

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**

**Microssatélites em estudos populacionais de peixes  
migratórios.**

**Gabriel de Menezes Yazbeck**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Instituto de Ciências Biológicas**  
**Departamento de Biologia Geral**  
**Pós-Graduação em Genética**

**Microsatélites em estudos populacionais de peixes  
migratórios.**

**Tese de doutoramento apresentada ao curso de  
Pós-Graduação em Genética como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Doutor**

**Gabriel de Menezes Yazbeck**

**Orientador: Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis**  
**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Cleusa Graça da Fonseca**

**Belo Horizonte**  
**Agosto de 2007**

**“Um *expert* é uma pessoa que já cometeu todos os erros possíveis dentro de um campo bem específico do conhecimento”**

Livre tradução de citação atribuída a Niels Bohr.

## Agradecimentos

Em especial, aos meus pais Fuad e Lola, à Carol e a toda minha família (incluindo tia Lurdinha, *in memorian*, tios e primos de BH e à Clarinha), a quem dedico esse trabalho. Ao órgão financiador CNPq (programa CT-HIDRO e SEBIE). Evanguedes, Yogi, John Nelson, Cleusa, à banca examinadora, Mônica, Paula Eterovick, Vasco, Hugo Godinho, *Department of Biology Uvic*, Cathy Carolfeld e filhos, amigos do *World Fisheries Trust* (Brian, Carmen, Alex), amigos do Centro de Transposição de Peixes, Alexandre Godinho, Ben Koop, Chris Wood, Glenn Cooper, Bruno, Cibele, Thais, Flávia Galindo, Simone Araújo, Carol Campolina, Alessandra, Fabíola, Higgor, Ana Luiza, Juliana, Marcelo, André, Alexsandra, Tati, Bárbara, Anderson, André, Isabella, Ana Paula, Maria, aos estagiários da PUC, Kika, Lidiane, Claudete, Flavinha e todos os demais alunos e estagiários do Lab. de Biotecnologia e Marcadores Moleculares que ajudaram nas preps. Luciene, Leo, Gustavo, Isabela, Kris, Carolyn, Luke, Pauline, Ross, Mike Wilson, Mariann, Chantal. Professores da Bio Geral, Dona Nailda, amigos do Lab. Maria Raquel, Marlene, Luciana, Daiane, Joana, amigos do Lab Bernadete, particularmente a Renata, amigos do Lab Mônica/Adlane/Chartone, amigos do Lab Fabrício, particularmente Leandro e Dani, Marina e Sônia (secretárias), Maiza, Prof. Marcus Vinicius, AHE Funil e Bios consultoria ambiental Lavras, IEF (Miguel Ribon e Marcelo Coutinho), IBAMA-MG, CEMIG, Furnas, em particular Marcília e Dirceu Marzullo, Paulo Formágio), Hélio Baba, Uyrá, Leandro Arb, Eduardo Almeida. A todos os amigos de moradia, Júlio Fontenelle, Elder Morato, Ricardo Latini, Lazarento, Marcos, Dani “Diego”, Simon, Grace, Pedro, Grisa, os malabras, Zeca, Jeff e Martin, Erlon, Gleiber e ao amigos Alexandre Jiló, Márcia e Marcelinho. Jean-Paul, Diane e Martin Laroche. Seu José Celso e Dona Vera. Pela contribuição na minha formação: Paulo De Marco, Lucio, Bernadete, EK, Lucia, Adriano Paglia e amigos do PET, a todos os amigos da Bio95 em particular Samuel e Pablo. Aos meus amigos David, André, Viti, Bilunga (Guta e Maíra também), Kiti e Leo Ribeiro. Zimba e amigos do Forum em especial ao Studabaker (Neil Dennis Ritchie *in memorian*). Pela eterna inspiração, Frank Zappa (*in memorian*) e Hermeto Pascoal.

Capítulo I.....	13
<b>Isolamento e caracterização de marcadores moleculares em <i>Prochilodus lineatus</i></b> <b>(Characiformes).....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 – Introdução.....</b>	<b>14</b>
1.1.2 - O rio Grande.....	14
1.1.3 - <i>Prochilodus lineatus</i> (Valenciennes, 1836).....	17
1.1.4 - A Genética de populações dos peixes migratórios do rio Grande.....	20
1.1.5 - Marcadores Moleculares: DNA microssatélite.....	24
<b>1.2 - Justificativa .....</b>	<b>26</b>
<b>1.3 - Objetivos.....</b>	<b>27</b>
1.3.1 - Objetivo principal.....	27
1.3.2 - Objetivos específicos .....	27
<b>1.4 - Material e Métodos .....</b>	<b>27</b>
1.4.1 - Coleta dos peixes e de tecido .....	27
1.4.2 - Biologia Molecular .....	27
1.4.2.1 - Extração de DNA Genômico .....	27
1.4.2.2 - Biblioteca Genômica.....	28
1.4.2.3 - Vetor de Clonagem.....	28
1.4.2.4 - Transformação e seleção pelo sistema IPTG/x-gal.....	29
1.4.2.5 - Purificação de plasmídeos e organização da biblioteca genômica.....	30
1.4.2.6 - Triagem de clones positivos .....	30
1.4.2.7 - Seqüenciamento e desenho de iniciadores .....	31
1.4.2.8 – Padronização de PCR e Testes de polimorfismo.....	31
1.4.2.9 - PCR para análise populacional .....	32
1.4.3 - Análises populacionais e métodos estatísticos .....	33
<b>1.5 - Resultados.....</b>	<b>34</b>
1.5.1 - Biblioteca Genômica.....	34
1.5.2 - Triagem de clones positivos .....	37
1.5.3 – Seqüenciamento de clones positivos.....	38
1.5.4 – Teste e padronização de iniciadores para PCR .....	39
1.5.5 – Análises populacionais.....	44
<b>1.6 – Discussão .....</b>	<b>51</b>
1.6.1 – Microssatélites .....	51
1.6.2 - Biologia molecular .....	53
1.6.2.1 – Biblioteca genômica.....	53
1.6.2.2 – Seqüenciamento.....	54

1.6.2.3 – Construção e testes de iniciadores para PCR.....	55
1.6.2.4 – PCRs e análises populacionais.....	56
1.6.3 – Considerações finais .....	61
1.7 - Conclusões.....	62
Capítulo II.....	63
Avaliação genética de práticas para formação de estoques procriadores em <i>Oncorhynchus mykiss</i> (Salmoniformes) utilizados em peixamentos. ....	64
2.1 Introdução .....	64
2.1.1 – Sistemas de peixamento e conceitos genéticos associados.....	65
2.1.2 – Sistema provincial de lagos de procriação .....	68
2.1.2 - <i>Oncorhynchus mykiss</i> .....	69
2.2 Justificativa .....	74
2.3 Objetivos.....	74
2.3.1 - Objetivos gerais .....	74
2.3.2 - Objetivos específicos .....	74
2.3 Material e Métodos.....	75
2.3.1 Coleta de amostras .....	75
2.1.1 Desenho amostral .....	75
2.2.3 Extração de DNA, PCR e eletroforese.....	77
2.3.4 Análises populacionais e estatísticas .....	79
2.4 Resultados.....	80
2.4.1 Amplificações.....	80
2.4.2 Testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) .....	82
2.4.3 Número de alelos .....	83
2.4.4 Diferenciação e estrutura populacional.....	90
4.5 Análise de Estoque misto.....	93
2.5 - Discussão.....	95
2.5.1 - Amostras populacionais, loci e EHW .....	95
2.5.2 – Riqueza alélica e sistemas de formação de estoques reprodutores .....	96
2.5.3 – Diferenciação genética e estrutura populacional .....	98
2.5.4 –Considerações finais .....	103
2.5 Conclusões.....	105
Bibliografia .....	106
III - Apêndices .....	122
Apêndice A:.....	123
Apêndice B:.....	129
Apêndice C:.....	130

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.1:</b> Hidrografia regional da bacia do rio Grande.....	16
<b>Figura 1.2:</b> Rio Grande, sua bacia de drenagem (delimitada pelo traçado pontilhado) e a localização das represas de UHEs.....	16
<b>Figura 1.3:</b> Indivíduos de <i>P. lineatus</i> .....	19
<b>Figura 1.4:</b> Mapa do vetor pUC18.....	29
<b>Figura 1.5:</b> Iniciadores utilizados para amplificação dos clones (vetor pUC18).....	31
<b>Figura 1.6:</b> Gel de agarose 1% mostrando: A) DNA genômico total, e B) DNA genômico digerido com enzima de restrição .....	34
<b>Figura 1.7:</b> Gel de agarose 1% com as duas etapas de purificação de fragmentos genômicos.....	34
<b>Figura 1.8:</b> Placa de agarose/brometo (negativo) para quantificação de DNA.....	35
<b>Figura 1.9:</b> Gel de agarose 1% (negativo) evidenciando a integridade do DNA genômico....	35
<b>Figura 1.10:</b> Gel de agarose 0,8% (negativo) mostrando o vetor de clonagem desfosforilado pUC18.....	35
<b>Figura 1.11:</b> Placa de Petri contendo meio de cultura LB-Agar com Ampicilina e com o sistema de seleção de clones IPTG/x-gal.....	36
<b>Figura 1.12:</b> Gel de Agarose (negativo). Produtos de PCR dos clones selecionados pelo sistema IPTG/x-gal.....	36
<b>Figura 1.13:</b> Exemplo de auto-radiografia de membranas de hibridização na sondagem da biblioteca genômica de <i>Prochilodus</i> .....	37
<b>Figura 1.14:</b> Gel de agarose 0,8% (negativo) mostrando plasmídeos com insertos positivos para microssatélites de fragmentos de DNA de <i>Prochilodus</i> .....	38
<b>Figura 1.15:</b> Exemplos de seqüências repetitivas mais raras encontradas no seqüenciamento de clones positivos.....	39
<b>Figura 1.16:</b> Gel de agarose 1% (imagem negativa). A) exemplos de clones de <i>P. lineatus</i> isolados com microssatélites (1 a 13). B) respectivos produtos de PCR.....	40
<b>Figura 1.17:</b> Dois exemplos de teste parcial de temperatura de anelamento. Cada par de canaletas correspondem a dois indivíduos distintos (1 e 2), repetidos através do gradiente..	41
<b>Figura 1.18:</b> Diagrama de agrupamento dos genótipos da amostra de <i>P. lineatus</i> do Funil.	42
<b>Figura 1.19:</b> Riqueza alélica em cada locus segundo o estimador <i>jackknife</i> .....	47
<b>Figura 1.20:</b> Curvas de acumulação amostral para cada um dos cinco <i>loci</i> .....	47
<b>Figura 1.21:</b> Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli30.....	49
<b>Figura 1.22:</b> Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli34.....	49
<b>Figura 1.23:</b> Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli43.....	50
<b>Figura 1.24:</b> Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli60.....	50
<b>Figura 1.25:</b> Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli61.....	51



<b>Figura 2.1.</b> Representação da Terra com destaque para a área aproximada da distribuição original de <i>O. mykiss</i> .....	71
<b>Figura 2.2:</b> Fêmea selvagem de <i>O. mykiss</i> do lago Pennask.....	72
<b>Figura 2.3:</b> Macho sub-adulto selvagem de <i>O. mykiss</i> do rio Blackwater.....	73
<b>Figura 2.4:</b> Macho (acima) e fêmea (abaixo) adultos do lago Tzenzaicut.....	73
<b>Figura 2.5:</b> Diagrama esquemático ilustrando a relação das populações selvagens e os lagos de estoques procriadores.....	76
<b>Figura 2.6:</b> Exemplo de amplificação no <i>locus</i> OTS 4.....	80
<b>Figura 2.7:</b> Exemplo de amplificação no <i>locus</i> OTS 100.....	81
<b>Figura 2.8:</b> Exemplo de amplificação no <i>locus</i> OTS 103.....	81
<b>Figura 2.9:</b> Exemplo de amplificação no <i>locus</i> Oki 20.....	82
<b>Figura 2.10:</b> Exemplo de amplificação no <i>locus</i> Omy 77.....	82
<b>Figura 2.11:</b> Comparação da riqueza <i>jackknife</i> entre amostras populacionais do grupo de fontes selvagens.....	85
<b>Figura 2.12:</b> Comparação da riqueza <i>jackknife</i> entre amostras populacionais do grupo Blackwater.....	86
<b>Figura 2.13:</b> Comparação da riqueza <i>jackknife</i> entre amostras populacionais do grupo Tzenzaicut.....	87
<b>Figura 2.14:</b> Comparação da riqueza <i>jackknife</i> entre amostras populacionais do grupo Pennask.....	88
<b>Figura 2.15:</b> Comparação da riqueza <i>jackknife</i> entre amostras populacionais do grupo Premier.....	89
<b>Figura 2.16:</b> Árvore <i>neighbour joining</i> de similaridade utilizando-se a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards.....	94

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.1.</b> Percentagem de clones positivos encontrados na biblioteca de <i>P. lineatus</i> .....	38
<b>Tabela 1.2:</b> Condições para realização de PCR e gel de poliacrilamida para os cinco loci caracterizados.....	42
<b>Tabela 1.3:</b> Seqüência dos iniciadores, composição do tema, percentagem de indivíduos positivamente amplificados (N=95) e intervalo de tamanhos de fragmentos para os cinco loci caracterizados.....	42
<b>Tabela 1.4:</b> <i>Loci</i> de microssatélites de <i>P. lineatus</i> .....	45
<b>Tabela 1.5:</b> Resultado do teste de desequilíbrio de ligação para cada par de <i>loci</i> .....	48
<b>Tabela 2.1:</b> Amostras populacionais de truta arco-íris, códigos, origem e tamanho amostral.....	76
<b>Tabela 2.2:</b> Temperaturas de anelamento e concentração dos géis de poliacrilamida e seqüências dos iniciadores direto e reverso utilizados para cada <i>locus</i> .....	79
<b>Tabela 2.3:</b> Valores exatos de probabilidade de desvios do EHW.....	83
<b>Tabela 2.4:</b> Número de alelos observados em cada locus para todas amostras populacionais (riqueza alélica absoluta).....	84
<b>Tabela 2.5:</b> Valores de $F_{st}$ entre pares de populações. Valores em negrito são não significativos a 5% de probabilidade e indicam ausência de estruturação no par de populações.....	92
<b>Tabela 2.6:</b> Análise de Variância Molecular – AMOVA.....	93

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

A:	Adenina.		
AHE:	Aproveitamento hidrelétrico.		
ANEEL:	Agência Nacional de Energia Elétrica (Brasil).		
C:	Citosina.		
CEMIG:	Companhia Energética de Minas Gerais.		
cm:	Centímetros.		
cm <sup>2</sup> :	Centímetros quadrados.		
EHW:	Equilíbrio de Hardy-Weinberg.		
DNA:	Ácido Desioxorribonucléico.		
F:	Coeficiente de endogamia.		
FAO:	<i>Food and Agriculture Organization.</i>		
FFSBC:	<i>Freshwater Fisheries Society of British Columbia.</i>		
F <sub>ST</sub> :	Índice de fixação de Wright.		
F <sub>1</sub> :	Primeira geração filial.		
g:	Gramas.		
G:	Guanina.		
GL:	Graus de liberdade.		
H:	Heterozigiosidade.		
H <sub>e</sub> :	Heterozigiosidade esperada.		
H <sub>o</sub> :	Heterozigiosidade observada.		
h:	Horas.		
k:	Número de <i>clusters</i> .		
km <sup>2</sup> :	Quilômetros quadrados.		
km/dia:	Quilômetros por dia.		
kW:	Quilowatt.		
m:	Metros.		
m:	Taxa de migrantes.		
MAI:	Modelo de alelos infinitos.		
mCi:	Milicurie (radioatividade).		
mL:	Mililitros.		
mM:	Milimolar.		
mtDNA:	DNA mitocondrial.		
MTP:	Mecanismo de transposição de peixes.		
N:	Tamanho amostral.		
N <sub>e</sub> :	Tamanho efetivo populacional.		
N <sub>A</sub> :	Número de alelos (riqueza alélica)		
p:	Probabilidade.		
pb:	Pares de base.		
PCHs:	Pequenas centrais hidrelétricas.		
PCR:	<i>Polymerase Chain Reaction</i>		
pH:	Potencial hidrogeniônico.		
RAPD:	<i>Random Amplified Polymorphic DNA.</i>		
RFLP:	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism.</i>		
SEDE:	Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico (MG)		
SEMAD:	Secretaria de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (MG)		
SMM:	<i>Stepwise Mutation Model</i>		
T:	Timina.		
t:	Número de gerações.		
UHEs:	Usinas Hidroelétricas.		
WCD:	<i>World Commission on Dams.</i>		
α =	Significância do teste.		
Θ:	Teta (Análogo de F <sub>ST</sub> ).		
μg:	Microgramas.		
μL:	Microlitros.	χ <sup>2</sup> :	Qui-quadrado.

## Resumo

Neste estudo foram descritos cinco novos *loci* de microssatélites para a espécie de piracema *Prochilodus lineatus*, endêmica da América do Sul e de grande importância para pesca comercial e artesanal na sua área de ocorrência. Uma biblioteca genômica primária não-enriquecida foi construída e triada radioativamente para temas repetitivos. Os clones positivos foram seqüenciados automaticamente e novos iniciadores para PCR foram desenhados. Foram determinadas as melhores condições de amplificação e de corrida eletroforética para cada um dos *loci* caracterizados. Sua utilidade em estudos de genética de populações foi verificada através de análises de equilíbrio Hardy-Weiberg (EHW),  $F$  e de estimativas *jackknife* do número dos alelos (riqueza alélica) em uma amostra de peixes ( $N=95$ ) capturados a jusante da represa do Funil, rio Grande, Brasil. O número de alelos variou entre três e 21 e as heterozigosidades esperadas variaram entre 0,58 e 0,91. Dois dos cinco *loci* estavam em EHW. As estimativas *jackknife* do número de alelos foram mais altas do que o número observado de fato em três *loci* e puderam fornecer uma medida do viés amostral. Esses marcadores irão fornecer ferramentas importantes para a determinação da estrutura genética e delimitação de estoques, na conservação e gerenciamento sustentável da pesca em reservatório, além de auxiliar nas práticas de pisciculturas e na tomada de medidas de mitigação ambiental no rio Grande.

