0,1974 | 0,9889 |
| Sfra 05 | 6 | 4 | 3,833 | 0,733 | 1,000 | 0,757 | 1,0000 | -0,364 | 1,0000 | 0,1648 |
| Sfra 10 | 6 | 3 | 2,985 | 0,700 | 0,333 | 0,666 | 0,0565 | 0,524 | 0,0959 | 0,9967 |
| Sfra 13 | 6 | 6 | 5,636 | 0,867 | 1,000 | 0,878 | 1,0000 | -0,154 | 1,0000 | 0,4574 |
| Sfra 14 | 6 | 4 | 3,667 | 0,617 | 0,833 | 0,636 | 1,0000 | -0,351 | 1,0000 | 0,2415 |
| Sfra 15 | 6 | 7 | 6,303 | 0,867 | 1,000 | 0,878 | 1,0000 | -0,154 | 1,0000 | 0,4330 |
| Sfra 18 | 6 | 3 | 2,833 | 0,517 | 0,666 | 0,530 | 1,0000 | -0,290 | 1,0000 | 0,4952 |
| Média | 6 | 4,6 | 4,319 | 0,716 | 0,740 | 0,718 | 0,6903 | -0,039 | 0,701 | 0,571 |

Já para os indivíduos do Rio do Peixe (RPX), o número de alelos variou de 2 (Sfra 04 e Sfra 14) a 7 (Sfra 02, Sfra 13 e Sfra 15), com total de 39 alelos (média de 4,3 alelos por loco). A heterozigosidade esperada (H_E) variou de 0,166 (Sfra 10) a 0,911 (Sfra 15) com uma média de 0,606 e a heterozigosidade observada (H_o) variou de 0,166 (Sfra 10) a 1,000 (Sfra 03 e Sfra 15), com média geral de 0,629. A riqueza alélica variou de 1,833 (Sfra 10) a 7,000 (Sfra 15) com média de 4,096 alelos. A diversidade genética encontrada esteve entre 0,167 (Sfra 10) e 0,917 (Sfra 13) com média geral de 0,603 (Tabela 6). Nenhum loco apresentou desvios das expectativas de Hardy-Weinberg, presença de alelos nulos e déficit de heterozigotos para essa localidade.

Tabela 6. Caracterização dos nove locos de microssatélites de *S. franciscanus* usados nos indivíduos de *S. hilarii* amostrados no Rio do Peixe, número de indivíduos (N); número de alelos (NA); riqueza alélica (RA); diversidade genética (DG), heterozigosidade observada (H_o); heterozigosidade esperada (H_E); valor de significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg (P_{HW}); coeficiente de endocruzamento (F_{IS}); probabilidade de déficit de heterozigotos (P_L); probabilidade de excesso de heterozigoto (P_S).

| Loco | N | NA | RA | DG | H_o | H_E | P_{HW} | F_{IS} | P_L | P_S |
|---------|-----|-----|-------|-------|-------|-------|----------|----------|--------|--------|
| Sfra 02 | 6 | 7 | 6,152 | 0,833 | 0,833 | 0,833 | 0,7666 | 0,000 | 0,7867 | 0,7770 |
| Sfra 03 | 6 | 5 | 4,955 | 0,850 | 1,000 | 0,863 | 1,0000 | -0,176 | 1,0000 | 0,4326 |
| Sfra 04 | 6 | 3 | 2,667 | 0,317 | 0,333 | 0,318 | 1,0000 | -0,053 | 1,0000 | 0,9037 |
| Sfra 05 | 6 | 3 | 3,000 | 0,717 | 0,666 | 0,712 | 0,5157 | 0,070 | 0,5478 | 0,7493 |
| Sfra 10 | 6 | 2 | 1,833 | 0,167 | 0,166 | 0,166 | 1,0000 | 0,000 | 1,0000 | 1,0000 |
| Sfra 13 | 6 | 7 | 6,455 | 0,917 | 0,833 | 0,909 | 0,4398 | 0,091 | 0,4459 | 0,8922 |
| Sfra 14 | 6 | 2 | 1,985 | 0,300 | 0,333 | 0,303 | 1,0000 | -0,111 | 1,0000 | 0,9074 |
| Sfra 15 | 5 | 7 | 7,000 | 0,900 | 1,000 | 0,911 | 1,0000 | -0,111 | 1,0000 | 0,6115 |
| Sfra 18 | 6 | 3 | 2,818 | 0,433 | 0,500 | 0,439 | 1,0000 | -0,154 | 1,0000 | 0,7267 |
| Média | 5,8 | 4,3 | 4,096 | 0,603 | 0,629 | 0,606 | 0,8402 | -0,049 | 0,864 | 0,777 |

5.4. Análise da estrutura genética populacional de *Salminus hilarii*

Quando os dados genotípicos foram submetidos à análise Bayesiana no programa Structure 3.3, foi encontrada uma grande probabilidade de existência de uma única população genética entre as populações de *Salminus hilarii* estudada. A Figura 9 é a representação gráfica da estrutura populacional resultante dessa análise, indicando a existência de um único *cluster*. É possível perceber pelo gráfico de barras, assumindo $k=3$, que a probabilidade dos indivíduos pertencerem à população 1, 2 ou 3 é semelhante. Porém, o valor de P encontrado pelo índice de fixação F_{ST} mostrou diferença significativa entre duas populações (SAM x RPX) (Tabela 7). O valor do número de migrantes (Nm) entre as populações apresentou um valor de $Nm = 4,4629$, indicando alto fluxo gênico.