Uma outra parte do estudo enfocou o uso de marcadores microssatélites para avaliar um sistema de estoques de procriação na Columbia Britânica (BC), Canadá. Peixamentos para pesca recreativa com truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) são uma prática comum em BC. Isso é feito através do uso de lagos de procriação onde são criados peixes de origem selvagem. A prole desses indivíduos é usada nos peixamentos em outros lagos na província. O uso de um número limitado de indivíduos para formação de população de procriação pode potencialmente levar à divergências genéticas indesejadas, diferenciando o estoque de procriação das populações selvagens. As fontes selvagens são escolhidas em função de características morfológicas e de história de vida que são compatíveis com os lagos alvo do peixamento. O objetivo deste estudo foi determinar o quanto o programa provincial de lagos de procriação de BC tem sido bem sucedido em manter diversidade genética das linhagens de truta arco-íris utilizadas para os peixamentos. Cinco *loci* de microssatélites polimórficos foram usados em um total de 12 amostras populacionais, compreendendo três populações selvagens e quatro lagos de procriação (incluindo amostras distintas da mesma população e uma amostra histórica) somando um total de 1025 indivíduos. Foram avaliados equilíbrio EHW e valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações selvagens e seus respectivos lagos de procriação. Uma análise de variância molecular (AMOVA) foi realizada, bem como uma árvore de Neighbour Joining, utilizando-se a distância da corda de Cavalli-Sforza/Edwards. A riqueza alélica foi avaliada com um estimador *jackknife*. O número médio de alelos por locus foi de 12 ( $dp \pm 9,87$ ) e somente duas amostras estavam em EHW em todos os *loci*. O  $F_{ST}$  no conjunto das três populações selvagens foi de 0,126 ( $dp \pm 0,02$ ) e no conjunto de todas as amostras populacionais seu valor foi de 0,098 ( $dp \pm 0,05$ ). Alguns pares de populações selvagens e seus respectivos lagos de procriação não demonstraram diferenciação significativa e a AMOVA mostrou que menos de 3% da variação total está distribuída dentro de grupos (lagos de procriação e populações selvagens correspondentes) e que quase 7% da variação total é devida às diferenças entre grupos. Estes resultados sugerem que a maioria das populações dos lagos de procriação sofreu alguma diferenciação genética. Entretanto, o programa provincial foi bem sucedido em reter alguma variabilidade genética (riqueza alélica) devido à introduções recorrentes de indivíduos selvagens nos lagos de procriação.

Os resultados encontrados aqui são de grande importância para a conservação genética de estoques de pisciculturas e sistemas de procriação.

## Abstract

In this study five novel microsatellite loci were described for the *piracema* fish species *Prochilodus lineatus*, endemic to South America and of extreme importance to both commercial and artisanal fisheries across its occurrence area. A primary unriched genomic library was constructed and radioactively screened for repetitive motifs. Positive clones were automatically sequenced and upon the design of new primers, polymerase chain reaction (PCR) essays were carried out to determine optimum reaction and electrophoretic conditions for each characterized loci. We evaluated its usefulness in population genetic studies by analyzing Hardy-Weiberg Equilibrium (HWE),  $F$  and a jackknife estimate of the number of alleles for a sample of fish ( $N=95$ ) caught below the Funil hydroelectrical power plant dam, Grande River, Brazil. Number of alleles varied from three to 21 and expected heterozigositities ranged from 0.58 to 0.91. Two out of five loci were in HWE. Jackknife estimates of number of alleles were higher than the observed number of alleles for three loci and could provide a measure of sampling bias. Those markers should provide important tools for the determination of genetic structure, stock delimitation and reservoir fish management in the Grande River as well to improve hatcheries practices for environmental mitigation measures and help sustaining fisheries in the river.

Another part of this study aims at the use of microsatellite markers to evaluate a broodstock system in British Columbia (BC), Canada. Stocking of sport fishing lakes with rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is a common practice in BC. One way this has been accomplished is through the use of broodstock lakes which hold fish of wild origin. The progeny of these broodstock fish is used to stock lakes elsewhere in the province. The use of a limited number of individuals for broodstock can potentially lead to unwanted genetic divergence away from wild source populations. Wild sources of broodstock are chosen for particular life history and morphological traits that are desirable for the lakes to be stocked. The objective of this study is to determine how well the provincial BC broodstock program has retained genetic diversity of different rainbow trout strains. Five polymorphic microsatellite loci were used in a set of 12 populational samples, comprised by three wild source populations and four broodstock lakes (including multiple and historical samples) adding up to a total of 1025 individuals. Hardy-Weiberg Equilibrium (HWE) and pairwise  $F_{ST}$  was verified among the wild fish samples and their respective broodstocks. An Analysis of Molecular Variance (AMOVA) was performed and a neighbor joining tree was constructed with the Cavalli-Sforza/Edwards chord distance. Allele richness was assessed with a jackknife estimator. The average number of alleles was 12 ( $sd\pm 9.87$ ) per locus and only two samples were in HWE throughout all loci.  $F_{ST}$  for the set of three wild populations was 0.126 ( $sd\pm 0.02$ ), while the value overall samples was 0.098 ( $sd\pm 0.05$ ). Some pairs of wild populations and related broodstock lakes did not show significant differentiation and the AMOVA showed that less than 3% of the total variation is distributed among populational samples in the same group (broodstock and their respective wild sources populations) and almost 7% is due to differences among groups. These results suggest that most broodstock populations have undergone some differentiation from their original sources. However, the provincial broodstock program has been successful in retaining some genetic variability (allelic richness) due recurrent introductions of wild brood individuals. The findings presented here are of great importance to the genetic conservation of hatcheries and broodstocks.

## **Capítulo I**

### **Isolamento e caracterização de marcadores moleculares em *Prochilodus lineatus* (Characiformes)**

# **Isolamento e caracterização de marcadores moleculares em *Prochilodus lineatus* (Characiformes)**

## **1.1 – Introdução**

### **1.1.2 - O rio Grande**

A sub-bacia hidrográfica do rio Grande está inserida dentro da bacia do rio Paraná, uma das maiores do Brasil e que ocupa cerca de 10,5% do território nacional (891.309 km<sup>2</sup>), drenando áreas da região sul, sudeste e centro-oeste e constituindo, juntamente com a bacia do rio Paraguai e do rio Uruguai, a grande bacia do Prata (ou Platina). A bacia do rio Grande ocupa uma área de 161.000 km<sup>2</sup>, dos quais quase dois terços pertencem ao estado de Minas Gerais e o restante ao estado de São Paulo (Paiva *et al.*, 2002).

O rio Grande (Figura 1.1) nasce em Minas Gerais, a uma altitude de 1.239m na serra da Mantiqueira, próximo aos municípios de Alagoa e Bocaina de Minas. Desde sua cabeceira até sua foz, onde sua confluência com o rio Paranaíba marca o início do rio Paraná, o rio Grande percorre uma distância de 1.301 km, com um desnível de 960m. Seus principais tributários são: rio das Mortes, rio Jacaré, rio Uberaba e rio Verde à margem direita; e rio Aiuruoca, rio Cervo, rio Sapucaí, rio Sapucaí-Mirim, rio Pardo e rio Turvo à margem esquerda. Seu afluente situado mais ao norte é o São Bartolomeu que vem das redondezas de Brasília, DF. Em seu trecho alto, na região do sudeste mineiro o rio corre para o norte, sua calha é estreita, predominantemente encaixada, sinuosa e com sucessivas cachoeiras e corredeiras - um típico rio de planalto (Paiva *et al.*, 2002). No entanto, a partir do município de Santana do Garambéu, MG, onde o rio se volta para oeste, começa uma sucessão de barragens de Usinas Hidroelétricas (UHEs), que hoje proporcionam ao rio uma nova fisionomia.

O rio Grande atualmente possui 12 represas de UHEs em funcionamento e uma em processo de licenciamento. Minas Gerais é o segundo produtor de energia elétrica do Brasil com a capacidade instalada de 17.452.817 kW. Desse total, 92% é oriundo de geração hidrelétrica. De toda a energia elétrica produzida em Minas Gerais cerca de 41% é gerada no rio Grande (ANEEL – dados de 2004 – [www.aneel.gov.br](http://www.aneel.gov.br)). A primeira barragem construída no rio Grande foi uma pequena usina em um braço da cachoeira do Marimbondo em 1929 (diferente da atual Usina Marimbondo). A partir do final dos anos 50 do século XX, começaram as implantações de UHEs de grande porte ao longo do rio, inicialmente com a implementação de Furnas, estão criadas como forma de evitar uma crise energética no país.

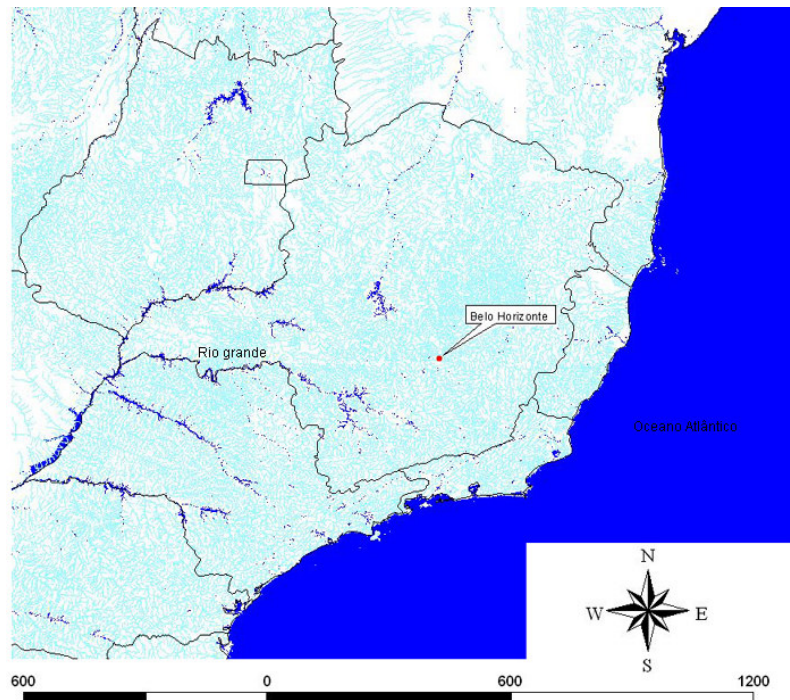
Em função das represas, pode-se dividir o rio Grande em i) alto: Camargos, Itutinga e Funil; ii) médio: Furnas, Peixoto, Estreito, Jaguará, Igarapava, Volta Grande e Porto Colômbia; e iii) baixo: Marimbondo e Água vermelha até a foz com o rio Paranaíba (Paiva *et*

*al.*, 2002). A Figura 1.2 mostra o mapa de Minas com a localização das represas de UHEs ao longo do rio Grande.

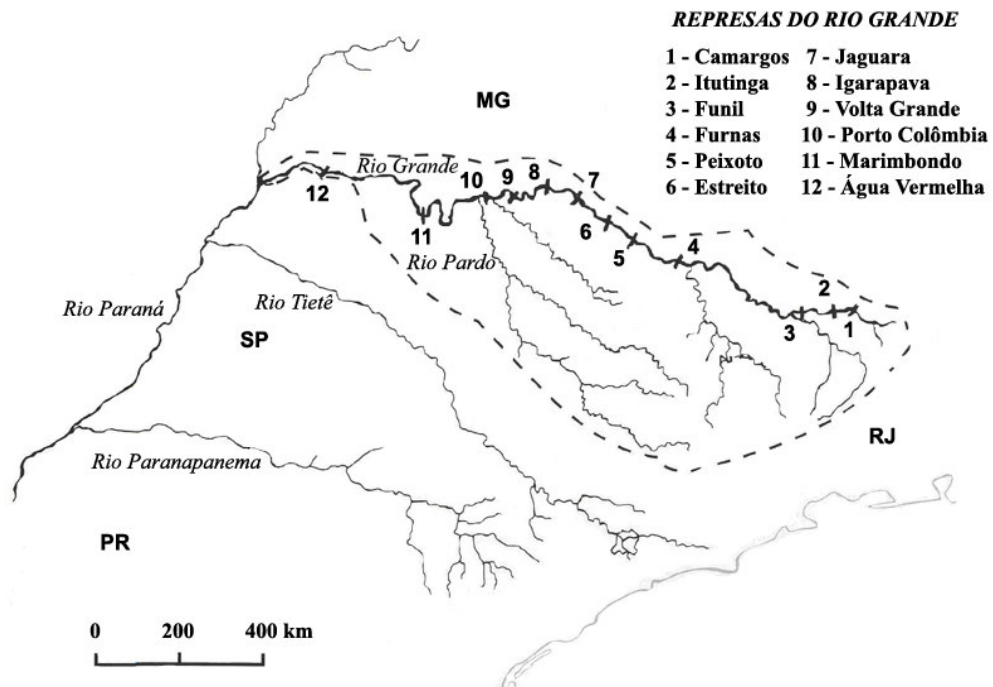
Segundo Paiva *et al.* (2002) há registros, na bacia do rio Grande, de 161 espécies nativas de peixes, distribuídas em 21 famílias das quais 97 espécies, compreendidas em 16 famílias, são encontradas nas represas do rio Grande (dados de 2000). A presença maciça de UHEs no rio alterou suas características originais de corredeiras caudalosas para um ambiente *quasi*-lêntico, efetivamente transformando a maior parte do rio em uma série de lagos artificiais (Godinho e Godinho, 1994). A implementação de barragens de UHEs leva a uma série de alterações bióticas e abióticas como: redistribuição das áreas inundadas e interrupção do ciclo de cheias de lagoas marginais, modificações físico-químicas e no regime do fluxo de água (efeitos de primeira ordem), interferências na produtividade primária da comunidade (efeitos de segunda ordem) e modificações na abundância relativa das espécies, incluindo a eliminação de algumas espécies nativas e favorecimento competitivo de espécies exóticas (efeitos de terceira ordem) (Berkamp *et al.*, 2000; WCD, 2000).

As represas, juntamente com a introdução de espécies exóticas, poluição, eutrofização e assoreamentos, figuram entre as perturbações de ambiente mais importantes, levando a modificação das comunidades, queda da abundância e até mesmo a extinção local de populações peixes (Vrijenhoek, 1998, Latini e Petrere, 2004, Agostinho *et al.*, 2005, Cunico e Agostinho, 2005). Das 97 espécies de peixes presentes nos reservatórios do rio Grande, 24 estão presentes em todos os trechos do rio, sendo a maioria espécies migratórias (espécies de piracema) de grande importância pesqueira. Acredita-se que estas espécies mantenham-se no rio principalmente porque realizam migrações reprodutivas em direção aos tributários do Grande, uma vez que espécies de piracema são reofílicas (*i.e.*, dependem de correntes para deflagrarem a maturação sexual) (Godoy, 1967) e não encontram ambiente propício nas águas calmas dos reservatórios.





**Figura 1.1:** Hidrografia regional da bacia do rio Grande. A malha hidrográfica está representada em azul claro, os maiores cursos d'água e reservatórios em azul escuro. Escala em quilômetros.



**Figura 1.2:** Rio Grande, sua bacia de drenagem (delimitada pelo traçado pontilhado) e a localização das represas de UHES. Modificado a partir de Paiva et al., (2002).

Atualmente, apenas dois mecanismos de transposição de peixes (MTP) estão ativos no rio Grande, a escada de peixes na Usina de Igarapava (em funcionamento desde 2000 - a maior do seu tipo no Brasil) e um elevador de peixes na Usina do Funil (em funcionamento desde 2003). A eficiência de ambos, no entanto, ainda está sendo avaliada (e.g. Bowen *et al.* 2006, Silva, 2004) e seguramente tem diferentes graus de sucesso em transpor diferentes espécies, podendo ser, por exemplo, positivamente (escada) ou negativamente (elevador) seletivas para tamanho dos peixes. Uma lei estadual (Minas Gerais lei n° 12488 de 09 de abril de 1997) obriga a construção de mecanismos de transposição em todas barragens novas construídas no estado e estipulou um prazo para a construção de mecanismos nas represas já existentes. No entanto essa obrigatoriedade não se aplica no caso de “em virtude das características do projeto da barragem, a medida for considerada ineficaz”. A transposição manual de peixes da jusante para a montante de barragens ou os repovoamentos (peixamentos) realizados a partir das estações de aquicultura (pisciculturas), como as de Volta Grande e Furnas, têm sido usados como medidas mitigadoras dos efeitos das represas de UHEs.

### **1.1.3 - *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836)**

O gênero *Prochilodus* está entre os mais abundantes e amplamente distribuídos dos peixes de água doce da América do Sul. É constituído de espécies detritívoras e iliófagas (se alimentam de pequenos crustáceos e de suas larvas nos fundos lamacentos), migratórias, de tamanho médio a grande e que constituem parte importante do volume de pesca continental no Brasil (Petrere, 1989). *Prochilodus lineatus* (= *P. scrofa*) (Castro, 1990) – Figura 1.3 - pertence à família Prochilodontidae (Characiformes), ocorre na bacia do Paraná-Paraguai e do rio Paraíba do Sul e é um dos peixes mais importantes para a pesca na bacia do Grande (Castro e Begossi, 1996). Comumente conhecido como *curimba*, *curimbatá*, *curimatá*, *curimatã*, *corimba*, *grumatã*, *grumatá* ou *papa-terra*, esse é um típico peixe de piracema (espécies potamódroma), onde o adulto realiza migrações reprodutivas rio acima na estação chuvosa (novembro-março) e os ovos e larvas derivam passivamente junto com a correnteza por dezenas de quilômetros rio abaixo. A espécie possui hábitos bentopelágicos (vive e se alimenta nas camadas próximas fundo e nas águas médias) e que possui uma característica boca em forma de ventosa, situada na região mais ventral da cabeça. Na literatura já foi registrado um indivíduo de cerca de 75 cm (Castro e Vari, 2003). Na bacia do Paraná, já foi a espécie mais numerosa na pesca artesanal, após a formação dos reservatórios de barragens no rio Paraná, mas agora é menos abundante do que *Pterodoras granulosus*, o armado.

No rio Grande, *P. lineatus* já foi capturado em todas as represas lá existentes, exceto Jaguára, segundo levantamento de Paiva *et al.*, (2002). Sua maior abundância acontece na época chuvosa (novembro-março) esse fato parece determinar o aumento da atividade

pesqueira nas pequenas comunidades ribeirinhas no Grande (Castro e Begosi, 1995). A curimba é comumente criada nas pisciculturas do Grande onde sua reprodução é possível com técnicas de indução de hormonal (Godinho *et al.*, 1984).

Estudos de biologia geral, reprodutiva e dos movimentos migratórios dessa espécie foram realizados na bacia do Grande por Godoy (1954, 1957, 1959, 1967, 1972 e 1975). Nestes trabalhos foram marcados mais de 27.000 indivíduos jovens e adultos de curimba. Com os dados de devoluções de marcas e de recapturas, Godoy sugeriu uma estrutura física para o rio, a qual delinearía os padrões de migração, em função de barreiras naturais, como cachoeiras, que só eram efetivamente transpostas em situações de cheias atípicas. Barreiras naturais identificadas no rio grande incluíam: cachoeiras do Funil, Peixoto, Furnas, Marimbondo e Patos. Godoy (1972) constatou a migração de indivíduos de até 1.110 km em um ano, entre os rios Grande, Pardo e Mogi-Guaçu (tributário do rio Pardo), sendo que indivíduos de curimba nadam entre cerca de 10 a 16 km por dia na época reprodutiva. Um indivíduo chegou ser registrado realizando um deslocamento que apontou para a velocidade média de quase 44 km/dia.

Silva (2004) monitorou o comportamento migratório 22 indivíduos de *P. lineatus* do rio Grande, marcados por meio de radiotransmissores, no ato da captura a jusante da UHE de Volta Grande e posteriormente transpostos para o reservatório a montante da barragem, entre 2002 e 2004. De forma semelhante ao relatado em Godoy (1959), Silva (2004) aponta para a existência de dois comportamentos migratórios distintos em curimba: um em que poucos indivíduos prontamente continuam subindo o rio, após a transposição, e outro onde indivíduos permaneceram nas proximidades do local de soltura, por até alguns meses antes de iniciarem seu deslocamento rio acima. Com o monitoramento de telemetria esse estudo pôde acompanhar a subida de 10 indivíduos através do reservatório de Volta Grande, até atingirem a barragem de Igarapava, sendo que destes sete realizaram a passagem pelo MTP lá existente e continuaram seu movimento ascendente em direção à barragem de Jaguára. Capeleti e Pertere, (2006) monitoraram o movimento de curimbas no Mogi-Guaçu na escada de peixes da cachoeira das Emas e observaram aspectos de uma leva migratória tardia (março e abril), chamada de temporãa, que parece não ter caráter reprodutivo e onde os peixes eram menores do que dos meses precedentes, no entanto, constituindo uma importante parte da biomassa dos indivíduos migrantes.



**Figura 1.3:** Indivíduos de *P. lineatus*: a) indivíduo bacia do Paraná-Paraguai. Foto de Sara Sverlij e Ricardo Defino – Fishbase.org; b) Indivíduo típico com cerca de 50 cm de comprimento total. Represa do Funil, rio Grande, MG. Foto de Gabriel de M. Yazbeck; c) Indivíduo em seu ambiente natural, rio Baía Bonita, MS. Foto de Otávio Froehlich e Marcel Rodrigo Cavallaro - Fishbase.org.

Estudos de filogeografia em espécies do gênero *Prochilodus* foram realizados por Sivasundar *et al.*, (2001) em quatro grandes bacias sul-americanas (Orinico, Magdalena, Amazônica e Paraná) através de seqüências de genes mitocondriais. As análises apontaram que cada bacia constituía grupos monofiléticos distintos e estabeleceu relações de genealogia entre eles, que sugeriu que a expansão do gênero se deu a partir de regiões mais setentrionais, até as mais meridionais. Neste trabalho os autores também realizaram uma análise populacional em 26 indivíduos de *P. lineatus* dentro da bacia do Paraná, utilizando-se a região controle de replicação do DNA mitocondrial. Cada indivíduo apresentou um haplótipo distinto com graus de divergência nas seqüências variando entre 0.3 e 3.6% (1275 pb com 223 posições variáveis). No entanto, a distribuição filogeográfica dos haplótipos não seguia a distribuição esperada de acordo com o arranjo espacial das localidades originárias de cada haplótipo. Esses resultados foram apontados como evidência de amplo fluxo gênico dentro da bacia hidrográfica e falta de estruturação genético-populacional para esta espécie dentro da área estudada na bacia do Paraná.

Esses resultados estão em consonância com os estudos realizados por Revaldaves *et al.*, (1997). Neste trabalho os autores avaliaram a variabilidade genética de 160 indivíduos de *P. lineatus*, em três rios da bacia do Paraná (Paraná, Baía e Ivinheima). O estudo foi feito com o uso de isoenzimas (12 *loci*) e também apontou uma alta similaridade genética entre as populações ( $F_{ST}=0,018$ ), que foi interpretada como sendo indicio de altas taxas de fluxo gênico entre peixes das diferentes localidades. Carvalho (2002) isolou e descreveu dois loci de microssatélites para *P. lineatus* e os usou em uma análise preliminar de estrutura de indivíduos coletados através do rio Grande e não conseguiu detectar qualquer indicação de diferenciação populacional ao longo do rio. Ramella *et al.* (2006) realizou uma descrição preliminar de 11 indivíduos de *P. lineatus* do rio Uruguai, na bacia Platina com uso de marcadores RAPD. Essa técnica também foi empregada no estudo da espécie *P. marggravii* (Hatanaka e Galetti, 2003) e de *P. argenteus* (Hatanaka *et al.*, 2006) no rio São Francisco, para elucidar a possível existência de estrutura genética populacional desses na região da barragem de Três Marias. Barbosa *et al.* (2006) caracterizaram 13 *loci* de microssatélites para *P. argenteus* e Carvalho-Costa *et al.* (2006) isolaram e descreveram seis novos loci para *P. costatus*, ambos através de metodologia de biblioteca enriquecida.

#### **1.1.4 - A Genética de populações dos peixes migratórios do rio Grande**

A genética de populações é o campo que estuda a distribuição e a abundância dos genótipos e alelos nas populações (variabilidade genética), os fatores que modulam suas freqüências, bem como a relação entre o espaço genotípico e o espaço fenotípico (Lewontin, 2000).

A difusão da técnica de seqüenciamento manual de DNA e o uso de enzimas de restrição aplicados ao estudo de polimorfismos RFLP, no início dos anos 80, abriram novas possibilidades para a análise genética das populações. A partir do início dos anos 90, com o surgimento da PCR e sua aplicação em estudos populacionais (Zangh e Hewitt, 2003). Pela primeira vez os geneticistas de populações tiveram acesso irrestrito a uma gama enorme dos mais diversos tipos de polimorfismos genéticos, agora analisados diretamente no material hereditário. Hoje a quantidade de dados populacionais geradas é considerável e só agora alguns dos modelos mais sofisticados desenvolvidos no início do século passado são de fato confrontados diretamente com observações empíricas.

Através da análise genético-populacional, imensamente facilitada pelo uso de marcadores de DNA, como microssatélites e DNA mitocondrial (mtDNA), podemos estimar níveis de fluxo gênico históricos e recentes entre populações, avaliar a distribuição da variabilidade genética total dentro e entre populações e inferir sobre o tempo de isolamento entre estas populações (Sunnucks, 2000). Recentemente a utilidade do uso de mtDNA em inferências históricas/demográficas, no entanto, vem sendo questionada (Bazin, *et al.*, 2006). Esse entendimento dos padrões de distribuição da variabilidade genética das populações e a delimitação correta de estoques pesqueiros são essenciais para a elaboração de estratégias eficientes visando à conservação de peixes (Spruell *et al.*, 2003).

Uma medida útil da diferenciação genética entre populações é o estimador de  $F_{ST}$  de Weir e Cockerham (1984), também chamado de  $\theta$  (ver Excoffier *et al.*, 2001 para uma discussão sobre  $\theta$  e  $F_{ST}$ ). Esse estimador estende o índice de fixação ( $F_{ST}$ ) de Wright (1931, 1943) para  $n$  *loci* com  $n$  alelos em cada *locus* de forma não-viciada. Assumindo-se a neutralidade do marcador, uma estimativa da distância genética entre populações pode ser feita relacionando-se a diferenciação genética acumulada entre populações com os efeitos da mutação e da deriva genética. Porém uma formulação exclusivamente demográfica de  $\theta$  pode ser obtida considerando-se nulo o efeito da mutação (Slatkin, 1991). Então a diferenciação é inversamente proporcional ao tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) por efeito de deriva ( $\theta = t/t+2N_e$ ), onde  $t$  é o número de gerações de isolamento. Relacionando-se agora a taxa de migrantes ( $m$ ) entre populações segundo um modelo de isolamento por distância,  $\theta$  se relaciona com o número de migrantes da seguinte forma:

$$\theta = \frac{1}{1 + 8N_e m}$$

No caso do rio Grande, como tem havido a construção de barragens desde os anos 50 (hoje são 12 barragens no rio Grande), houve um bloqueio do movimento migratório de algumas espécies de peixes ao longo do rio. Isso pode potencialmente levar a uma

subdivisão populacional, através da interrupção do fluxo gênico ( $m=0$ ) entre grupos de indivíduos isolados a jusante e a montante das barragens. Isso pode contribuir para uma diminuição do tamanho efetivo populacional, o que por sua vez levará à perda de variabilidade genética dentro das populações e à diferenciação entre as populações (Frankham, 1996), diminuindo a probabilidade de persistência de populações importantes para a atividade pesqueira, ou sob ameaça de extinção (Neraas e Spruell, 2001; WCD, 2000). A perda da variabilidade genética influencia nas chances de extinção de uma espécie, por ser essencial à capacidade das populações responderem a mudanças ambientais como, por exemplo, o surgimento de uma doença (Waples *et al.*, 1990; Reed e Frankham, 2003).

Outro efeito genético potencial advindo da fragmentação de rios é um aumento da frequência de acasalamentos consangüíneos (endogamia), que levam ao surgimento de depressão endogâmica, que é a perda de valor adaptativo médio populacional em função do aumento da frequência de homozigotos para alelos deletérios ou letais. A depressão endogâmica e a baixa heterozigosidade já foram demonstradas como fatores importantes capazes de determinar a extinção de populações experimentais de *Drosophila* (Frankham, 1995) e de lepidópteros na natureza (Saccheri *et al.*, 1998), além de ter sido associada à ocorrência de deformações em indivíduos de estoques cultivados de salmonídeos (Tiira *et al.*, 2006).

Outros possíveis problemas genéticos associados à implementação de barragens e ao gerenciamento de reservatórios de UHEs estão relacionados à alteração radical das condições ambientais (mudança de ambiente lótico para ambiente lêntico). A interrupção dos ciclos de cheias, a perda dos ambientes de forrageamento (lagoas marginais) e as mudanças abióticas associadas à criação de grandes reservatórios podem impor novos regimes de seleção às populações de peixes impactadas, eventualmente levando à diferenciação populacional dentro do rio ou da bacia (Heggenes e Røed, 2006). No outro extremo desse espectro está a situação inversa, a do isolamento proporcionado pelo barramento: devido à existência prévia de obstáculos naturais nos locais onde hoje se encontram algumas barragens, há a possibilidade de que populações geneticamente distintas, anteriormente isoladas por esses obstáculos e que possuem adaptações locais importantes, passem a ser misturadas pelas práticas de transposição de peixes da jusante para a montante ou pela implementação errônea de uma passagem de peixes, como, por exemplo, uma escada de piracema, ocasionando o rompimento dessas adaptações específicas e diminuindo o valor adaptativo médio populacional (Lenormand, 2002).

A problemática do impacto genético de grandes barragens tem gerado um grande interesse recentemente em diferentes partes do mundo, como pode ser avaliado através do crescente número de publicações na área (*e.g.* Engelbrecht *et al.*; 1997; Ferguson e

Duckworth, 1997; Neraas e Spruell, 2001; Paragamian *et al.*, 2001; Hatanaka e Galetti, 2003; Zhang *et al.*, 2003; Stamford e Taylor, 2005; Hatanaka *et al.*, 2006; Heggenes e Røed, 2006; Jager, 2006; Small *et al.*, 2006; Song *et al.*, 2006; Yamamoto *et al.* 2006 e Deiner *et al.*, 2007)

Outro aspecto relevante da genética populacional dos peixes curimba do rio Grande é a realização dos peixamentos (*i.e.* introduções de peixes oriundos de pisciculturas nos reservatórios). Segundo a CEMIG, as atividades de peixamentos começaram de forma sistemática no rio Grande a partir de 1976, com a inauguração da Unidade Ambiental Volta Grande. Ainda na década de 70 a estação de piscicultura de Furnas também entrou em funcionamento. A atividade de peixamento visa suplementar as populações de peixes nativos e até a introdução espécies exóticas. Essa prática tem sido utilizada como uma das poucas formas de mitigação de impactos de barragens de UHEs, solicitada por força de lei e por parte das agências ambientais como condicionantes dos empreendimentos. Sua eficiência como medida compensatória isolada é questionável, no entanto, sobretudo do ponto de vista da conservação e da genética populacional, visto a forma como a prática tem sido tradicionalmente conduzida. Por exemplo, ao se fundar uma população cativa de *P. lineatus* nas pisciculturas do rio Grande, podem ser utilizados o sêmen de um único macho profícuo e óvulos de poucas (<10) fêmeas para se gerar milhares de ovos fecundados. A implicação de tal prática é que há uma redução extrema do tamanho efetivo populacional na  $F_1$  e este estoque fica propenso a uma considerável perda da variabilidade genética presente na população selvagem (efeito de gargalo genético). Outro problema freqüente é o uso de matrizes reprodutivas oriundas de localidades muitas vezes distintas do local alvo do repovoamento (até de outras bacias) para a formação do plantel. Isso pode ser potencialmente problemático em função da eventual existência de adaptações locais, que do ponto de vista de estratégias de manejo são objetos prioritários para o esforço conservacionista.

Quando realizados de forma não sistemática e planejada, os peixamentos podem ter efeitos adversos nas populações naturais (Miller e Kapuscinski, 2003; Utter, 2003). A mistura de dois estoques distintos de peixes pode ter implicações ecológicas diretas na viabilidade de cada grupo. Quando surge uma  $F_1$  oriunda da reprodução de um estoque misto, esta passa a ser denominada admistura (Kalinowski, 2004). Nessas populações mistas é possível observar o fenômeno da introgressão genética, que é a troca de alelos privados (exclusivos) entre duas formas distintas, através de retrocruzamentos entre formas híbridas com uma das duas formas originais (Billington, 2003). Um risco potencial da introdução de genes exógenos na população é o da perda de adaptações locais específicas importantes para a os indivíduos nativos (Lenormand, 2002; Garant *et al.*, 2003). Se houve historicamente uma estruturação genética populacional em diferentes trechos do rio Grande, é possível que as populações de



curimba apresentem adaptações locais importantes, que devem ser identificadas para nortear os programas de cruzamento em pisciculturas, auxiliar nas escolhas de estoques para a realização de peixamentos e os esforços de conservação. Efeitos genéticos dessa prática tem sido discutidos e apresentados para algumas espécies de peixes na literatura, há algum tempo (*e.g.* Ryman e Stahl, 1980; Allendorf e Ryman, 1987; Krueger e May, 1991; Toledo-Filho *et al.*, 1992; Ryman *et al.*, 1993; Toledo-Filho *et al.*, 1996 Williams *et al.*, 1997; Cagigas *et al.*, 1999; Paragamian *et al.*, 1999; Kostow *et al.*, 2003;).

### 1.1.5 - Marcadores Moleculares: DNA microssatélite

Microssatélites são uma classe de DNA que possui pequenas seqüências repetitivas formadas por temas (*motifs*), geralmente de 2 a 7 pb, dispostos lado a lado (em tandem). Inicialmente foram denominadas de uma série de nomes, incluindo SSRs (*Simple Sequence Repeats*) por Tautz (1989), STRs (*Short Tandem Repeats*) por Edwards *et al.* (1991), sendo o termo microssatélites primariamente destinado aos dinucleotídeos de seqüência CA/GT, em particular (Litt e Luty, 1989; Weber e May, 1989), porém agora sendo amplamente utilizado para todas formas de seqüências repetitivas de temas de até 6 a 8 pares de base, dependendo do autor (*e.g.* Hancock, 1999; Zane *et al.*, 2002).

Seqüências microssatélites são amplamente difundidas em todos genomas eucarióticos (Zane *et al.*, 2002) e sua ocorrência é muito mais freqüente do que o esperado simplesmente ao acaso (Hancock, 1999; Ellegren, 2004). O potencial de se utilizar esses marcadores por meio de amplificação por PCR abriu as portas para uma ampla gama de aplicações nas Ciências Biológicas e, particularmente, na genética de populações (Jarne e Lagoda, 1996; Sunnucks, 2000). Esse fato se deve a suas características úteis à genética populacional, como seu caráter mendeliano, sua hipervariabilidade (grande número médio de alelos por *locus*), seus altos valores de Heterozigosidades (*H*) (Ellegren, 2004), quanto pelo rápido desenvolvimento de metodologias estatísticas para se analisar dados de microssatélites (Sunnucks, 2000). A variação entre diferentes alelos (polimorfismos) nesses marcadores se dá pela diferença de comprimento de segmentos de DNA, em função de diferentes números de temas repetidos lado a lado (o chamado corpo do microssatélite ou *tract*).

Acredita-se que o principal mecanismo de mutação originando estes vários alelos sejam erros de replicação de DNA que envolvem deslizamento da enzima Polimerase de DNA durante replicação (*replication slippage*). Pareamentos e *crossing-overs* desiguais parecem ter um papel mais importante no surgimento do polimorfismo em seqüências repetitivas de temas maiores do que 10 pb (minissatélites) (Ellegren, 2004) e não há evidência empírica que suporte a ocorrência de *crossing-overs* na origem de pequenas seqüências repetitivas.

Microssatélites apresentam uma taxa mutacional muito maior do que outras regiões do mesmo genoma onde se encontram (Hanckok, 1999). Essas taxas variam amplamente entre *loci*, tipos de alelos, espécie, entre outros fatores (Ellegren, 2004). Para humanos tem sido descritas taxas entre  $10^{-2}$  e  $10^{-4}$  (Lai e Sun, 2003) e para salmonídeos, por exemplo, entre  $10^{-2}$  e  $10^{-5}$  (Angers e Bernatchez, 1997). Schlötterer, (2000) descreve as taxas de mutação de microssatélite de um forma geral entre as ordens de grandeza de  $10^{-2}$  e  $10^{-6}$ .

O principal modelo de mutação aplicado em estudos com esses marcadores é o chamado Modelo Passo-a-Passo (*Stepwise Mutation Model* - SMM), bem como modelos derivados deste. Sua lógica é que um alelo só sofre mutação para alelos de tamanhos adjacentes (*e.g.* um alelo com sete repetições só mudaria para um alelo de oito ou seis repetições), sempre em múltiplos inteiros (Ellegren, 2004). No entanto, trabalhos de observação direta de transmissão de alelos da parental para a  $F_1$  em peixes recomendam precaução com a aplicação do SSM para estimar-se medidas de distância genética entre populações (*e.g.* Angers e Bernatchez, 1997; Oppen *et al.*, 2000) e modelos cada vez mais sofisticados de evolução de microssatélites e suas implicações têm sido propostos (*e.g.* Kruglyak *et al.*, 1998; Watkins, 2007).

Os microssatélites têm sido aplicados a uma série de estudos relevantes à conservação como, análise de estrutura genética populacional, taxas de fluxo gênico, determinação de paternidade, estimativas de tamanhos efetivos populacionais atuais e históricos, determinação de aspectos de história de vida e padrões migratórios, determinação de variabilidade genética intrapopulacional, determinação de unidades taxonômicas operacionais, detecção de híbridos, entre outros (diversos exemplos e estudos de caso são descritos em Frankham *et al.*, 2002; Avise, 2004 e Allendorf e Luikart, 2007), uma vez que seu alto polimorfismo tem trazido a tona padrões que não eram observados utilizando-se marcadores menos polimórficos, como isoenzimas (Hedrick, 2001).

Uma desvantagem dos microssatélites é que, na maioria das vezes, esses marcadores precisam ser isolados e caracterizados *de novo* para cada espécie de interesse, um trabalho financeiramente custoso, tecnicamente elaborado e intensivo (Zane *et al.*, 2002). Ainda assim, marcadores de microssatélites têm sido continuamente descritos para várias espécies (comunicações de novos loci caracterizados podem ser facilmente encontrados em publicações como o periódico *Molecular Ecology Notes*) e esses marcadores tem sido amplamente utilizados com sucesso em estudos de genética populacional e conservação de peixes (Hiltsdorf e Kriger, 1998).

## 1.2 - Justificativa

A conservação e o gerenciamento racional de recursos naturais é de importância extrema e estratégica para uma política sustentável de desenvolvimento que vislumbre resultados eficientes a médio e longo prazo. A manutenção de estoques viáveis de espécies de importância pesqueira tem um papel central tanto na subsistência de pequenas colônias de pescadores, quanto no desenvolvimento econômico regional (pesca continental artesanal, comercial e esportiva). Estudos básicos e aplicados sobre a ictiofauna brasileira são essenciais para o delineamento de estratégias participativas de conservação, que usem conhecimentos integrados das mais diversas disciplinas.