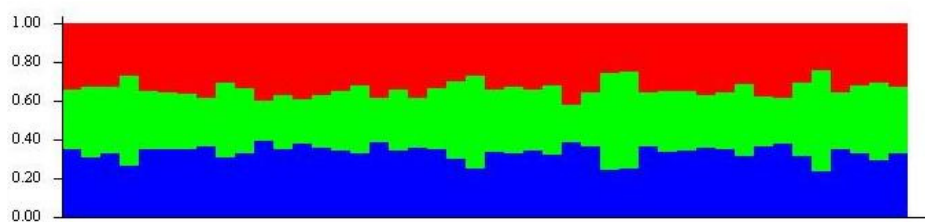


Figura 9. Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam cada população.

Tabela 7. Valores de F_{ST} e valores de P entre três amostragens de *S. hilarii*. RSF = Rio São Francisco; SAM = Rio Samburá; RPX = Rio do Peixe

| Localidade | F_{ST} | P |
|------------|----------|----------|
| RSF x SAM | -0,0048 | 0,28333 |
| RSF x RPX | 0,0401 | 0,25000 |
| SAM x RPX | 0,0914 | 0,01667* |

*diferença significativa ($\alpha = 0,01667$)

A partir da exclusão dos locos Sfra 05, Sfra 10 e Sfra 13, os quais se mostraram em desequilíbrio de Hardy-Weinberg, para análise da estrutura populacional de *Salminus hilarii*, o índice de fixação F_{ST} apresentou probabilidade, representada pelo valor de P, significativa de evidências de estruturação populacional entre duas outras populações (RSF x RPX) (Tabela 8). Porém, há uma grande probabilidade de existência de uma única população genética entre as populações de *S. hilarii*, de acordo com o programa Structure 2.2. A Figura 10 é a representação gráfica da estrutura populacional resultante dessa análise, indicando a existência de um único *cluster* como mostrado no gráfico de barras, assumindo $k=3$, a probabilidade dos indivíduos pertencerem à população 1, 2 ou 3 é semelhante. O valor de número de migrantes (Nm) entre as populações continuou sendo elevado ($Nm = 4,39$), indicando alto fluxo gênico. Confirmando essa informação, o número de populações mais provável estimado foi igual a 1 (Figura 11).

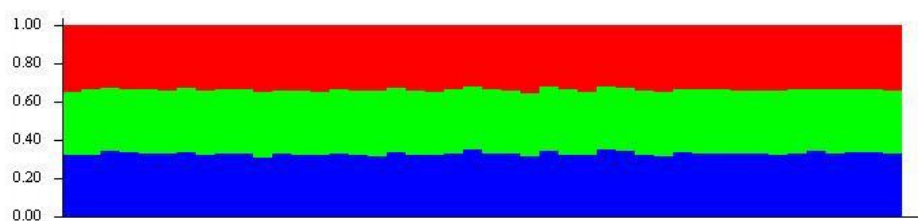


Figura 10. Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para cada população, após a retirada dos locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. As cores representam cada população.

Tabela 8. Valores de F_{ST} e valores de P entre três amostragens de *S. hilarii*, após a retirada dos locos em desequilíbrio de Hardy-Weinberg. RSF = Rio São Francisco; SAM = Rio Samburá; RPX = Rio do Peixe

| Localidade | F_{ST} | P |
|------------|----------|----------|
| RSF x SAM | 0,0008 | 0,46667 |
| RSF x RPX | 0,0671 | 0,01667* |
| SAM x RPX | 0,1294 | 0,03333 |

*diferença significativa ($\alpha = 0,01667$)