Marcadores genéticos moleculares específicos (como microssatélites) podem ser usados em uma série de estudos sobre a biologia básica de peixes como, aspectos de comportamento reprodutivo, migração, história de vida, além de diversos estudos sobre genética e evolução (mapeamento genético de outros genes de interesse farmacológico ou comercial, estudos de estrutura genético-populacional, estudos sobre hibridização de espécies próximas na natureza, etc).

A exploração da energia hidrelétrica e a implementação de novas barragens no futuro são um fator preponderante podendo contribuir para extinções locais de espécies de importância pesqueira e seus potenciais impactos devem ser ativamente mitigados através de gerenciamento participativo. Segundo dados da Secretaria de Estado de Desenvolvimento Econômico (SEDE) e a de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SEMAD) de Minas Gerais, (SEMAD, 2007) está sendo estudado um plano de desenvolvimento do setor energético, que vislumbra a potencial implementação de até 45 usinas hidrelétricas (UHEs) e 335 pequenas centrais hidrelétricas (PCHs), durante os próximos vinte anos.

Microssatélites e outros marcadores genéticos têm um enorme potencial de aplicação prática para esse e outros tipos de problemas ambientais: determinação da necessidade de implementação de mecanismos de transposição, acompanhamento da eficiência de peixamentos, delimitação de estoques para manejo da pesca e de populações de reservatórios de hidrelétricas, seleção de matrizes em pisciculturas, seleção de animais para reintrodução/peixamentos, identificação de material biológico, detecção de pesca ilegal em áreas/espécies protegidas, etc. A descrição de *loci* de microssatélites é, portanto, de grande relevância para estudos de biodiversidade no Brasil.

*Prochilodus lineatus* é a principal espécie na pesca no rio Grande, MG (Castro e Begossi, 1995 e Castro e Begossi, 1996), além de outras bacias brasileiras (Petrere, 1989). A pesca é a principal fonte de alimentos de origem selvagens (não-cultivada) para as populações humanas (FAO, 2002). O Brasil tem um grande potencial de pesca continental, o que deve ser explorado de forma a favorecer o desenvolvimento econômico sustentável e

socialmente responsável. Para que isso seja alcançado é preciso conhecer melhor vários aspectos da biologia dos peixes nos rios, a fim de interferir ativamente no manejo da pesca, realização de peixamentos e mitigar as conseqüências desastrosas de catástrofes ambientais e da sobrepesca.

### **1.3 - Objetivos**

#### **1.3.1 - Objetivo principal:**

- Essa parte do trabalho tem como objetivo a identificação, o isolamento e a caracterização de regiões de DNA microssatélite, apropriadas para estudos genético populacionais, na espécie *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae).

#### **1.3.2 - Objetivos específicos**

- Produzir uma biblioteca genômica primária abrangente do genoma de *P. lineatus*.
- Aplicar os marcadores desenvolvidos na análise genético-populacional de uma amostra de peixes do rio Grande.

### **1.4 - Material e Métodos**

#### **1.4.1 - Coleta dos peixes e de tecido**

A amostra populacional (N=95) foi coletada a jusante da represa hidrelétrica AHE Funil (Ver ponto 3 na figura 1.2), no município de Lavras, MG, em dezembro de 2005. Os animais foram coletados por meio de redes de espera e tarrafas de diferentes tamanhos de malha. No ato da coleta uma pequena porção (1 cm<sup>2</sup>) de nadadeira caudal foi recortada e fixada em um microtubo contendo 1 mL de etanol 70%, para posterior extração de DNA no laboratório. Após a coleta de tecido, os peixes foram devolvidos ao rio.

#### **1.4.2 - Biologia Molecular**

##### **1.4.2.1 - Extração de DNA Genômico**

A obtenção de DNA genômico de curimba para a montagem da biblioteca genômica foi feita através de um protocolo de purificação de alto rendimento: aproximadamente 3g de tecido muscular de um espécime de curimba foram utilizados para a extração do DNA genômico total. O protocolo consiste no uso de 10 mL de solução tampão TEN9 (50 mM Tris-

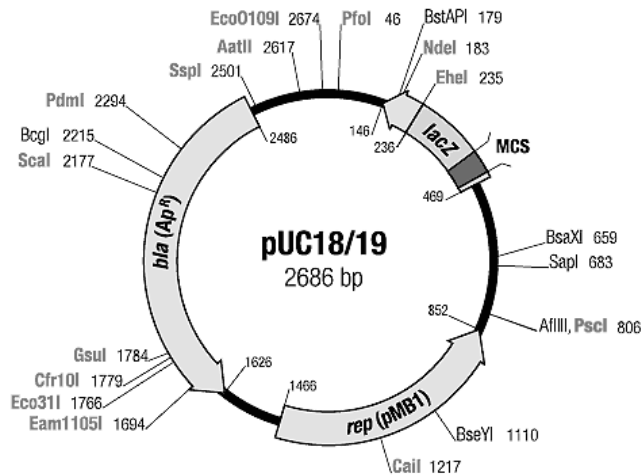
HCl, 100 mM EDTA pH 9.0, 200 mM NaCl), 500 µl de SDS 20% e 500 µl de proteinase K (10 mg/mL). O material foi incubado a 37° C por cerca de 24 h e em seguida purificado com fenol-clorofórmio e precipitado com acetato de amônio 10 M e 1 volume de isopropanol. O DNA obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 200 µl TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA).

#### **1.4.2.2 - Biblioteca Genômica**

Cerca de 10 µg do DNA genômico do peixe foi digerido com a enzima de restrição Sau3A1 (cliva GATC), segundo protocolo padrão da companhia fornecedora (Promega). Os fragmentos de DNA resultantes foram submetidos a uma reação de ligação entre si, com uso da enzima T4 DNA Ligase (Promega), para verificação de sua integridade para clonagem. Os fragmentos da digestão foram então purificados em coluna de Sephacryl 400 (GE *Healthcare*) e novamente, em seguida, em coluna de Sepharose S400 (Amersham). Cada passo foi acompanhando visualizando-se os resultados em gel de agarose 0,8%. O intuito do uso das colunas de resina foi o de excluir fragmentos de DNA genômico menores (< 400 pb) da montagem da biblioteca.

#### **1.4.2.3 - Vetor de Clonagem:**

O vetor de clonagem escolhido foi o plasmídeo pUC18 (Figura 1.4), que possui um gene que confere resistência à ampicilina (*bla*) e um Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS) na região do gene *lacZ*, um importante gene repórter, que codifica para a β-galactosidase. O plasmídeo foi previamente cortado pela enzima de restrição BamH I (cliva GGATCC, presente apenas no MCS) e desfosforilado com o uso da enzima Fosfatase Alcalina (Promega), para evitar a circularização do vetor, deixar suas extremidades livres e aumentar a eficiência da ligação entre os fragmentos de DNA genômico e o plasmídeo. A ligação também foi feita com uso da enzima T4 DNA ligase, de acordo com protocolo padrão do fornecedor. Foram utilizados cerca de 100 ng do vetor pUC18 cortado e desfosforilado e 100 ng do DNA genômico digerido na reação de ligação.



**Figura 1.4:** Mapa do vetor pUC18, evidenciando o Sítio Múltiplo de Clonagem (MCS) no gene repórter *lacZ* e o gene que confere resistência ao antibiótico ampicilina (*bla*).

#### 1.4.2.4 - Transformação e seleção pelo sistema IPTG/x-gal

Para a transformação genética foram utilizadas bactérias eletrocompetentes *Escherichia coli* da linhagem Topo 10. As células foram incubadas com 3 µL do produto da reação de ligação e submetidas a um choque de 2. kVa com um eletroporador *Micropulser* em cubeta própria (Biorad). Então, o material foi ressuscitado em 1 mL de meio líquido 2XYT (NaCl 5g/L, bactotripton 16g/L, extrato de levedura 10g/L, pH 7,5) e incubado a 37° C por 1 hora. Após esse período, o material foi distribuído em 10 placas de meio LB ágar (NaCl 1%; pepton 1%; extrato de levedura 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,5) com ampicilina, IPTG e X-gal. As placas foram incubadas a 37° C por aproximadamente 14 horas, juntamente com controles negativos.

O sistema IPTG/x-gal permite a seleção de colônias que contêm uma inserção de DNA genômico da espécie alvo (inserto) no vetor e exclusão das bactérias transformadas com plasmídeos não ligados ao DNA de interesse: a β-galactosidase cliva o dissacarídeo lactose em galactose e glicose. Nesse tipo de ensaio, a β-galactosidase, que tem sua produção estimulada pela presença de IPTG (Isopropil-beta-D-Tiogalactopiranosídeo) no meio de cultura, cliva o substrato incolor x-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-beta-galactopiranosídeo) resultando na liberação de galactose e um produto insolúvel de coloração azul. A reação ocorre apenas nas células que receberam plasmídeos sem a presença de um inserto de DNA. O sítio de inserção onde o DNA do peixe é ligado no plasmídeo fica dentro da região do gene *lacZ*, portanto as colônias transformadas com DNA genômico não produzem β-galactosidase e permanecem com a coloração esbranquiçada. Controles para a verificação da presença e tamanho de insertos em uma amostra de colônias brancas foram feitos através e ensaios de PCR e verificação posterior em gel de agarose 1%

#### 1.4.2.5 - Purificação de plasmídeos e organização da biblioteca genômica

As colônias brancas foram coletadas das placas de Petri e transferidas para tubos estéreis contendo 1 mL de meio líquido 2XYT com ampicilina e incubadas a 37°C por cerca de 14 h. Após esse período realizou-se o procedimento de lise alcalina das células para o isolamento dos plasmídeos contendo insertos de DNA genômico de curimba (*prep*): os tubos com colônias foram centrifugados e em seguida o meio de cultura foi descartado. O *pellet* foi ressuscitado em 10 µl de solução I (glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0). Em seguida foram adicionados 10 µl de solução II ( NaOH 0.2 N, SDS 1%) e logo em seguida 10 µl de solução III (acetato de potássio 3 M, 11, 5% ácido acético glacial) foi adicionada. Após incubação em gelo por 5 minutos, os tubos foram novamente centrifugados. O sobrenadante foi transferido para novos tubos onde se adicionou 2 volumes de etanol 100%. Após nova centrifugação o sobrenadante foi descartado. Lavou-se o precipitado em 100 µl de etanol 70%, e os tubos foram deixados secar a temperatura ambiente, após a eliminação do excesso de etanol.

Os plasmídeos purificados foram então ressuscitados em 20 µl de TE (Tris-EDTA) com 0,06% de Azul de Bromofenol, imediatamente antes de sua aplicação (0,2 µl) em membranas de 11 x 14 cm de *nylon* carregadas positivamente (Biorad), com as amostras dispostas em forma de grade, com 35 colunas e 27 linhas. O material genético foi imobilizado na membrana através do uso de aparelho *crosslinker*. Cada clone ganhou um nome que é formado pelo número da membrana, seguido letra indicativa da posição da linha ocupada, seguido pelo número da coluna ocupada (*e.g.* 2R18 para o clone na segunda membrana, na fileira “R” e na coluna 18).

#### 1.4.2.6 - Triagem de clones positivos

A busca de regiões microssatélites na biblioteca genômica construída de curimba foi feita com o uso de sondas de oligonucleotídeos de dezesseis pares de base marcadas com [<sup>32</sup>P]ATP radiativo (10mCi/mL – GE *Healthcare*). As sondas de oligonucleotídeos utilizadas para a triagem tinham os seguintes temas de repetição: GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, GAA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT e TA. A marcação radioativa das sondas foi feita em suas extremidades 5' com um *kit* comercial que usa a enzima T4 quinase (5' *Labelling kit* – GE *Healthcare*), segundo protocolo do fornecedor

As reações de hibridização dos oligos marcados com o DNA da biblioteca genômica foram precedidas por períodos de 14 horas de pré-hibridização, onde se realizou o bloqueio da membrana utilizando-se BLOTTO (leite em pó desnatado a 0,2%) e SSC 6X (NaCl 0,9M,

Citrato de Sódio 0,09M). A hibridização foi feita com uma concentração aproximada de 05 ng de sonda/mL de solução, também por 14h. Após esse período foram realizadas lavagens de controle da estringência, utilizando-se concentrações, passo a passo, mais fracas de sal (SSC 6x, 5x 3x) e aumentando-se a temperatura (48°C, 52°C e 55°C), *i.e.* aumentando-se a estringência. Entre cada lavagem, as membranas eram expostas a chapas radiográficas (35 x 43 cm de filme Kodak T-Mat G/RA) por dois períodos de exposição diferentes (4h e 16h) a - 80°C. Após esse período, as chapas foram reveladas e fixadas. As autoradiografias resultantes foram sobrepostas aos moldes utilizados para a aplicação dos clones nas membranas, para a identificação dos clones que apresentam sinais positivos para as sondas de microssatélites utilizadas. As diferentes estringências e tempos de exposição serviram para controlar com maior segurança a atribuição de sinais positivos. Clones com sinais positivos foram submetidos a um novo ensaio de hibridização. Os clones selecionados (reconfirmados para o sinal positivo) estão sendo submetidos à transformação química (protocolo KCl) em células *E. coli* da linhagem TG1, a partir das quais é realizada a purificação de uma maior quantidade de plasmídeos para o seqüenciamento.

#### 1.4.2.7 - Seqüenciamento e desenho de iniciadores

Os plasmídeos purificados selecionados foram seqüenciados múltiplas vezes em ambas as direções utilizando-se seqüenciador automático de 96 capilares (MegaBace) com kits ET ( *DYEnamic ET Terminator Dye - GE Healthcare*) utilizando-se iniciadores M13 para pUC18 (Figura 1.5), seguindo-se o protocolo do fornecedor. As seqüências resultantes foram analisadas por meio dos programas Phred/Phrap/Consed (Ewin e Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998) para obtenção de uma seqüência consenso contígua. As seqüências do inserto de cada clone obtidas são isentas de regiões do vetor e possuem alta confiabilidade. Aquelas que possuíam microssatélites foram selecionadas para caracterização das regiões flanqueadoras e da região repetitiva. Alguns insertos com microssatélites foram selecionados para o desenho de iniciadores para PCR. Para essa tarefa foram utilizados os programas FastPCR (Kalendar, 2006) e AutoDimer (Valone e Butler, 2004).

M13 -20: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'  
M13 REV: 5' GGAAACAGCTATGACCATG 3'

Figura 1.5: Iniciadores utilizados para amplificação dos clones (vetor pUC18)

#### 1.4.2.8 – Padronização de PCR e Testes de polimorfismo.

Iniciadores polimerizados foram testados com condições iniciais padronizadas de 10 pmols de cada iniciador, 1 U de *Taq* (Phonetrria) e com tampão IVB. As reações foram



realizadas com o volume final de 25  $\mu$ L. Para cada par de iniciadores testados, foram avaliadas diferentes concentrações de iniciadores, concentrações de *Taq*, gradiente de temperatura entre 50-70°C (variando-se de dois em dois graus), número de ciclos para PCR (30 e 35) e, quando necessário, diferentes tampões de PCR (IC e IB - Phoeutria), além de concentrações de gel de poliacrilamida (19:1) para corrida eletroforética (10-6% com TAE 2X). Foram selecionadas as condições que resultaram em melhor visualização de bandas e maior redução das inespecificidades. Concomitantemente, com a padronização das reações de amplificação dos *loci* de microssatélites foram realizadas triagens de polimorfismos genéticos em um conjunto de 10 indivíduos de duas localidades distintas. *Loci* de microssatélites que apresentaram mais de um alelo no conjunto dos 10 indivíduos foram considerados polimórficos.

#### **1.4.2.9 - PCR para análise populacional**

O DNA de 95 indivíduos de *P. lineatus* foi extraído a partir de pequenos pedaços (aproximadamente 250 mm<sup>2</sup>) de nadadeira fixadas em etanol 70%, através do método Chelex-proteinase K. Os peixes foram amostrados imediatamente a jusante da barragem UHE do Funil no alto rio Grande em dezembro de 2005, com o auxílio de tarrafas. As amostras foram processadas em placas de 96 poços (sendo um poço usado como controle negativo), cada um com 200  $\mu$ l de tampão contendo 5% de resina Chelex, 0,1% de Tween-20. Então serão adicionados 2  $\mu$ l de Proteinase K (10 mg/mL) e a placa levada para um termociclador onde era aquecida a 60° C por 15 minutos e então, a 95° C por 5 minutos. Esse protocolo está descrito em Nelson *et al.*, (1998) e possibilita a extração de um grande número de indivíduos de maneira rápida, direta e relativamente barata.

As PCR populacionais também foram realizadas em placas de 96 poços, selados com uma gota de óleo mineral, em termocicladores Eppendorf, utilizando-se um passo de desnaturação inicial a 94°C por 2 min., um segundo passo de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento com temperaturas variáveis por 30 s, polimerização a 72°C por 30 s, retornando o ciclo ao segundo passo por 35 vezes e, finalmente, com um passo de extensão final a 72°C por 2 min. Após as reações, 10 microlitros de produto foram aplicados em géis de poliacrilamida (19 acrilamida: 1 bisacrilamida) e corridos à 75 V (~100 mA) por 16 horas com TAE 2X e corados com nitrato de prata (Sambrook e Russell, 2001).

Os géis populacionais foram desidratados e fixados, além de terem sido documentados com fotografias digitais feitas sobre negatoscópio. As imagens digitais dos géis foram analisadas com auxílio do programa LabImage (Kaplan, Halle, Alemanha) e o tamanho das bandas foi determinado com o auxílio de três canaletas (ambas as extremidades e centro do gel) contendo o padrão de peso molecular de 25 pb (Invitogen). A partir dos tamanhos das bandas observadas para cada marcador foram criadas classes

alélicas (*bins*), segundo o algoritmo Flexibin (Amos *et al.*;2007), que foram manualmente inspecionadas.

### 1.4.3 - Análises populacionais e métodos estatísticos

Os alelos determinados pela metodologia de classificação (“binagem”) foram tratados por identidade (*i.e.* desconsiderou-se qualquer relação entre os números de repetições entre diferentes alelos). Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram verificados para cada locus através de teste exato (Guo e Thompson, 1992) com uso do método Monte Carlo com cadeias de Markov e utilizando-se o teste de enumeração completa para loci com quatro ou menos alelos (Louis e Dempster, 1987). Os níveis de significância estatística foram considerados a 5% de probabilidade. Loci que mostraram desvios significativos no teste exato foram submetidos a testes de excesso e déficit de heterozigotos. Essas análises foram realizadas com o programa *Genepop* 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Heterozigosidades esperadas e observadas, além de estimativas de  $F$  (nesse caso o equivalente de  $F_{IT}$ , do estimador de Weir e Cockerham, 1984; Weir e Hill, 2002) foram obtidas com o programa *Genetix* 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004).

Uma análise de agrupamento de genótipos para múltiplos *loci* não-ligados foi conduzida na amostra de indivíduos coletados a jusante Lavras com o programa *Structure* 2.2 (Pritchard *et al.*, 2000). Essa análise avalia, por meio de inferência Bayesiana, a designação de indivíduos à populações hipotéticas, através de Monte Carlo com cadeias de Markov, na tentativa de encontrar subestrutura em uma amostra. Para essa análise, foram empregados 50.000 passos para descarte e 100.000 passos na cadeia.