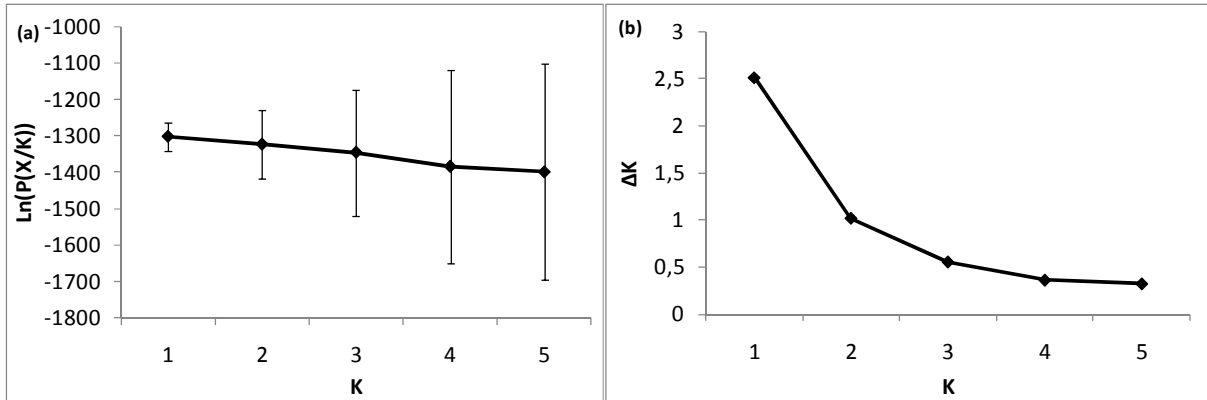


FIGURA 11. (a) Resultados das estimativas de $\text{Ln}(P(X/K))$ versus o número de populações (K), analisados no Structure 3.3 (b) Estimativa do número de populações de acordo com o método de Evanno *et al.*, 2005.

Considerando a presença de uma única população, nenhum dos pares de locos analisados demonstrou estar em desequilíbrio de ligação após a correção sequencial de Bonferroni (Tabela 9).

Tabela 9. Probabilidade da ocorrência de desequilíbrio de ligação (P) entre os nove locos, considerando as três amostragens conjuntamente, ajustados pela correção sequencial de Bonferroni ($P \leq 0,001389$).

| Loco#1 | Loco#2 | P |
|---------|---------|----------|
| Sfra 02 | Sfra 03 | 0,833567 |
| Sfra 02 | Sfra 04 | 0,151546 |
| Sfra 03 | Sfra 04 | 0,029347 |
| Sfra 02 | Sfra 05 | 0,920602 |
| Sfra 03 | Sfra 05 | 0,581802 |
| Sfra 04 | Sfra 05 | 0,503971 |
| Sfra 02 | Sfra 10 | 0,934763 |
| Sfra 03 | Sfra 10 | 0,178395 |
| Sfra 04 | Sfra 10 | 0,033756 |
| Sfra 05 | Sfra 10 | 0,524661 |
| Sfra 02 | Sfra 13 | 0,449205 |
| Sfra 03 | Sfra 13 | 0,122548 |
| Sfra 04 | Sfra 13 | 0,253514 |
| Sfra 05 | Sfra 13 | 0,028252 |
| Sfra 10 | Sfra 13 | 0,637359 |
| Sfra 02 | Sfra 14 | 0,525471 |
| Sfra 03 | Sfra 14 | 0,329972 |
| Sfra 04 | Sfra 14 | 0,807113 |
| Sfra 05 | Sfra 14 | 0,331063 |
| Sfra 10 | Sfra 14 | 0,293269 |
| Sfra 13 | Sfra 14 | 0,864033 |
| Sfra 02 | Sfra 15 | 1,000000 |
| Sfra 03 | Sfra 15 | 0,142103 |
| Sfra 04 | Sfra 15 | 0,219441 |
| Sfra 05 | Sfra 15 | 0,286609 |
| Sfra 10 | Sfra 15 | 0,368667 |
| Sfra 13 | Sfra 15 | 0,418368 |
| Sfra 14 | Sfra 15 | 0,790440 |
| Sfra 02 | Sfra 18 | 0,402224 |
| Sfra 03 | Sfra 18 | 0,399598 |
| Sfra 04 | Sfra 18 | 0,895305 |
| Sfra 05 | Sfra 18 | 0,135971 |
| Sfra 10 | Sfra 18 | 0,538967 |
| Sfra 13 | Sfra 18 | 0,556262 |
| Sfra 14 | Sfra 18 | 0,007416 |
| Sfra 15 | Sfra 18 | 0,344080 |

6. DISCUSSÃO

6.1. Isolamento e caracterização dos locos de microssatélites

Embora os microssatélites sejam marcadores amplamente utilizados para análises populacionais, diversas espécies ainda não foram submetidas a estudos para isolamento desses marcadores. Nem sempre a transferibilidade é possível, já que muitas vezes é necessário que sejam espécies relativamente próximas para uma amplificação favorável. Além disso, é difícil prever se um determinado conjunto de *primers* terá sucesso na amplificação e será polimórfico em diferentes espécies (PRIMMER et al., 2005). Deste modo, o presente trabalho utilizou um conjunto de locos de microssatélites polimórficos obtidos para uma espécie de peixe em que não havia nenhum loco descrito até o momento e os usou para verificar a variação genética de outra espécie do mesmo gênero.

O método de isolamento de microssatélites baseado na construção de uma biblioteca genômica parcial, com o enriquecimento através de sondas biotinizadas e captura por meio de *beads* magnéticos (HAMILTON et al., 1999), mostrou-se eficiente em recuperar as sequências que continham os microssatélites na amostra analisada de *Salminus franciscanus*. Dos 192 clones positivos, 96 foram sequenciados. Desta parcela, 41 (42,7%) possuíam microssatélites e 38 (39,5%) apresentaram a possibilidade de desenhar *primers* nas regiões flangeadoras dos microssatélites. Dessas últimas sequências, 16 (42,1%) foram utilizadas para construir os *primers*, dos quais 10 (26,3%) apresentaram-se polimórficos. Resultados semelhantes foram encontrados por Barbosa et al. (2008), descrevendo novos locos de microssatélites de *Prochilodus argenteus*, mencionaram que, de 96 clones sequenciados, 51 (53%) continham microssatélites, desenhando 31 (32,3%) pares de *primers* dos quais 15 (15,6%) foram amplificados com êxito. Revaldaves et al. (2005) isolaram microssatélites no bagre *Pseudoplatystoma corruscans* e encontraram em 81 clones positivos, 22 (27%) sequências com microssatélites, dentre as quais foram construídos 16 (20%) pares de *primers*, sendo cinco (6,2%) altamente polimórficos. De acordo com os dados apresentados acima, é possível evidenciar uma proporção semelhante de locos polimórficos identificados no presente estudo.

Os valores encontrados nesse trabalho foram superiores aos resultados apresentados na revisão de Zane et al. (2002), onde os autores citam que a porcentagem média de microssatélites encontrados em peixes é de 3,1%, variando entre 0,066% e 8,92%.Essas

maiores porcentagens encontradas podem ser explicadas pelas técnicas de isolamento de microssatélites que vêm sendo melhoradas, tanto na sua eficiência, quanto em relação ao custo nesses últimos anos.

Para a caracterização dos dez locos de microssatélites polimórficos isolados no presente trabalho foi utilizado um total de 25 indivíduos de *Salminus franciscanus*. Onde, o número de alelos por loco teve média de 10,6. Os valores médios da heterozigosidade observada e esperada foram de 0,6 e 0,71, respectivamente. O valor encontrado de heterozigosidade média esperada foi maior do que o valor (0,46) citado por De Woody e Avise (2000) para outras espécies de peixes de água doce. No entanto, são similares aos grupos de peixes estudados por Revaldaves *et al.* (2005), Sanches e Galetti Jr. (2006), Carvalho-Costa *et al.* (2006) e Mohindra *et al.* (2008)

Em relação às expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg, somente o loco Sfra 14 apresentou desvio significativo do equilíbrio. Sanches (2007) menciona que o déficit de heterozigotos, a ocorrência de alelos nulos, o efeito de Wahlund, o cruzamento não-aleatório ou o erro amostral podem ser os possíveis responsáveis para casos como estes (REVALDAVES *et al.*, 2005; BARBOSA *et al.*, 2008; PAIVA; KALAPOTHAKIS, 2008) O programa Micro-checker apontou presença de alelos nulos para esse loco.

Os locos microssatélites isolados e caracterizados neste trabalho poderão ser de grande utilidade para estudar a variação genética nas populações de *Salminus franciscanus* e em outras espécies relacionadas, constituindo-se em importantes ferramentas para estudos populacionais e avaliações relacionadas à conservação e manejo de espécies nativas, assim como para o desenvolvimento de programas voltados para a aquicultura.

6.2. Transferibilidade dos locos de microssatélites

A amplificação heteróloga desses locos mostrou que todos os locos testados amplificaram em *Salminus hilarii*. Resultados similares aos encontrados aqui também foram obtidos por Carrillo-Avila *et al.* (2009), que estudaram altos níveis de amplificação heteróloga entre espécies da mesma família Pimelodidae quando foram usados locos microssatélites isolados para *Zungaro jahu*. No entanto, Revaldaves *et al.* (2005), usando locos microssatélites isolados para o bagre *Pseudoplatystoma corruscans*, relatam que poucos locos amplificaram quando usados em espécies de outras famílias de peixes.

Barbará *et al.* (2007), em uma análise de trabalhos que reportavam ampliações heteróloga em vários grupos, concluíram que a transferibilidade dos marcadores

microssatélites entre espécies é desigualmente distribuída entre os *taxa*. O sucesso da transferibilidade é avaliado em termos de seu polimorfismo. Testes positivos de transferibilidade de marcadores podem ser esperados para muitos grupos entre e dentro dos gêneros e até mesmo entre diferentes famílias em alguns casos. Podendo ser encontrado mais de 80% de sucesso de transferência entre espécies do mesmo gênero em mamíferos; cerca de 70% em peixes; e cerca de 90% em aves). Neste mesmo trabalho, os autores destacam a porcentagem de marcadores polimórficos encontrados, descrevendo, para espécies dentro do mesmo gênero, cerca de 70% de marcadores polimórficos para mamíferos e peixes, e quase 100% em aves.

Zane *et al* (2002) afirmam que é possível obter 50% de sucesso na taxa de amplificação heteróloga para a detecção de polimorfismo em espécies de aves e bovinos que divergiram de 10 a 20 milhões de anos.