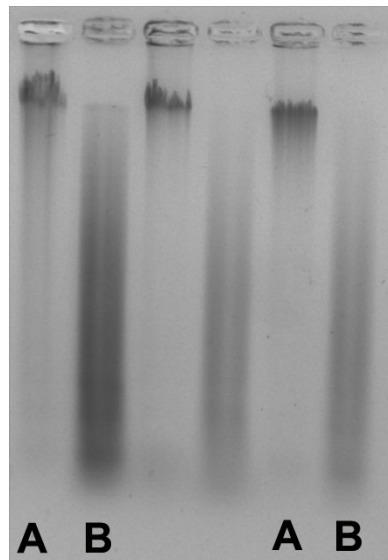
Para se ter uma medida da riqueza alélica em cada locus caracterizado, o número de alelos (riqueza alélica) foi calculado por meio de um estimador *jackknife* de primeira ordem (Efron, 1981), obtendo-se subconjuntos amostrais aleatórios (reamostrando-se indivíduos), de forma que intervalos de confiança a 95% pudessem ser construídos. Para isto, foram utilizados os programas *EstimateS* (Cowell, 2000, com modificações) e *Statistica* (*StatSoft*). Para se avaliar o efeito de tamanhos amostrais e de eventual viés amostral na estimativa de riqueza alélica para cada *locus*, foi construída uma curva de acumulação das estimativas *jackknife*, partindo-se de uma única observação na amostra, incrementando-a uma a uma até chegar-se ao tamanho amostral total.

## 1.5 - Resultados

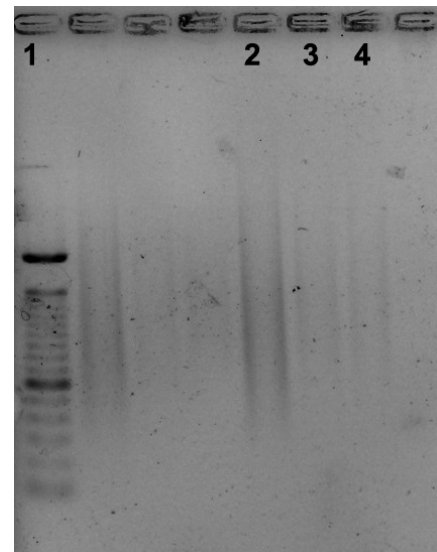
### 1.5.1 - Biblioteca Genômica

A obtenção de DNA genômico de curimba foi realizada por meio de um protocolo de alta performance que permitiu a obtenção de material de alta qualidade (*i.e* alto grau de purificação/ausência de proteínas). O DNA apresentou fragmentos de alto peso molecular, conforme verificado em gel de agarose (Figura 1.6). Com a utilização das colunas de Sephacryl e Sepharose, pudemos eliminar com sucesso fragmentos de DNA menores que 400 pb conforme se pode ver na Figura 1.7. O *pool* de DNA foi então quantificado para a realização da reação de ligação (Figura 1.8). A Figura 1.9 mostra um teste de verificação da integridade do DNA de *P. lineatus* antes de submeter o material à ligação com o vetor de clonagem (pUC18) desfosforilado (figura 1.10) por meio de T4 DNA ligase.

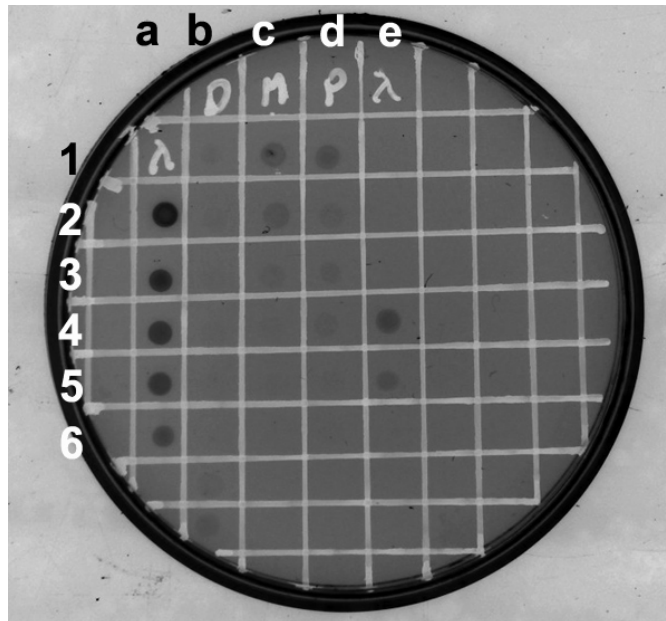
Após a ligação dos fragmentos genômicos com o vetor de clonagem, o material foi usado para transformar células de *E. coli*. As transformações foram feitas por meio de eletroporação e as bactérias transformadas foram plaqueadas em meio sólido contendo o sistema de seleção IPTG/X-gal, que nos permitiu coletar apenas clones com inserto do DNA do peixe no vetor. A Figura 1.11 mostra um exemplo de placa de meio de cultura com esse sistema de seleção.



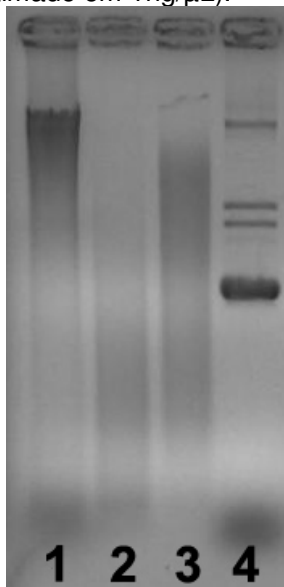
**Figura 1.6:** Gel de agarose 1% mostrando: A) DNA genômico total de *Prochilodus*, evidenciando fragmentos de alto peso molecular e B) DNA genômico digerido com enzima de restrição Sau3A1 mostrando a dispersão de fragmentos de diferentes tamanhos



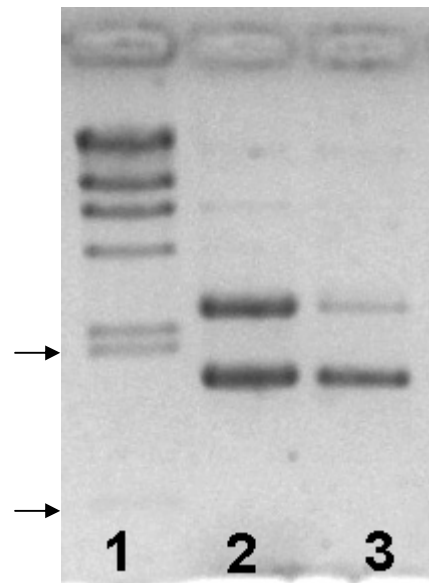
**Figura 1.7:** Gel de agarose 1% com as duas etapas de purificação de fragmentos genômicos. Canaleta 1: padrão de DNA de 100 pb (a seta à direita aponta a região de 600 pb). Canaleta 2: DNA genômico total digerido por Sal 3A1. Canaleta 3: material passado em coluna de Sepharose 400. A Canaleta 4 mostra o material da canaleta 3 novamente purificado em coluna de Sephacryl 400.



**Figura 1.8:** Placa de agarose/brometo (negativo) para quantificação de DNA extraído de *Prochilodus* e purificado para a montagem da biblioteca genômica: as quadrículas de “a1” até “a6”, além das de coordenadas “e4” e “e5”, constituem diluições seriadas do padrão  $\lambda$  Hind III (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,5 ng, respectivamente). As quadrículas de “d1” a “d6” representam diluições seriadas do DNA genômico fragmentado e purificado em coluna de (estimado em 1ng/ $\mu$ L).

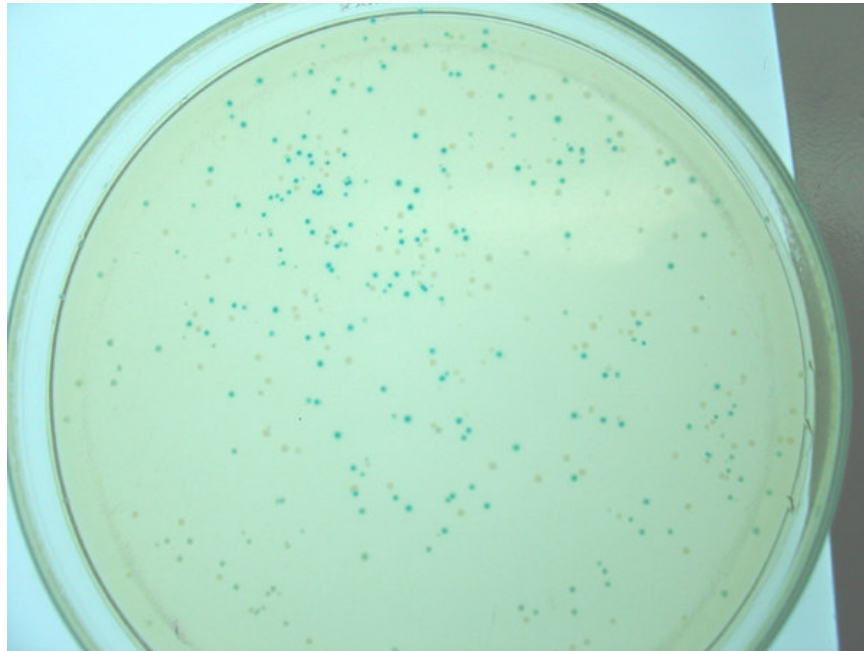


**Figura 1.9:** Gel de agarose 1% (negativo) evidenciando a integridade do DNA genômico de *Prochilodus* para clonagem: 1) DNA genômico total. 2) DNA genômico digerido com Sau 3A1. 3) DNA genômico digerido, submetido a ligação com a enzima T4 DNA ligase. 4) Vetor de clonagem, pUC18.

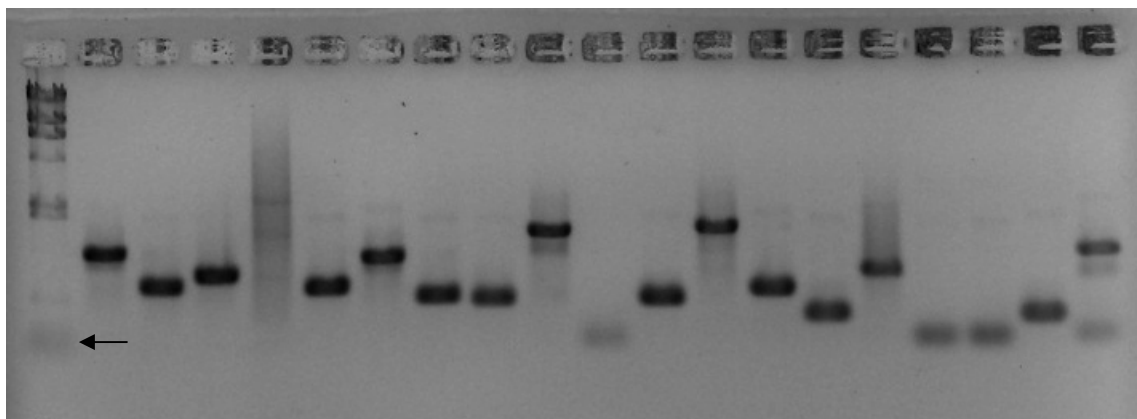


**Figura 1.10:** Gel de agarose 0,8% (negativo) mostrando o vetor de clonagem desfosforilado pUC18 (canaletas 2 e 3). 2 é o estoque e 3 é uma diluição de 1:1 do estoque). A canaleta 1 contém o padrão de comprimento  $\lambda$  Hind III. As setas indicam as regiões de 526 pb (inferior) e de 2 kpb (superior).

Foi realizado um controle desse ensaio de seleção por IPTG/x-gal realizando-se uma PCR dos plasmídeos após a extração. A Figura 1.12 mostra a existência de clones com insertos de grande comprimento (maiores do que 1000 pb), confirmando a eficiência da técnica.



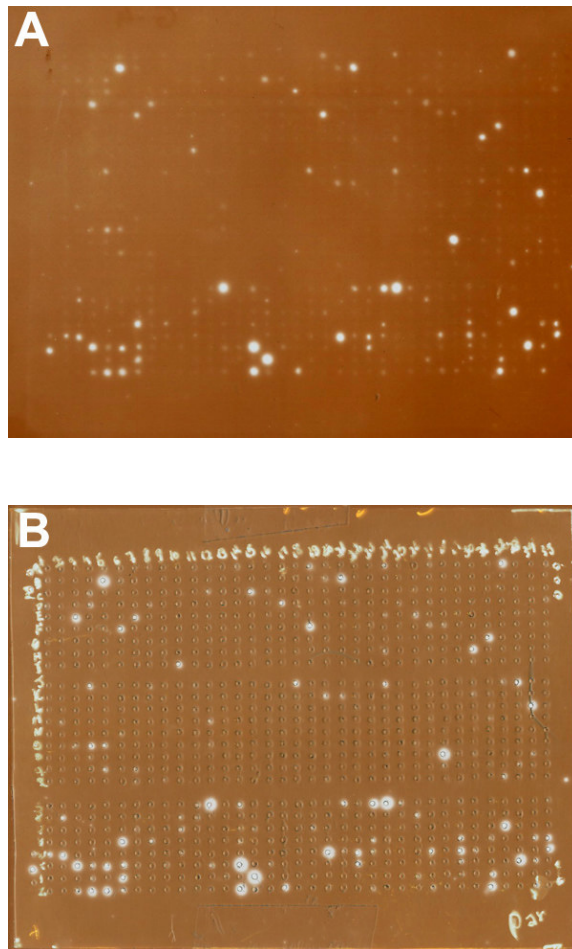
**Figura 1.11:** Placa de Petri contendo meio de cultura LB-Agar com Ampicilina e com o sistema de seleção de clones IPTG/x-gal. As colônias brancas têm inserto de DNA exógeno e não clivam a x-galactose no produto azul e são, portanto, escolhidas para a constituição da biblioteca genômica.



**Figura 1.12:** Gel de Agarose (negativo). Produtos de PCR dos clones selecionados pelo sistema IPTG/x-gal, utilizando-se iniciadores universais M13. A primeira canaleta contém o padrão  $\lambda$  Hind III. As setas indicam as regiões de 526 pb (inferior) e de 2 kpb (superior).

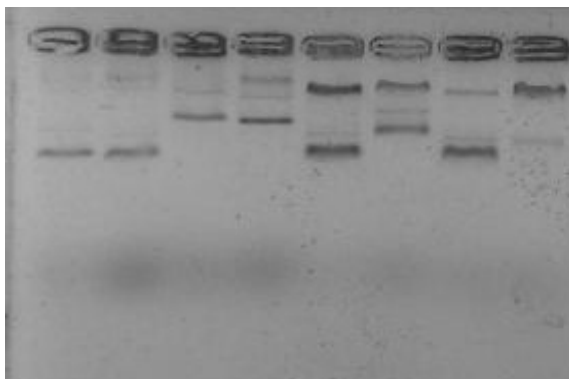
### 1.5.2 - Triagem de clones positivos

Foram aplicados 10.728 clones da biblioteca de *P. lineatus* nas membranas para a sondagem com as sondas radioativas, no entanto, os clones foram plotados em 4.721 *spots* (distribuídos em 6 membranas de nylon positivamente carregadas), de forma que alguns tubos de colônias coletadas continham mais de um clone (1.320 clones individuais; 795 tubos com 2 clones por tubo e 2606 tubos, com 3 clones cada). Esse procedimento, apesar de obrigar a coletar-se mais de uma colônia para a transformação pré-seqüenciamento nos tubos com mais de uma colônia, foi realizado dessa forma, para minimizar o número de *preps* de extração de plasmídeos e minimizar a quantidade de material a ser utilizado na triagem. A Figura 1.13 mostra um exemplo de auto-radiografia resultante da hibridização de uma membrana com clones de *P. lineatus*. A membrana foi aplicada utilizando-se um molde de PVC transparente.



**Figura 1.13:** Exemplo de auto-radiografia de membranas de hibridização na sondagem da biblioteca genômica de *Prochilodus*. A) Negativo da auto-radiografia, os pontos claros representam clones com sinal positivo para microssatélites. B) A mesma auto-radiografia vista com molde de aplicação/localização dos clones em padrão de grade.

A Tabela 1.1 mostra a porcentagem de clones positivos por classe de número de colônias/tubo, bem como a disposição do número de clones por tubo/spot. No total foram encontrados 5,9% de clones positivos em toda a biblioteca, que correspondem a 637 clones positivos. A Figura 1.14 mostra exemplos de clones positivos em gel de agarose.



**Figura 1.14:** Gel de agarose 0,8% (negativo) mostrando plasmídeos com insertos positivos para microssatélites de fragmentos de DNA de *Prochilodus*. Visualização de rotina feita para verificar qualidade dos plasmídios e quantifica-los para sequenciamento.

**Tabela 1.1. Percentagem de clones positivos encontrados na biblioteca de *P. lineatus*.**

	1	2	3	Total
	clone/t	clones/t	clones/tu	
	ubo	ubo	bo	
<b>Total de spots</b>	<b>1.320</b>	<b>795</b>	<b>2606</b>	<b>4.721</b>
<b>Total de clones</b>	<b>1.320</b>	<b>1.590</b>	<b>7818</b>	<b>10.728</b>
<b>Clones positivos</b>	<b>130</b>	<b>141</b>	<b>366</b>	<b>637</b>
<b>% de clones positivos</b>	<b>9,84</b>	<b>8,86</b>	<b>4,68</b>	<b>5,94</b>

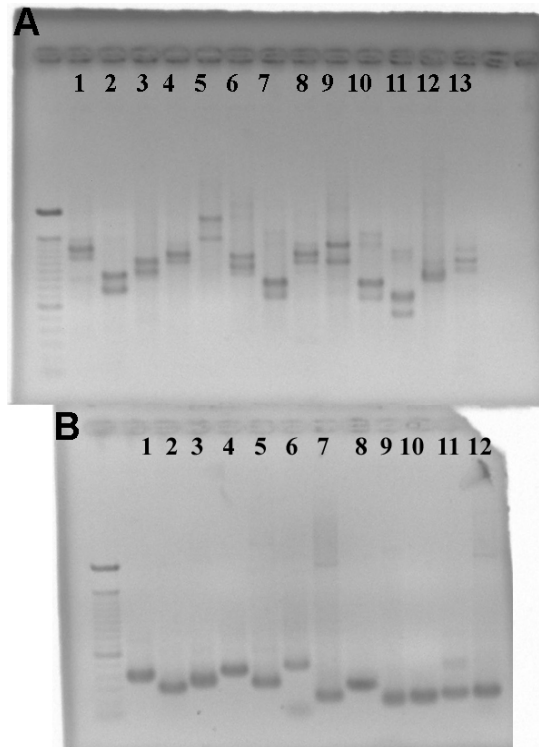
### 1.5.3 – Seqüenciamento de clones positivos

Um total de 67 clones positivos foram submetidos ao seqüenciamento, sendo que destes, 46 (68.6%) apontaram a presença de pelo menos uma curta seqüência repetitiva (<10 pb). Como critérios arbitrários para a seleção de microssatélites candidatos consideramos seqüências repetitivas com temas entre dois e oito pb por repetição, com comprimento de no mínimo 16 pb. Foram encontrados um octa e um pentanucleotídeo no mesmo clone, dois hexa (sendo um próximo a um dinucleotídeo), além de um minissatélite de tema de repetição de 12 pb (Figura 1.15). Cerca de 52% dos microssatélites encontrados (24) foram da classe dos dinucleotídeos (CA/GT e GA/CT), seguido de seis tetranucleotídeos e quatro trinucleotídeos.