6.3. Diversidade e estrutura genética em *Salminus hilarii*

Os locos de microssatélites isolados no presente estudo forneceram uma considerável variação genética nas amostras de *Salminus hilarii*. Esse resultado, juntamente com outras características previamente citadas, destaca como é importante a utilização desses marcadores em estudos sobre a avaliação da variabilidade genética de populações naturais de peixes (O'CONNEL; WRIGHT, 1997; O'REILLY *et al.*, 2000).

A variação genética populacional deve ser função de alguns fatores. Um deles é a diversidade genética disponível originalmente para a espécie; o outro são os processos contemporâneos como seleção, fluxo gênico, sistema de cruzamento, entre outros. Essa variação é posteriormente dividida dentro e entre as populações (AVISE, 2004).

A avaliação dos nove locos microssatélites permitiu a identificação de 98 alelos diferentes, variando de 5 (Sfra 04 e Sfra 05) a 23 (Sfra 15) alelos, média de 10,8 por loco. Esse valor encontra-se acima do observado para peixes de água doce (9,1 alelos por loco) (DEWOODY; AVISE, 2000). Valores superiores à média de alelos observados em peixes de água doce também foram encontrados por Carvalho-Costa *et al* (2006) para *Prochilodus costatus*, com média de 11 alelos por loco. Embora o menor valor de heterozigosidade observada (H_0) encontrado seja baixo ($H_0 = 0,166$ para o loco Sfra 10 no RPX) o maior valor é relativamente alto ($H_0 = 1,000$ para o locos Sfra 15 no RSF; Sfra 05, Sfra 13 e Sfra 15 no SAM; Sfra 03 e Sfra 15 no RPX).

De uma maneira geral, os valores de heterozigosidade e de quantidade de alelos são semelhantes àqueles encontrados para peixes de água doce. Em uma população de *Brycon hilarii*, Sanches e Galetti Jr (2006) encontraram número de alelos por loco variando de 3 a 8 e a H_0 entre 0,270 e 0,830. Xu *et al* (2009) encontraram de 2 a 11 alelos por locos, com H_0 variando de 0,15 a 0,88 em *Rhinogobio ventralis*.

Aparentemente, o pequeno número amostral não influenciou os números de diversidade genética, uma vez que as duas localidades de menor amostragem (SAM e RPX) apresentaram níveis de diversidade semelhantes ao da área de maior amostragem (RSF).

Os locos Sfra 05, Sfra 10 e Sfra 13 desviaram-se das expectativas de Hardy-Weinberg na localidade RSF, apresentando nos locos Sfra 10 e Sfra 13 significativos déficits de heterozigotos, conforme demonstrado pelos valores de F_{IS} . Estes resultados foram confirmados pela correção sequencial de Bonferroni dos valores de P ($P \leq 0,0055$). A presença de alelos nulos também pode ser uma das causas do desvio no loco Sfra 13, tal como sugerido pela análise no programa *Micro-Checker* 2.2.1. O efeito de Wahlund, o cruzamento não aleatório ou o erro amostral poderiam ser responsáveis pelo déficit de heterozigotos nos locos Sfra 05 e Sfra 10 (DE LEON *et al.*, 1997; XU *et al.*, 2001). Os locos Sfra 02, Sfra 04 e Sfra 13 (RSF) que apresentaram coeficientes de endocruzamento significativos (F_{IS}), podem ser explicados pelo déficit de heterozigotos ($P \leq 0,0055$).

Dakin e Avise (2004) definem alelos nulos como um alelo em um microsatélite que consistentemente falha na amplificação a níveis detectados através da PCR. Uma causa potencial do surgimento dos alelos nulos é o pobre anelamento do *primer* devido à divergência na sequência de nucleotídeos (por exemplo, mutações pontuais ou *indels*) em um, ou ambos *primers* flanqueadores. Observa-se que mutações na extremidade 3', onde começa a extensão, são especialmente prejudiciais para a amplificação via PCR. Outro modo de ocorrer alelos nulos envolve a falha na PCR devido à inconsistência na qualidade do DNA.

Para a interpretação dos valores de F_{ST} , valores na faixa de 0 a 0,05 indicam fraca diferenciação genética; valores entre 0,05 a 0,25, diferenciação moderada; e valores acima de 0,25 indicam uma forte diferenciação genética (WRIGHT, 1978). Esses são parâmetros amplamente utilizados para descrever estrutura populacional (NAGYLAKI, 1997). De acordo com esse critério, o valor de F_{ST} encontrado indica uma diferenciação genética moderada entre as localidades SAM e RPX ($F_{ST} = 0,0914$).

F_{ST} é definido como a correlação entre gametas amostrados aleatoriamente de dentro de alguma subpopulação em relação à população total. Está diretamente relacionado à variância na frequência alélica entre populações e, inversamente, ao grau de semelhança entre

indivíduos dentro de populações (HOLSINGER; WEIR, 2009). Para efetuar o cálculo desse índice, é necessário que se defina o número de populações *a priori*. No caso deste trabalho, definimos três subpopulações de acordo com os pontos de coleta amostrados.

Após as novas análises excluindo os locos que se desviaram do equilíbrio de Hardy-Weinberg, o valor de F_{ST} entre as localidades SAM e RPX ($F_{ST} = 0,1294$) ainda indica uma diferenciação genética moderada, apesar da probabilidade ($P = 0,0333$) não ter sido significativa. Vale destacar que a exclusão dos locos em desequilíbrio visa uma maior confiabilidade dos resultados finais. No entanto, para essas novas análises, entre as localidades RSF e RPX o valor de F_{ST} encontrado indica uma diferenciação genética moderada ($F_{ST} = 0,0671$), evidenciando uma estruturação populacional, confirmado pelo valor de P significativo. É importante ressaltar que esse resultado deve ser visto com limitações já que o tamanho amostral de RSF e RPX é bastante reduzido. O *assignment test* não confirmou os resultados do F_{ST} , sugerindo ausência de estruturação de população entre essas populações, mesmo após a exclusão dos locos em desequilíbrio.

O resultado obtido pela análise no Structure também nos dá subsídios para excluir uma das possíveis causas para os desvios no HWE: o efeito Wahlund. Esse se resume no excesso de homozigotos causados pela sobreposição de populações. Entretanto, como a análise de agrupamento bayesiana indicou a presença de apenas uma população, concluímos que o excesso de homozigotos não se deve a esse efeito.

O fluxo gênico é um relevante fator de influência na estrutura populacional e ele determina até que ponto uma população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (SLATKIN, 1995). O valor que indica a existência de fluxo gênico, que é equivalente ao número de migrantes por geração, pode ser considerado alto ($Nm = 4,4629$). Segundo Wright (1978) valores de Nm acima de 1 indicam que o fluxo gênico é um fator atuante contra a diferenciação genética entre as populações.

Espécies com altas taxas de dispersão ou que ocupam habitats livres de barreiras geográficas tendem a exibir baixos níveis de estruturação populacional. Já aquelas que possuem pequena capacidade de dispersão ou estão submetidas à separação imposta por barreiras físicas e comportamentais acentuadas apresentam um alto grau de divergência intra-populacional (GRAVES, 1998).

6.4. Implicações para a conservação

Segundo Frankham *et al.* (2008), a IUCN reconhece a necessidade de conservar a diversidade genética como uma das três prioridades globais para conservação da biodiversidade. A conservação da diversidade genética é essencial, pois sua perda reduz a habilidade de uma população se adaptar às mudanças ambientais via seleção natural e aumenta a probabilidade de extinção. Na maioria das vezes, a viabilidade genética da espécie só pode ser mantida com a conservação da paisagem em que se insere, para que os processos ecológicos sejam minimamente mantidos.

Apesar da tabarana não constar no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MMA - Ministério do Meio Ambiente), a condição do ecossistema pode acarretar em uma possível redução populacional e perdas significativas em sua diversidade genética. Assim, a conservação dos tributários do Alto São Francisco é de extrema importância, pois esses possibilitam a manutenção da alta diversidade genética na espécie.

Como consequência dos diversos impactos antrópicos sobre a ictiofauna, temos a ruptura dos padrões migratórios de determinadas espécies nativas e o comprometimento de atividades pesqueiras. Um dos problemas que isso pode ocasionar em populações naturais de peixes sem manejo sustentado é a diminuição do tamanho populacional. Essa redução pode acarretar em um processo de deriva genética, consequente endogamia e perda de heterozigose (AVISE, 1994).

O entendimento da estrutura genética de populações naturais é indispensável na tomada de decisões prudentes para o manejo e conservação dos recursos genéticos disponíveis (LAIKRE *et al.*, 2005). É importante salientar que os estudos de genética populacional são fundamentais para o manejo futuro de peixes neotropicais, pois permitirão avaliar e monitorar as futuras modificações genéticas que as espécies deste grupo apresentem.

Considerando a importância ecológica de *Salminus hilarii* e a falta de estudos genéticos populacionais para esta espécie, os dados apresentados neste trabalho são particularmente importantes para ser levados em consideração tanto na implantação de programas de manejo e conservação desta espécie, quanto na geração de subsídios para tomadores de decisão relacionados aos recursos hídricos e conservação da biodiversidade da região estudada.

Os resultados obtidos claramente indicam a existência de fluxo gênico entre as subpopulações estudadas, distribuindo a variação genética igualmente nesses tributários. Por conta disso, infere-se que o estado de conservação desses ambientes permite a manutenção de uma população genética homogênea nessa região do Alto São Francisco.