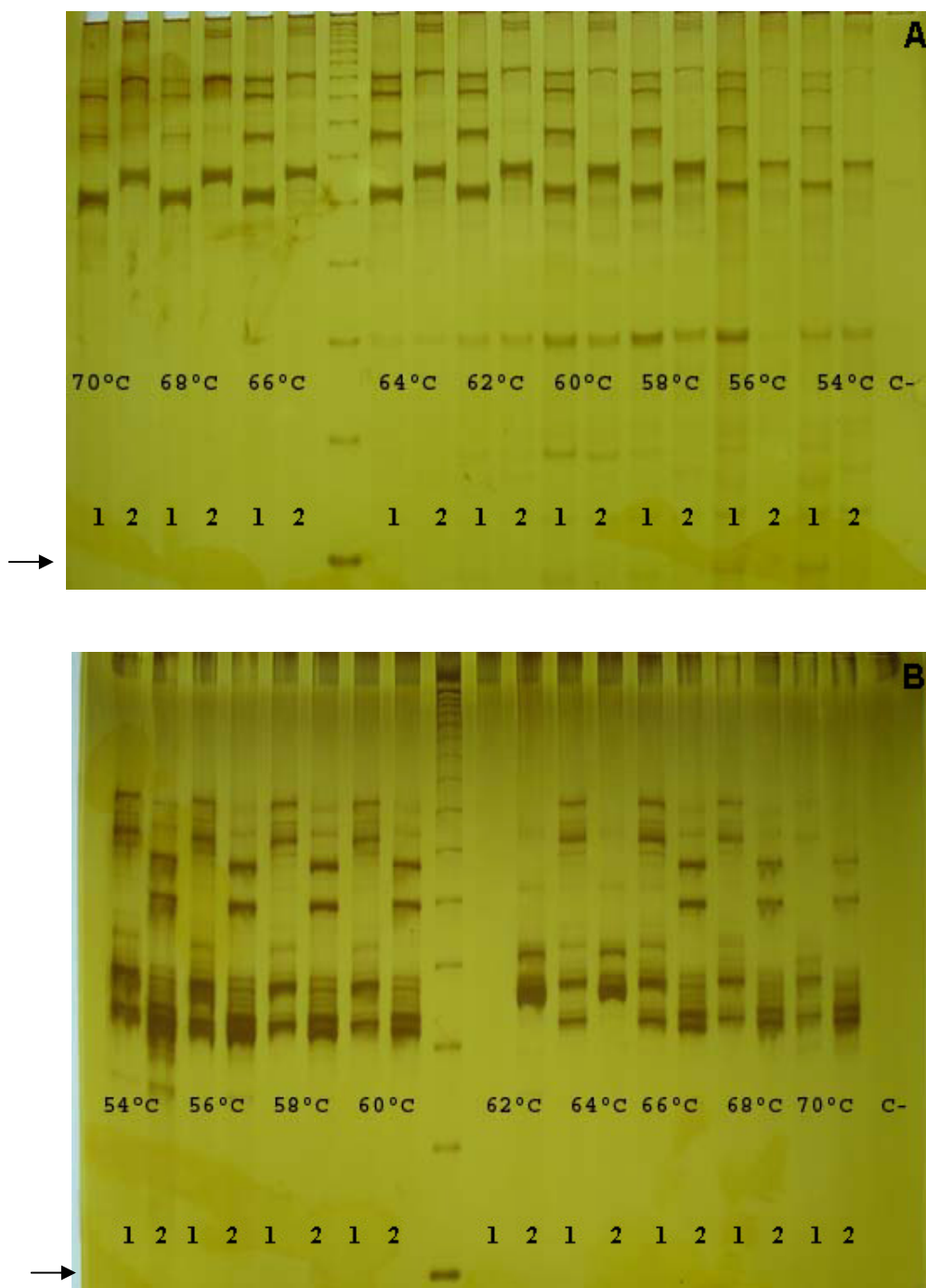
passo 2 e, finalmente, 2 min a 72°C, onde X é a temperatura de anelamento. Para diminuir ou eliminar padrões de ampliações inespecíficos, a maior parte das reações foi feita com menores concentrações de iniciadores (5 p mol de cada iniciador) e todas usaram menores concentrações de Taq (0,5 ou 0,1 unidade). Em alguns casos foram testados diferentes tampões (IC e IB, Phoneutria) mas, no final o tampão IVB foi usado em todas ampliações.



**Figura 1.16:** Gel de agarose 1% (imagem negativa). A) exemplos de clones de *P. lineatus* isolados com microssatélites (1 a 13). B) respectivos produtos de PCR realizadas com iniciadores desenhados nesse trabalho. A primeira canaleta em cada gel contém um padrão de 100pb. A setas indicam a faixa dos 600 pb.

A Figura 1.16 mostra exemplos de ampliações (gel B) feitas com alguns iniciadores e seus respectivos clones originais contendo os microssatélites de *P. lineatus* (gel A). Após ensaios de padronização com 15 pares de iniciadores, dois pares resultaram em ampliações monomórficas e oito apresentaram ampliações muito inespecíficas ou inconsistentes (ver Apêndice A). Cinco pares de iniciadores resultaram em ampliações consideradas satisfatórias para a tipagem de alelos em um padrão diplóide. Os clones foram batizados com um nome que é formado pela sigla *Pli* (*P. lineatus*) seguida pelo número do clone onde sua seqüência foi determinada. Os *loci* caracterizados neste trabalho foram: Pli30, Pli34, Pli43, Pli60 e Pli61. A Tabela 1.2 mostra as condições ideais de PCR para a amplificação desses cinco novos *loci* de microssatélites. A Figura 1.17 mostra exemplos de testes de temperaturas de anelamento e a

Tabela 1.3, que apresenta as seqüências de iniciadores desenhadas para cada locus, também mostra o intervalo de tamanhos de fragmentos amplificados, o tema do microssatélite e a percentagem de sucesso de amplificações (nº de indivíduos positivamente tipados/95 x 100).



**Figura 1.17:** Dois exemplos de teste parcial de temperatura de anelamento. Cada par de canaletas correspondem a dois indivíduos distintos (1 e 2), repetidos através do gradiente: A) Pli30 e B) Pli60. As setas indicam a região de 125 pb nos padrões de 25 pb.

**Tabela 1.2:** Condições para realização de PCR e gel de poliacrilamida para os cinco loci caracterizados. Quantidade de *Taq* (unidades por reação) e quantidade de cada um dos iniciadores de cada par, temperatura de anelamento e concentração ideal de gel de poliacrilamida.

Locus	<i>Taq</i> (U)	Iniciador (pmols)	Temp.	Concentração do gel de poliacrilamid a
Pli30	0,5	5	66 °C	6%
Pli34	0,5	5	56° C	8%
Pli43	0,25	5	60° C	8%
Pli60	0,5	10	69 °C	8%
Pli61	0,5	5	69 °C	8%

**Tabela 1.3:** Seqüência dos iniciadores, composição do tema, percentagem de indivíduos positivamente amplificados (N=95) e intervalo de tamanhos de fragmentos para os cinco loci caracterizados

Locus	Seqüência (5'-3)'	Tema	Sucesso de amplific ação (%)	Tamanho de fragment os (pb)
Pli30	GATGTCGGTTCTTGTACAGTGGTG AGCTGCTGAGGATTCTGGGTCAC	(GTCT) <sub>n</sub> 116 pb	92,6	162-360
Pli34	TGTTGGATGTA AAAAGTGC GCTCGCTGGCATGTTAAGATGG	(ATTG) <sub>4,75</sub>	89,5	188-214
Pli43	AGTCCACTCCTTAGGCGAGTGAG ATAGACGGGCATGTGTCACAGCT	(GT) <sub>13</sub>	96,9	186-240
Pli60	GCTAGGACGGTTAGCGTCCACTG CGACACGTACATCATTACCTCGG	(GA) <sub>13</sub>	88,4	130-228
Pli61	ACCAAGGTGGGATTCCTTGGTC TTCTCCATCTCTGGCTGCGCA	(GA) <sub>8</sub> AA(GA) <sub>4</sub>	85,2	210-230

Parte das seqüências desses cinco loci são apresentados a seguir. Em destaque estão, respectivamente, a região de anelamento do iniciador direto (em cinza claro), o microsatélite propriamente dito e a região de anelamento do iniciador reverso (em cinza escuro):

>Pli30 (identificador da biblioteca: clone 2F34)

ACGTGGGAACGGTTCCTGAGAGGAAAGATGTCGGTTCCTTGTACAGTGGTGCCTTAAGA  
ACTTCTCGGAACACTAATGTGGTCC**GTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTACCTGTCTGTCTGTCT**  
**GTCTGTCCGTCTGTC**CACCT**GTCTGTCTGTCTGTGCACCTGTCTACCTGTCCGTCTGTCTGT**  
**CCACCTGTCTGTCT**GATGTTATGTAGACGAGCCAGATTTTTATATGTGCCACTTTGGAATC  
CTGTACCCGGGTGAATTTGGACCCGACTGATACCAGCCCCTATTCATT**GTGACCCAGAATC**  
**CTCAGCAGCT**AGTTCTGATATCAGGTGTGTTTCAGCATCGTCTGCGTCTCCTCTCCATCCAG  
GTCACCCC

>Pli34 (identificador da biblioteca: clone 1B11)

AGATGTTGGATCGTAAAAAGTGCAT**GTGGATGTAAAAAGTGCTAAACAAATAAATATTGAT**  
**TGATTGATTGATT**TCAGTCCTGACGCATCCTCTCTTGTCTCTCCATCCCGTCCACTGTCCt  
gtgTCCAAAGCTTTGGGGACGTTTTTGGGGACGAGAGCTACACACTGGCCTCATAAACAGTA  
GCTCTT**CCATCTTAACATGCCAGCGAGC**TATTATTTACTTATTATTATTACTTATTATTAC  
CATTGTTATTATTATTTAATTA

>Pli43 (identificador da biblioteca: clone 1G16)

AATCAAAATAGTTTGAATCAGAAAGGT**CAGTCCACTCCTTAGGCGAGTGAGAGACCGTGTG**  
**TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT**CTGAAGGCCCTGTAATAAAGCTGTAGGTCAGACTCAGTGT  
GATTCCTCTCCAGGCCCTTACGGGGGAGACAAGGCAGGGGGGCGGGTGTGCGCCCC  
AAATCTGCACCCGCTTCACTCCC**AGCTGTGACACATGCCCGTCTATG**TGTCCAGGCCTCGT  
AATATCTCACTAAACATTTAATATG

>Pli60 (identificador da biblioteca: clone 1Z24)

ACCTGGAGTCAGGGGGCCGACTCCCAGTGCTGAAGACATGGCGTTTTCTGCTGTTTCTCC  
TAGGACAGCTATCTTGCT**GCTAGGACGGTTAGCGTCCACTGAAGGGTCAGTCGGATGTAG**  
TGTGTTTCATCCTTACTCCAAATGATATGGGACATGCACTGTAATTC**TCTCTCTCTCTCTCTC**  
**TCTCTCTCTTTCCCTCCCTCTCTCTC**AGCGAGGCGTGGCACAGCCTCCATTGTT**CCGAGG**  
**TAATGATGTACGTGTGCGATCATCGGGCTGC**

> Pli61 (identificador da biblioteca: clone 2A18)

TCACTGGTAAGTTTAGTTGGAGGATTACCACCAGGTTTCTCTAACTGGAGAAGACTTTT  
AGCAGCTTGTGTTGTAATCC**ACCAAGTGGGATTCCTTGGTCTT**GTTAAGTGATGGATGGG  
CTTGGCATAATGTAGTGGGTGATGTTAGGCACTGAAGGAATGAGTGAGGGAAAG**GAGAGAG**  
**AGAGAGAGAAGAGAGAGA**GGTGTGTCAGCTGATGAATGAAGCACTCACAAGCTTTAAAG  
CGCCTGGCTCTTGCTCATTAAACACGGTTTGA**TGCGCAGCCAGAGATGGAGAA**GACAGTT  
TCTGTTTCATTCTCCA

Pli30 é um microsatélite de seqüência complexa de mais de 20 repetições do tetranucleotídeo GTCT, com algumas interrupções. O produto de amplificação do clone com os primers desenhados gera um produto amplificado de 292 pb. Este microsatélite foi encontrado no clone de código 2F34 da biblioteca genômica.

Pli34 também é da classe dos tetranucleotídeos, de tema ATTG, formado por 4,75 repetições (*i.e.* quatro blocos do tetranucleotídeo, mais as três primeiras bases da seqüência repetitiva). O produto de PCR do clone Pli34 com os iniciadores deste trabalho é de 192 pb. O clone original na biblioteca com esse locus foi o de código 1B11.

Pli43 é formado por um dinucleotídeo perfeito de 13 repetições do tema TC. O amplicon desse clone com os iniciadores desenhados aqui geram produtos de 201 pb. Essa seqüência foi isolada no clone 1G16.

Pli60 é um dinucleotídeo imperfeito com dois blocos de TC (13 e 4 pb) interrompidos pela seqüência TTTCCCTCCC. O produto amplificado com os iniciadores aqui desenvolvidos tem 183 pb e o clone original com esse locus é o 1Z24.

Finalmente, Pli61 também continha uma repetição de dinucleotídeos de dois blocos de repetições GA (8 e 4 repetições) interrompidas por AA, com produto de PCR de 219 pb com os primers desenhados nesse trabalho. O clone da biblioteca com esse marcador é o de código 2A18.

### **1.5.5 – Análises populacionais.**

Com o intuito de verificar a aplicação populacional dos cinco loci caracterizados foi analisada uma amostra de indivíduos de *P. lieatus* coletados imediatamente a jusante da AHE do Funil em dezembro de 2005. Foi extraído o DNA de 95 indivíduos para as análises populacionais, que foi submetido à PCR, uma vez alcançada as condições ideais para amplificação de cada locus.

Em cada *locus*, os tamanhos das bandas amplificadas foi determinado com a ajuda do programa (LabImage), com o auxílio de padrão de tamanho de DNA de 25 pb, sistematicamente colocados nos dois extremos e no centro do gel. Os tamanhos estimados de fragmentos foram então utilizados para se determinar classes alélicas (*bins*), através do algoritmo proposto em Amos *et al.*, (2007). Os loci tiveram uma média de 12 alelos observados ( $\pm 8,03$  dp), com um mínimo de 3 e um máximo de 21 alelos/*locus*. As heterozigosidades esperadas ( $H_e$ ) variaram de 0,91 para Pli30 e 0,58 para Pli61. As tabelas de freqüências alélicas para os cinco marcadores estão apresentadas no Apêndice B.

Os marcadores foram testado para EHW através de um teste exato utilizado-se o método de Monte Carlo com Cadeias de Markov (Guo e Thompson, 1992). A Tabela 1.4 apresenta esses resultados. Dos cinco *loci* apenas dois (Pli43 e Pli61), estavam consistentemente em EHW ( $p > 0,05$ ). Se for aplicada uma correção de Bonferroni para o nível de significância ( $\alpha$ /número de *loci*), os *loci* Pli30 e Pli34 também seriam considerados como estando em EHW ( $p > 0,01$ ). Para esse trabalho, porém, foi adotado o valor limite de  $\alpha = 0,05$ . O *locus* Pli60 desviou significativamente do EHW ( $p = 0,0001$ ). Tanto Pli30 quanto Pli60 exibiram déficit de heterozigotos ( $p = 0,0001$ ). Estes também foram os dois marcadores que exibiram os maiores valores de F na amostra (0,11 e 0,36 respectivamente).

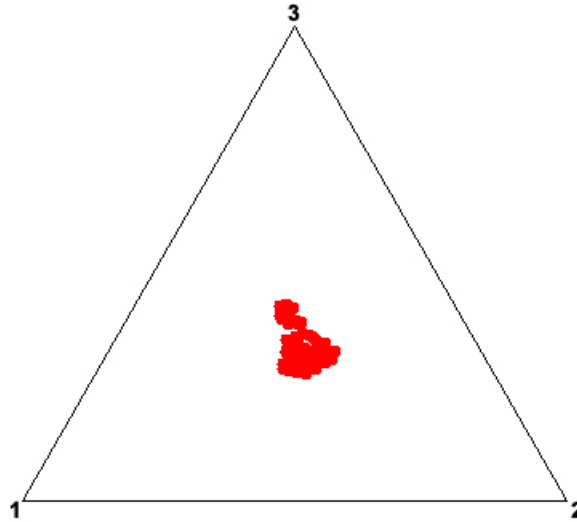
Os *loci* Pli43 e Pli 61 apresentaram valores de F negativos, que sugerem um excesso de heterozigotos. Esses não são, no entanto, valores estatisticamente significativos (teste de excesso de heterozigotos;  $p > 0,05$ ) e devem ser considerados iguais a zero. A Tabela 1.4 mostra as estimativas de heterozigosidade esperada e observada ( $H_e$  e  $H_o$ , respectivamente), os resultados dos testes de EHW, tamanhos amostrais, os valores de F e os números de alelos (observados e estimados por *jackknife*) para cada *locus* (Tabela 1.4). Considerando-se todos os *loci* em conjunto, a heterozigosidade média esperada foi de 0,78 e a heterozigosidade média observada foi de 0,70. No teste global com todos os *loci*, a população desvia significativamente do EHW ( $p = 0,0001$ ).

**Tabela 1.4:** *Loci* de microssatélites de *P. lineatus*: Heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ), valores exatos de probabilidade (p), EHW, coeficiente de endogamia (F), tamanho amostral (N), número de alelos ( $N_A$ ) observados (Obs) e re-estimados por *jackknife* (JK):

Locus	$H_e$	$H_o$	p	EHW	F	N	$N_A$ Obs	$N_A$ JK
Pli30	0.91	0.81	0.012	Não	0.11	88	21	2 6
Pli34	0.61	0.60	0.024	Não	0.03	85	4	4
Pli43	0.90	0.91	0.50	Sim	- 0.00 8	92	16	1 7
Pli60	0.89	0.57	0.0001	Não	0.36	84	16	1 9
Pli61	0.58	0.61	0.76	Sim	- 0.05	81	3	3

Para se avaliar a presença de subestruturação dentro da amostra dos 95 indivíduos foi empregada a técnica de agrupamento (*clustering*) de genótipos através do método apresentado por Pritchard *et al.* (2000). Um exemplo de saída gráfica da análise está apresentada na Figura

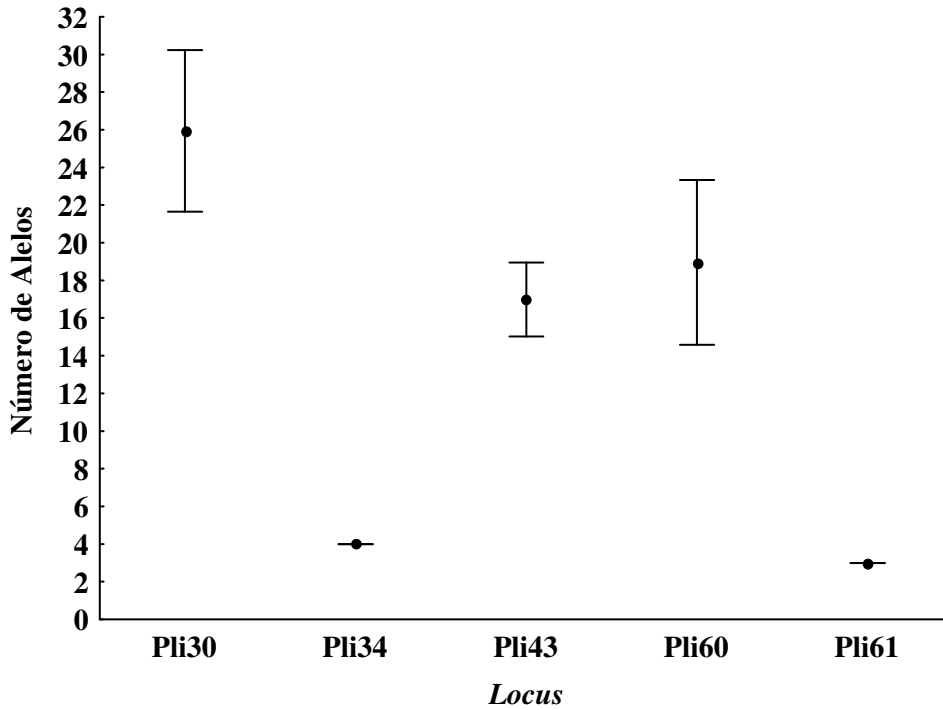
1.18, assumindo  $k=3$  (três *clusters*). Esse procedimento não sugeriu a existência de subestruturação na amostra.