7. CONCLUSÕES

- ❖ Os locos de microssatélites prospectados em *Salminus franciscanus* foram eficientes na amplificação e verificação de polimorfismo nessa espécie e mostraram ainda amplificação positiva para nove locos em *Salminus hilarii*.
- ❖ Os níveis de variação genética observados são comparáveis a outras espécies de peixes estudadas e não se observou estruturação de populações em *Salminus hilarii* na área abordada no presente estudo.
- ❖ O estudo produziu ferramentas genéticas importantes para trabalhos que visam compreender a diversidade genética da espécie *S.hilarii* e, possivelmente, de grupos próximos, capazes de contribuir com dados relevantes para programas de manejo e conservação da biodiversidade.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A.; JÚLIO JR, H. F. Peixes da bacia do alto rio Paraná. In: _____. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1999. p. 374-399.

AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ S.M.; GOMES L.C. Threats for biodiversity in the floodplain of the Upper Paraná River: effects of hydrological regulation by dams. **Ecohydrology and Hydrobiology**, v. 4, p. 255–268, 2004.

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

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

BARBARÁ, T. et al. Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 3759-3767, 2007.

BARBOSA, A.C.D.R. et al. Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 357-360, 2008.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.html>>. (Acesso em: 17 jun. 2010)

BRASIL PESCARIAS. Disponível em: <<http://brasilpescarias.com.br/peixesdetalhe/28/tabarana.aspx>>. (Acesso em 12/10/2009)

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para os peixes da Bacia do São Francisco)**. 3. ed. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF. 1988, 115p.

BUSSING, W.A. Fish communities and environmental characteristics of a tropical rain forest river in Costa Rica. **Revista de Biologia Tropical**, v. 36, p. 791-809, 1993.

CAPPIO, L.F.; MARTINS, A.; KIRCHNER, R. **O Rio São Francisco**. Petrópolis: Editora Vozes. 1995, 110p.

CARLETON, K.L. et al. Rapid isolation of CA microsatellites from tilapia genome. **Animal Genetics**, v. 33, p. 140-144, 2002

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

CARRILLO-AVILA, M. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, *Zungaro jahu* (Siluriformes, Pimelodidae). **Conservation Genetics**, v. 10, p. 1597-1599, 2009.

CETRA, M. **Caracterização da assembléia de peixes da bacia do Rio Corumbataí (SP)**. 2003. 88 f. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental) - Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos. 2003.

COMPANHIA DE DESENVOLVIMENTO DOS VALES DO SÃO FRANCISCO E PARNAÍBA. **Título do documento consultado**. Disponível em: <<http://www.codevasf.gov.br>>. Acesso em: 17 nov. 2009.

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

DE LEÓN, F.J.G.; CHIKHI, L.; BONHOMME, F. Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1785). **Molecular Ecology**, v.6, p.51-56, 1997.

DE WOODY, J.; AVISE, J.C. Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. **Journal of Fish Biology**, v. 56, p. 461-473, 2000.

FÉRAL, J.P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity? **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 268, p. 121-145, 2002.

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

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA/CENARGEM, 1996.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de genética da conservação**. New York: Cambridge University Press, 2007. 280 p. Título em inglês: A primer of conservation genetics. Traduzido para o português por Mercival Roberto Francisco e Izeni Pires Farias. Organizado por Pedro Manoel Galetti Junior.

FREITAS, P.D.; MARTINS, D.S.; GALETTI JR, P.M. CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 107–108, 2008.

FOWLER, H.W. A collection of fresh-water fishes obtained in eastern Brazil by Dr. Rodolpho von Ihering. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 93, p. 123-199, 1941.

GAGGIOTTI, E.O. et al. A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular Ecology**, v. 8, p.1513-1520, 1999.

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

GODOY, M.P. **Peixes do Brasil. Subordem Characoidei. Bacia do Rio Mogi Guassu**. Piracicaba; ED. Franciscana, 1975. v. 1, 216 p.

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

GRAVES, J.E. Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 427-437, 1998.

HAMILTON, M.B. et al. Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. **BioTechniques**, v. 27, p. 500-507, 1999.

HATANAKA, T.; GALETTI JR. P.M. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations of a migratory freshwater fish species. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, p. 19-25, 2003.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI JR, M.P. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, p. 1-7, 2006.

HILSDORF, A.W.S. Biologia molecular: uma realidade para a aquicultura. **Panorama da Aquicultura**, p. 10-13, jan/fev. 1997.

HOLSINGER, K.E; WEIR, B.S. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting FST. **Nature Review Genetics**, v.10, p. 639–650, 2009.

JARNE, P.; LAGODA, P.J.L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, p. 424-429, 1996.

KIMURA, M.; CROW, F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, v. 49, p. 725-738, 1964.

KRAMER, D.L. Terrestrial group spawning of *Brycon petrosus* (Pisces: Characidae) in Panama. **Copeia**, v. 3, p. 536-536, 1978.

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio**, v.34, p.111-119, 2005.

LEVINSON, G.; GUTMAN, G.A. Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, p. 203-221, 1987.

LIMA, F.C.T. **Revisão Taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostrariophysi: Characiformes: Characidae)**. 2006. 263 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2006.

LIMA, F.C.T.; BRITSKI, H.A. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 5, p. 237-244, 2007.

LIMA-JÚNIOR, S.E. **A Ictiofauna e a qualidade da água em trechos do rio Corumbataí - SP**. 2003. 232 f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 2003.

LÓPEZ, H. L.; MIQUELARENA, A. M.; MENNI, R. C. **Lista comentada de los peces continentales de la Argentina**. Local: ProBiota, 2003. 87 p. (Serie Técnica y Didáctica, 5).

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

MIA, M.Y. et al. Detection of hybridization between Chinese carp species (*Hypophthalmichthys molitrix* and *Aristichthys nobilis*) in hatchery broodstock in Bangladesh, using DNA microsatellite loci. **Aquaculture**, v. 247, p. 267-273, 2005.

MOHINDRA, V. et al Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in yellowtail catfish, *Pangasius pangasius* (Hamilton, 1822). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 864-866, 2008.

NAGYLAKI, T. Fixation indices in subdivided populations. **Genetics Society of America**, v.148, p.1325-1332, 1998.

NEI, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York: Columbia University Press, 1987. 512 p.

O'CONNEL, M.; WRIGHT, J.M. Microsatellite DNA in fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 7, p. 331-363, 1997.

OLIVEIRA, E.J. et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.

O'REILLY, P.; WRIGHT, J.M. The evolving technology of DNA fingerprinting and its application to fisheries and aquaculture. **Journal of Fish Biology**, v. 47, p. 29-55, 1995.

O'REILLY, P.T. et al. Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye Pollock and other gadoids. **Journal of Fish Biology**, v. 50, p. 1074-1086, 2000.

PAIVA, M.P. **Grandes represas do Brasil**. Brasilia: EDITERRA Editorial, 1982. 192p.

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

PAIVA, A.L.B.; KALAPOTHAKIS, E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 8, p. 1078-1080, 2008.

PEIXES E PESCA NO RIO SÃO FRANCISCO. <<http://sfrancisco.bio.br/rio/mapbacia.html>>. (Acesso em 12/10/2009).

PETIT, R.J.; EL MOUSADIK, A.; PONS, O. Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. **Conservation Biology**, v. 12, p. 844-855, 1998.

PETRERE, J.R.M. River fisheries in Brazil: a review. **Regulated Rivers: Research and Management**, v. 4, p. 1-16. 1989.

PRIMMER, C.R. et al. Factors affecting avian cross-species microsatellite amplification. **Journal of Avian Biology**, v.36, p.348-360, 2005.

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

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America** (CLOFFSCA), Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.729 p.

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

REVALDAVES, E. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-amplification. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p.463-465, 2005.

RICE, W.R. Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, p. 223-225, 1989.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Nova York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SANCHES, A.; GALETTI JR, P.M. Microsatellite loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 1045-104, 2006.

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

SANCHES, A. **Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação**. 2007. 112 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2007.

SANTOS, E. P. **Peixes da água doce**. Belo Horizonte: Itatiaia. 1987.

SATO, Y.; GODINHO, H. P. Peixes da bacia do Rio São Francisco. In: MCCONNELL, L. (Ed.). **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. São Paulo: EDUSP, 1999. p. 401-413.

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

SELKOE, K.A.; TOONEM, R.J. Microsatellite for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v. 9, p. 615-629, 2006.

SILVA, P.A. et al. Determinação da extensão do rio São Francisco. XI SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSRIAMENTO REMOTO, 2003. **Anais do XI SBSR**. Belo Horizonte: INPE. P.393-400.

SLATKIN, M. Hitchiking and associate overdominance at a microsatellite lócus. **Molecular Biology and Evolution**, v.12, p.473-480, 1995.

SMITH, G.P. Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. **Science**, v. 191, p. 528-535, 1976.

SOBERANÍA.<[http:// www.soberania.org/Articulos/articulo_3285.htm](http://www.soberania.org/Articulos/articulo_3285.htm)>. (Acesso em 12/10/2009).

TAKAHASHI, E.L.H. **Ciclo reprodutivo da tabarana, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characidae, Salmininae) na região do Baixo rio Sorocaba, SP**. 2006. 65 p. Dissertação (Mestrado em Aqüicultura)–Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal. 2006.
TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, p. 6364-6471, 1989.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4126-4138, 1984.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.

VAZZOLER, A.E.A.M.; MENEZES, N.A. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysi). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 52, p. 627-640, 1992.

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

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.

WRIGTH, S. **Evolution and the Genetics of Populations**, v. 4: Variability Within and Among Natural Populations. Chicago: The University of Chicago Press, 1978. 590 p.

XU, Z. et al. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellite. **Aquaculture**, v. 199, p. 13-40, 2001.

YAN, J. et al. RAPD and microsatellite analysis of diploid gynogens from allotetraploid hybrids of red crucian carp (*Carassius auratus*) X common carp (*Cyprinus capio*). **Aquaculture**, v. 243, p. 49-60, 2005.

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