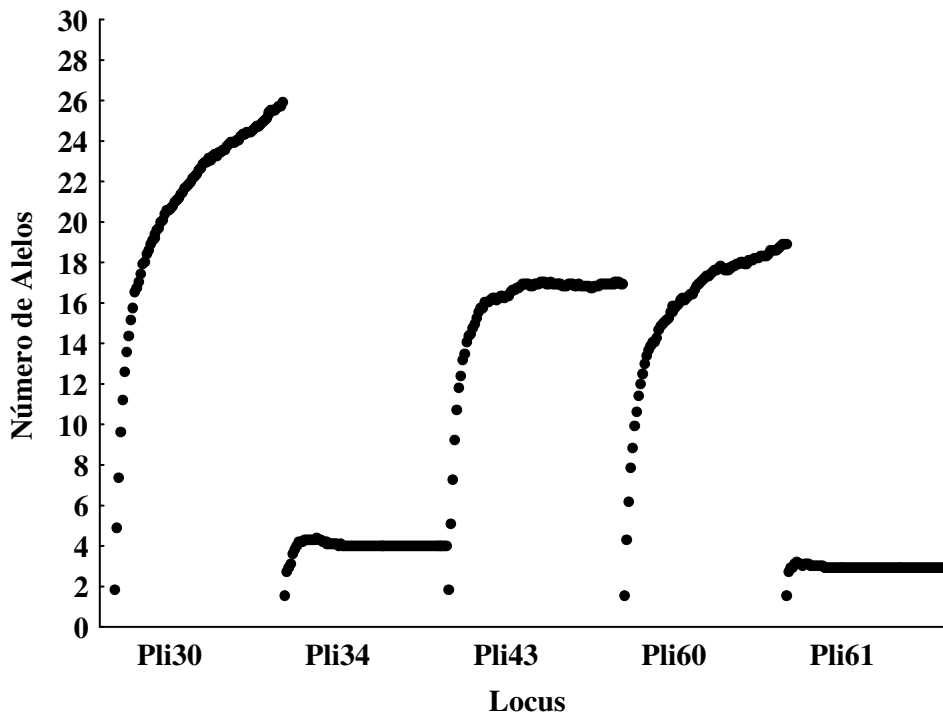
**Figura 1.18.** Diagrama de agrupamento dos genótipos da amostra de *P. lineatus* do Funil. A análise pressupõe a separação da amostra em três agrupamentos (vértices 1, 2 e 3), mas sugere a ausência de estrutura. Os pontos grupados representam os indivíduos da amostra.

Com o intuito de avaliar possíveis efeitos de amostragem e viés estatístico em nossas amostras, foi aplicado um procedimento de reamostragem *jackknife* sobre o número de alelos (riqueza alélica, a partir de agora chamados simplesmente riqueza e riqueza *jackknife*). Nos três loci mais polimórficos, Pli30, Pli43 e Pli60, a riqueza *jackknife* resultou em números de alelos superiores aos observados *de facto*. De acordo com essas estimativas, Pli30 apresentaria 26 alelos (contra 21 observados), Pli43 teria um alelo a mais não amostrado e Pli60 teria 19 alelos, três a mais do que o observado (Tabela 1.4).

Uma comparação estatística entre a riqueza alélica *jackknife* dos cinco loci caracterizados é apresentada na Figura 1.19. Nessa figura, as barras de dispersão representam intervalos de confiança a 95% de probabilidade. Quando, em um par de loci, a estimativa de riqueza *jackknife* e o limite de confiança sobrepõe-se, não existe diferença entre o número de alelos entre os dois loci (*e.g.* Pli43 e Pli60).



**Figura 1.19:** Riqueza alélica em cada locus segundo o estimador *jackknife*. As barras verticais representam limites de confiança à 95% de probabilidade.



**Figura 1.20:** Curvas de acumulação amostral para cada um dos cinco loci. Os pontos pretos representam estimativas *jackknife* da riqueza alélica com diferentes tamanhos amostrais.



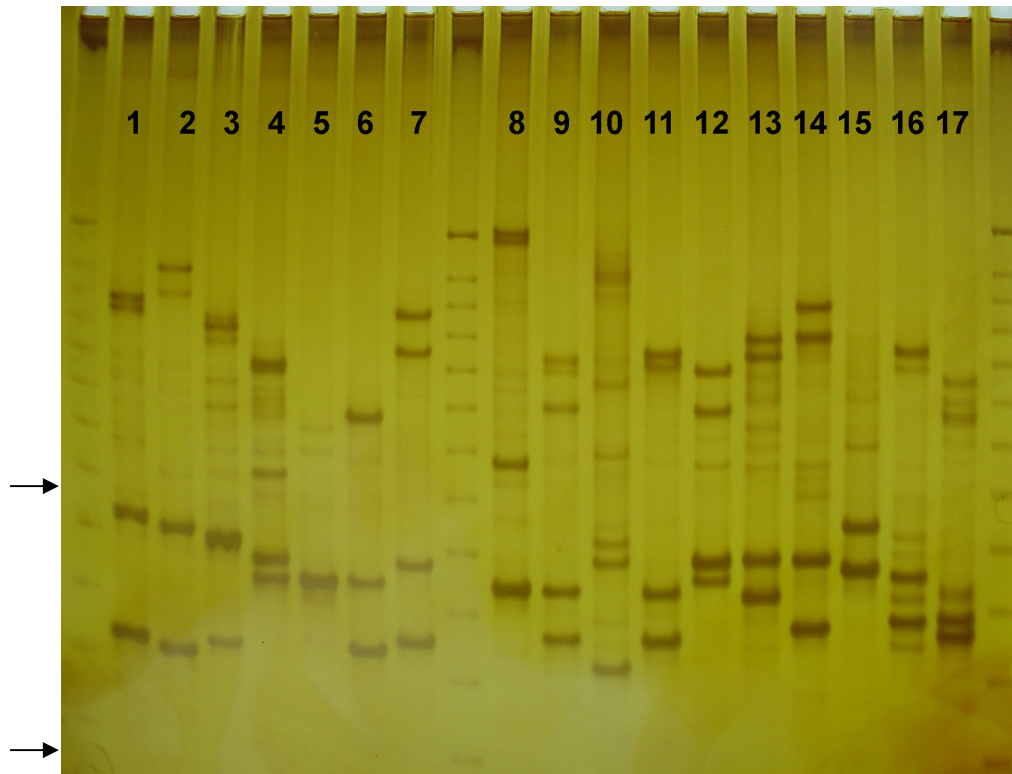
Foi feita uma curva de acúmulo das estimativas *jackknife* do número de alelos em função do tamanho amostral, de forma que cada marcador foi avaliado para o número de alelos a medida que se incrementava a amostra em um indivíduo, até o tamanho amostral de fato analisado. A ordem de amostragem dos indivíduos foi aleatória. O resultado dessa análise pode ser visto na Figura 1.20. A forma da curva fornece uma idéia do comportamento das estimativas em função do tamanho amostral.

Finalmente, foi avaliada a associação não aleatória de alelos em diferentes loci através da realização de testes de desequilíbrio de ligação. Todos os pares possíveis de *loci* aparentemente segregam-se de forma independente, indicando que provavelmente todos *loci* pertencem a grupos de ligação distintos (veja Tabela 1.5 para sumário das estatísticas).

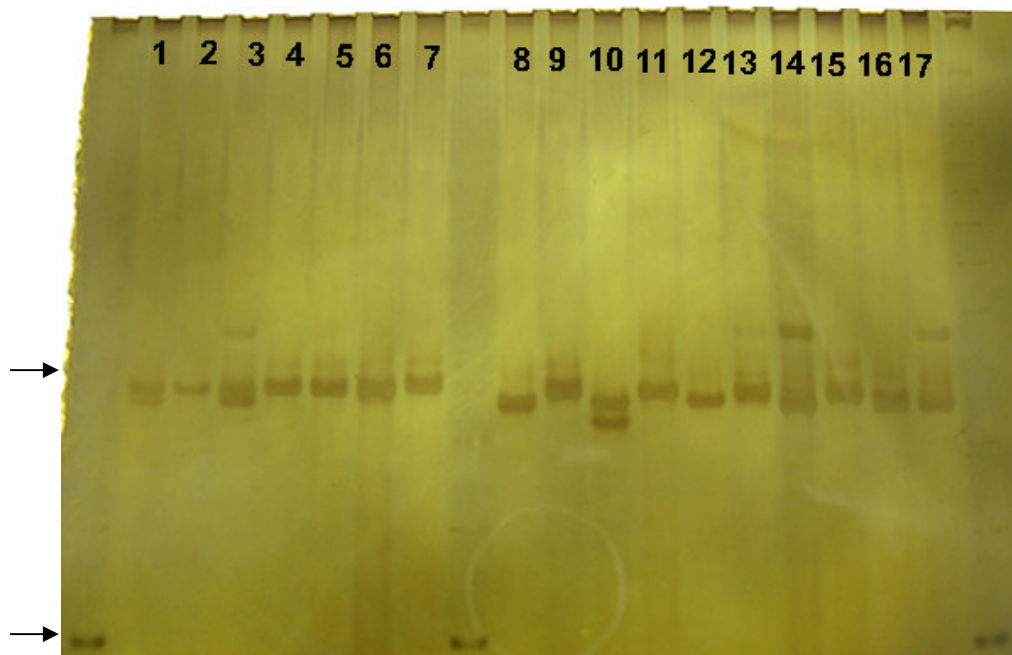
**Tabela 1.5:** Resultado do teste de desequilíbrio de ligação para cada par de *loci*. GL = Graus de Liberdade.

Par de loci	$\chi^2$	GL	p
Pli30 e Pli34	4.13	2	0.16
Pli30 e Pli43	0.24	2	0.12
Pli34 e Pli43	2.65	2	0.88
Pli30 e Pli60	0.63	2	0.26
Pli34 e Pli60	0.39	2	0.72
Pli43 e Pli60	1.84	2	0.82
Pli30 e Pli61	0.73	2	0.39
Pli34 e Pli61	0.10	2	0.69
Pli43 e Pli61	2.31	2	0.94
Pli60 e Pli61	4.13	2	0.31

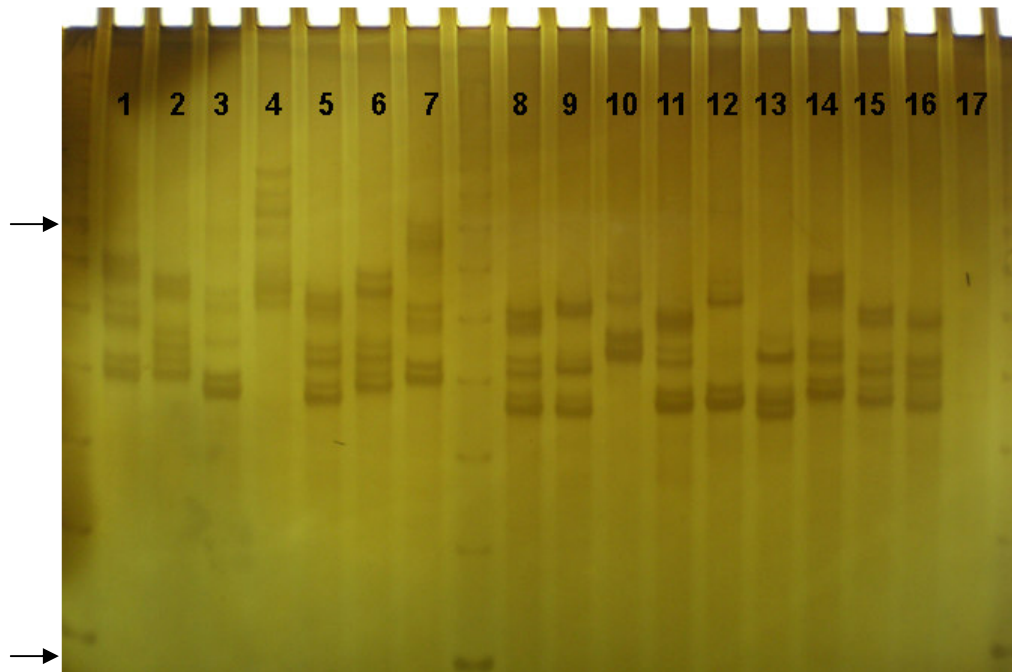
As Figuras 1.21 até 1.25 mostram exemplos de perfis de amplificação de indivíduos da amostra da AHE do Funil, resolvidos em géis de poliacrilamida, para os cinco marcadores aplicados na análise populacional.



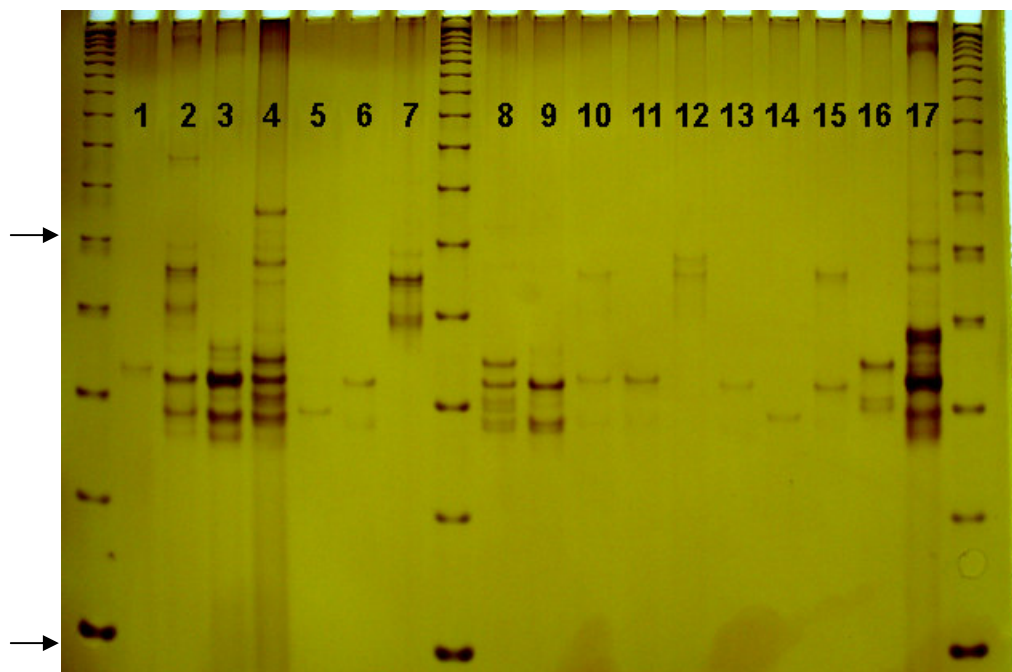
**Figura 1.21:** Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli30 (canaletas 1 a 17). As canaleta não assinaladas contêm uma escada alélica de 25 pb cada. As setas compreendem a região entre 200 e 300 pb.



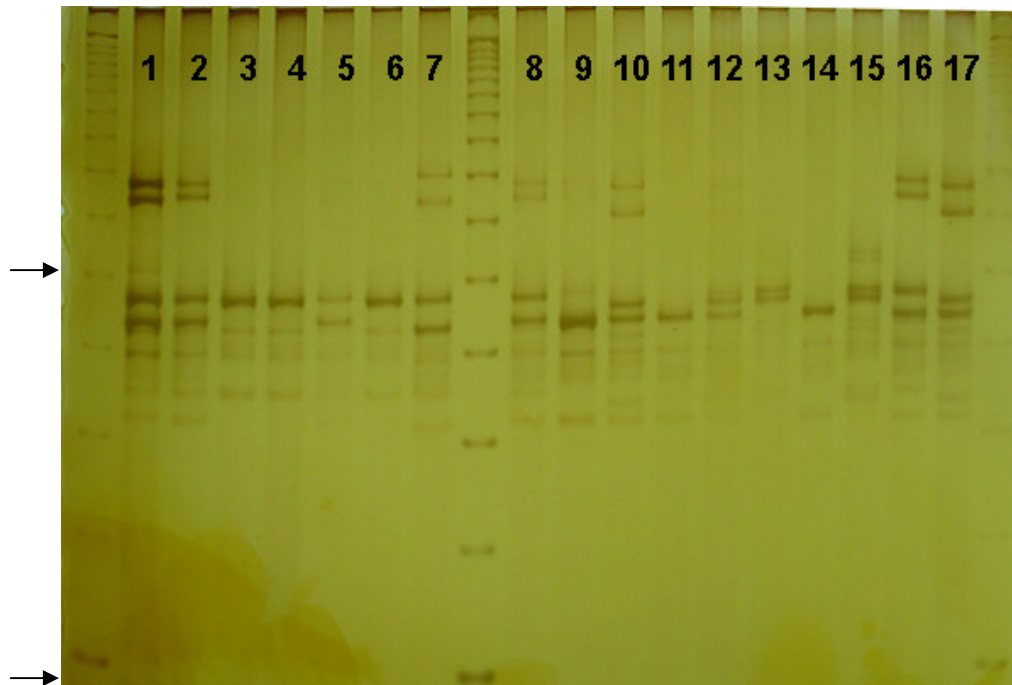
**Figura 1.22:** Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli34 (canaletas 1 a 17). As canaleta não assinaladas contêm uma escada alélica de 25 pb cada. As setas compreendem a região entre 125 e 200 pb.



**Figura 1.23:** Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli43 (canaletas 1 a 17). As canaleta não assinaladas contêm uma escada alélica de 25 pb cada. As setas compreendem a região entre 125 e 275 pb.



**Figura 1.24:** Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli60 (canaletas 1 a 17). As canaleta não assinaladas contêm uma escada alélica de 25 pb. As setas compreendem a região entre 125 e 225 pb.



**Figura 1.25:** Exemplo de perfil de amplificação populacional com o locus Pli61 (canaletas 1 a 17). As canaletas não assinaladas contêm uma escada alélica de 25 pb cada. As setas compreendem a região entre 125 e 225 pb.

## 1.6 – Discussão

### 1.6.1 – Microssatélites.

A partir dos anos 90, os marcadores moleculares de microssatélites passaram a ocupar um lugar de destaque nas análises populacionais e nas Ciências Biológicas de forma geral (Jarne e Lagoda, 1996), inclusive em mapeamentos genéticos, reconstrução filogenética, identificação individual e verificação de paternidade (Schlötterer, 2004). Mais recentemente, o emprego de marcadores moleculares tem sido uma importante ferramenta no desenvolvimento da Biologia da Conservação e no gerenciamento de recursos naturais (Amos e Balmford, 2001; Hedrick, 2001; Frankham *et al.*, 2002). Como destaque de característica que torna esse marcador adequado para a análise genético-populacional está sua alta quantidade de polimorfismos de tamanhos de alelos encontrada através dos *loci* (Schlötterer, 2000; Zane *et al.*, 2002). A maior parte desses *loci* situam-se em regiões eucromáticas não-codificantes do genoma, como regiões intergênicas e regiões intrônicas (Ellegren, 2004, Schlötterer, 2004).

O alto polimorfismo característico desses marcadores implica em altas taxas de mutação subjacentes. Como se considera que esses marcadores sejam em média seletivamente neutros

(Ellegren, 2004), as taxas de evolução dessas seqüências são determinadas exclusivamente pela mutação. O que se sabe de fato é que os processos guiando as expansões e contrações de repetições, bem como as taxas com a qual isso ocorre, variam de forma ampla dependendo de: grupo taxonômico, localização do microssatélite dentro do genoma, do tipo de seqüência do microssatélite, mecanismos de reparo de mutação no organismo, tamanho da seqüência, tamanho do genoma entre outros fatores (Ellegren, 2004).

A natureza da evolução dos microssatélites é tema de intenso debate e tem atraído a atenção de diversos grupos que adotam diferentes abordagens para o seu estudo: experimental (*e.g.* Levinson e Gutman 1987), empírica (*e.g.* Weber e Wong, 1993) e teórica (Shiver *et al.*, 1993; Veytsman e Akhmedeyeva, 2006; Freitas, 2007). O modelo de mutação “passo-a-passo” (*Stepwise Mutation Model* - SMM), originalmente postulado para mutação de eletromorfos isoenzimáticos (Ohta e Kimura, 1973), tem sido preferencialmente aplicado para microssatélites, assim como vários modelos desenvolvidos a partir do SMM. Nesse caso o modelo pressupõe a adição ou supressão de uma única repetição da seqüência repetitiva, por evento de mutação. Porém, logo nos primeiros estudos de observação direta de mutações em linhagens familiares, ficou demonstrado que, além de ocorrerem de fato mutações dessa natureza, também ocorriam mutações envolvendo de duas a cinco repetições (Schlötterer e Tautz, 1992; Weber e Wong 1993). Modelos mais recentes têm postulado um equilíbrio entre expansões de repetições e mutações de ponto dentro e próximos ao microssatélite, que agiriam como um fator que limitaria o crescimento indefinido dos microssatélites a medida que imperfeições são inseridas na seqüência repetitiva (Kruglyak *et al.*, 1998; Calabrese *et al.*, 2001; Santibáñez-Koref *et al.* 2001).

A natureza complexa da evolução desses marcadores requer cautela ao inferir-se sobre a determinação de tempo absoluto de divergência evolutiva entre populações ou espécies próximas baseando-se simplesmente em medidas de distância genética obtidas por marcadores microssatélites (Ellegren, 2004). O efeito de alta variância entre *loci* pode ser contornado com o incremento do número de *loci* analisados e, idealmente, dependendo do tipo de inferência pretendido, estudos populacionais com microssatélites devem ser realizados “calibrados” com estudos meticolosos do comportamento mutacional dos marcadores empregados, com subsequente seleção daqueles mais apropriados. Isso pode ser feito através do estudo e comparação de microssatélites ortólogos de espécies próximas (Ellegren, 2004). A limitação do clássico modelo de alelos infinitos (MAI - altamente apropriado para a maior parte da variação de genes DNA de seqüência única) na evolução de seqüências repetitivas é que alelos com um mesmo número de repetições podem ser idênticos por descendência (diretamente oriundos de um mesmo ancestral comum recente) ou idênticos por estado (mutações homoplásicas que

levam alelos de origem distintas a exibirem o mesmo número de repetições). Nas análises realizadas nesse trabalho foram desconsideradas as relações de distância esperadas entre diferentes alelos pelo modelo passo-a-passo e consideradas apenas a identidade de cada alelo.

## 1.6.2 - Biologia molecular

### 1.6.2.1 – Biblioteca genômica

Esse trabalho produziu uma biblioteca genômica primária de *P. Lineatus* com uma coleção de mais de 10.000 clones de fragmentos acima de 400 pb. No entanto, desse total, apenas 1320 foram armazenados e triados de forma individual (um clone/*spot*). Os demais clones foram coletados de forma a criar-se um *pool* de dois ou três clones armazenados por tubo (1.590 e 7.819 armazenados em 795 e 2.606 tubos respectivamente), para facilitar o processo de aplicação de todos os clones nas membranas de *nylon* utilizadas na triagem radioativa e minimizar a quantidade de material manipulado no sistema de hibridização. Esse procedimento proporcionou uma redução de cerca de 44% nas *preps* e reduziu o número de membranas submetidas à hibridização (de cerca de 10 para seis).

A desvantagem desse procedimento é que há a necessidade de promover novas transformações de células competentes com o *pool* de plasmídeos de cada tubo com mais de um clone por tubo. Assim, é necessário coletar-se mais do que uma única colônia (de duas a oito) para promover a extração de plasmídeos e determinar em qual desses exatamente está o potencial *locus* de microssatélite. Os benefícios de ganho de tempo e redução de riscos de segurança (radiação, geração de rejeito, etc.) parecem compensar desvantagem de realizar-se transformações complementares posteriormente. *Spots* com mais de um clone, que mostraram sinal positivo são encarados como contendo apenas um clone positivo no *pool*.

No cálculo de sinais positivos por classe de tubo/*spot* ( $n^\circ$  de sinais positivos/ $n^\circ$  de clones triados) podemos observar uma aparente queda da frequência de sinais positivos com o aumento de clones por tubo, pelo menos sensivelmente na coleção de três clones/tubo (Tabela 1). Uma possibilidade é a de que, em pelo menos uma fração desses tubos, haja competição no crescimento dos diferentes clones coletados no mesmo tubo contendo meio líquido (2XYT), após a transformação de células competentes, favorecendo apenas uma linhagem em detrimento das demais, eventualmente mascarando a presença de clones positivos. Essa suspeita poderá ser confirmada (ou refutada) quando a coleção três clones/tubo for finalmente seqüenciada no laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares. Os *pools* de três clones por tubo já foram submetidos a transformação e extração de plasmídeos no laboratório.

A biblioteca gerada nesse trabalho poderá ser triada para qualquer outro gene ou tipo de marcador de interesse. Sua natureza não-enriquecida nos assegura que os fragmentos nela presentes devem ser uma amostra bem aleatorizada do genoma de *P. lineatus*. A quantidade de clones coletados e a amplitude de tamanhos de fragmentos clonados indicam que essa biblioteca deve ser razoavelmente representativa. Foram amostrados até fragmentos de tamanho superior a 2000 pb (*e.g.* Figura 12). Nenhuma seqüência de DNA esteve presente em mais do que um único clone.

No total a porcentagem de clones positivos observados nesse trabalho (5,9%) foi maior do que a relatada por Zane *et al.*(2000), para peixes, utilizando-se métodos semelhantes de isolamento para microssatélites. Devemos diferenciar que, no entanto, a estimativa apresentada por Zane *et al.* (2000) é a de sinais positivos com a presença de microssatélites. Aqui relatamos o valor de clones positivos como um todo (visto que alguns clones positivos tem outros tipos de seqüências repetitivas ou são simplesmente falsos positivos). Um dos motivos que parece ter contribuído para o sucesso da triagem, com a descoberta de vários tipos diferentes de microssatélites e seqüências repetitivas maiores é que, durante a triagem radioativa, foram utilizadas várias sondas de diferentes temas de microssatélites. Essa estratégia é essencial em organismos pouco caracterizados genomicamente, visto a existência de grande variação da abundância de tipos distintos de temas entre grupos taxonômicos (Zane *et al.*, 2000).

#### **1.6.2.2 – Seqüenciamento**

Dos 67 clones positivos submetidos ao seqüenciamento nesse trabalho, 46 continham seqüências repetitivas, ainda que algumas curtas demais para serem boas candidatas, uma vez que, até certo ponto, associa-se o tamanho do microssatélite diretamente ao seu grau de polimorfismo (*e.g.* Primmer *et al.*, 1996). Além das seqüências utilizadas neste trabalho, foram observados um minissatélite de tema de 12 pb de comprimento repetido quatro vezes, um pentanucleotídeo, um hexanucleotídeo e um octanucleotídeo (*e.g.* Figura 14). Foram também observadas seqüências compostas (*e.g.* dinucleotídeos com tetranucleotídeos intercalados).

Dentre as seqüências com microssatélites de corpo maior que 16 pb, a maior parte dos temas (24) observados foram de dinucleotídeos de seqüência (AG/CT e AC/GT), seguido de seis tetranucleotídeos (CACG, ATTG, TCAC, GATG e dois CTGT) e quatro trinucleotídeos (TCC, AAC e dois ATA). Essa proporção está de acordo com relatado na extensa revisão sobre evolução de microssatélites de Hans Ellegren (2004), com dinucleotídeos e tetranucleotídeos sendo as classes mais abundantes. Trinucleotídeos costumam ser mais freqüentes em regiões codificadoras do que as outras classes de microssatélites, em função da compatibilidade de

inserções que não alteram as matrizes de leituras (ORFs) na expressão gênica. Suas expansões, porém, costumam estar associadas, ao surgimento de doenças em seres humanos, como por exemplo, doença de Huntington, síndrome to X frágil, ataxia espinocerebral, distrofia muscular, entre outras (Armour, 2006; Veytsman e Akhmadeyeva, 2006; Tomiuk *et al.*, 2007).

### 1.6.2.3 – Construção e testes de iniciadores para PCR

Vinte e três seqüências de clones com microssatélites foram analisadas para a confecção de iniciadores. Desses, 15 (Apêndice A) foram submetidos a uma bateria de testes de padronização que envolveu a determinação da temperatura ótima de anelamento e as concentrações ótimas de *Taq* Polimerase, de iniciadores, além de condições eletroforéticas. Os iniciadores foram desenhados com auxílio do programa FastPCR e foram preferidas seqüências com o percentual mais próximo possível de 60% de conteúdo C/G. Os iniciadores tiveram entre 20 e 24 pares de base.

Cinco iniciadores geraram padrões considerados satisfatórios para a análise populacional: possuíam polimorfismos de tamanho, padrão diplóide (codominante) de amplificação e tamanho de alelos adequados para tipagem em gel de poliacrilamida. Amplicons maiores que 300 pb, oriundos de diferentes alelos de microssatélites, torna-se de difícil separação em gel de eletroforése e portanto, pouco adequados para detecção de polimorfismos (principalmente na classe dos dinucleotídeos).

Os cinco *loci* foram chamados Pli30, Pli34, Pli43, Pli60 e Pli61, segundo o número dos clones no seqüenciamento. O tamanho relativamente grande dos iniciadores deve explicar em parte as altas temperaturas de anelamento encontradas nos ensaios de PCR (até 69 °C). Todos os *loci* testados apresentaram melhores resultados (menor número de inespecificidades) com o uso de uma menor concentração de *Taq* (de 0,5-0,25 U). Para alguns *loci* o decréscimo da concentração de iniciadores (de 10 para 5 pmols de cada iniciador) também resultou em melhores padrões para tipagem (Tabela 2). Os outros *loci* testados (Apêndice A) resultaram em marcadores monomórficos ou de padrão muito complexo para distinção de alelos verdadeiros. Esses *loci* não utilizados aqui podem ser testados em outras espécies de *Prochilodus* para verificação de amplificações heterólogas (*e.g.* Primmer *et al.*, 1996).

Considerando os cinco loci caracterizados aqui, os fragmentos amplificados variaram de 130-360 pb. O sucesso de amplificação foi considerado satisfatório com no mínimo 85% das amostras genotipadas (total de 95 indivíduos – Tabela 3). A variação no número de indivíduos positivamente amplificados pode ser reflexo do método de extração de DNA para análises populacionais (chelex). Devido à sua natureza prática, a quantidade de DNA pode sofrer



variação entre indivíduos em uma extração e a quantidade de material gerada por esse método não é passível de quantificação em gel de agarose, servindo apenas para amplificação.

Dos marcadores caracterizados aqui, dois foram tetranucleotídeos (CTGT e ATTG) e três dinucleotídeos (GT e dois GA). Os cinco *loci* apresentaram padrões bem claros de amplificação. O marcador Pli43, no entanto, apresentou uma grande incidência de bandas sombra (*stutter bands*), que podem potencialmente confundir no processo de tipagem. Para minimizar esse efeito é recomendado reduzir a quantidade de produto de PCR para corrida em gel de poliacrilamida (de 10 para  $\mu$ L para 5  $\mu$ L). Esse processo de geração de bandas-sobra ocorre pelo mecanismo de deslizamento da *Taq* durante a amplificação *in vitro* (Ellegren, 2004). Outro fenômeno que ocasiona bandas inespecíficas (geralmente de tamanhos maiores do que os alelos *de facto*) é a formação de bandas heteroduplex: fitas únicas de DNA de alelos de diferentes tamanhos se anelam de forma trocada e geram fitas duplas híbridas que possuem um comportamento de migração eletroforética distinto dos alelos reais (Kaur e Makrigiorgos, 2003).

#### 1.6.2.4 – PCRs e análises populacionais

Uma amostra de 95 peixes coletados imediatamente a jusante da barragem da AHE do Funil foi submetida à amplificação dos cinco *loci* aqui determinados. As bandas geradas por cada um dos marcadores nas amplificações foram tipadas por tamanho em pares de base, com auxílio de um padrão de 25 pb no programa LabImage. Em cada *loci* foram construídas classes alélicas para os tamanhos de fragmentos através do algoritmo de Amos *et al.*, (2007) para binagem automatizada. Os resultados foram comparados com binagem manual e pareceram muito satisfatórios.

A designação correta de fragmentos amplificados em classes alélicas é crítica para uma estimativa fidedigna das freqüências alélicas. O erro nesse procedimento pode ocasionar problemas consideráveis por exemplo, na identificação individual e de paternidade (levando à falsa exclusão de paternidade) e nos cálculos de distância e estrutura genética interpopulacional, distorcendo parâmetros como a heterozigiosidade (Amos *et al.*, 2007). O problema por trás da transposição linear de um valor de tamanho de pares de base a valores de números de repetição é que vários fatores influenciam na mobilidade eletroforética do amplicon: o tamanho e a seqüência do fragmento (Rosenblum *et al.*, 1997; Wenz *et al.*, 1998), mas também mutações e conteúdo GC nas seqüências flanqueadoras, a ocorrência de mutações de número de repetições que não seguem a lógica de adições ou supressões de blocos inteiros do tema, além de fatores estocásticos como, por exemplo, variações na velocidade, temperatura matriz do gel

de eletroforése (Amos et al. 2007). De acordo com o método de binagem empregado, o número de alelos por *locus* variou entre três e 21.

Apenas dois dos cinco *loci* analisados, Pli43 e Pli61, foram considerados em EHW ( $p > 0,05$ ). A conformidade com o esperado pelo EHW é uma evidência de que esses marcadores se comportam de forma mendeliana. O teste global de EHW para o conjunto dos cinco *loci* indica um desvio significativo ( $p = 0,0001$ ). Porém, excluindo-se o *locus* Pli60 (maior significância de  $p$  e maior valor de coeficiente de endogamia), o teste global passa a ser significativo ao nível de 1% de probabilidade (resultados não mostrados). Isso indica que esse *locus* é o que mais influencia no desvio do EHW observado na amostra. A distinção de múltiplas causas na determinação de parâmetros genéticos constitui um desafio que deve ser dissecado com precaução (Hedrick, 2000a).

O *locus* Pli34 seria considerado em EHW com  $\alpha = 0,01$  e Pli30 seria significativo a esse nível de probabilidade. Pli30 apresentou déficit de heterozigotos, no entanto, assim como Pli60, sendo seus valores de  $F$  0,11 e 0,36, respectivamente. Esses valores são considerados altos. Pampoulie *et al.*, (2006) analisando oito *loci* de microssatélites, mais o *locus* *Pan I* e encontrou valores de  $F$  de até 0,30 em estoques de pisciculturas em bacalhau (*Gadus Morhua*). Já espécies de água doce como a perca (*Sander vitreus*) chegam a exibir valores de  $F$  de até 0,6 para alguns *loci* de microssatélite, em algumas populações isoladas (Dupont *et al.*, 2007). Aqui, três principais possibilidades são levantadas sobre esses coeficientes de endogamia relativamente altos: i) Ocorrência de endogamia na população; ii) subestruturação na amostra (efeito Wahlund) e iii) presença de alelos nulos em alguns *loci* (Brookfield, 1996).

A prática de peixamentos com indivíduos oriundos de pisciculturas poderia ser um fator contribuinte para uma taxa alta de consangüinidade entre os indivíduos dessa população (i). A perda de variabilidade genética e a diferenciação de estoques em função de práticas de pisciculturas têm sido demonstrada em vários trabalhos recentemente (*e.g.* Was e Wenne, 2003; Afanas'ev *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2006; Pampoulie *et al.*, 2006). Existe uma relação inversa entre o coeficiente de endogamia e o tamanho efetivo da população ( $N_e$ ) de forma que  $N_e$  é igual a  $1/2 \Delta F$ ; onde  $\Delta F$  é a taxa de endogamia por geração (Falconer e Mackay, 1996). Como o tamanho efetivo populacional é freqüentemente menor do que o tamanho de censo da população (Araki *et al.*, 2007) e nas pisciculturas muitas vezes utilizam-se pouquíssimos indivíduos nas práticas de reprodução, a taxa de endogamia é conseqüentemente muito alta. A represa da AHE do Funil está a montante da represa de Furnas, portanto, os animais capturados a jusante do Funil podem potencialmente ser oriundos de programas de peixamento realizados com peixes produzidos na estação de hidrobiologia e

piscicultura de Furnas. Os peixes utilizados como matrizes reprodutivas nos tanques de Furna, são oriundos de localidades diversas do rio Grande, como por exemplo, Porto Colômbia, no triângulo mineiro (observação pessoal).

Alguns valores de endogamia relatados aqui são comparáveis aos encontrados com microssatélites em espécies de plantas autocompatíveis (e.g. Pereira *et al.*, 2007). A abordagem empírica dessa questão passa pela comparação cuidadosa das matrizes e estoques das piscicultura do rio Grande e das populações nos reservatórios.

A hipótese de que o resultado dos altos valores de endogamia seja devido ao efeito Wahlund (ii) constitui uma outra possibilidade: dentro da amostra de 95 peixes haveria uma subestruturação não detectada, oriunda da origem migratória diversa dos indivíduos capturados na mesma leva (estoque misto) (e.g. Papa *et al.*, 2007; Sønstebø *et al.*, 2007). Se a amostra aqui analisada for de fato formada de peixes de duas ou mais diferentes populações (como por exemplo, oriundas de tributários distintos, ou peixes de piscicultura x peixes selvagens), mesmo estando as populações originais em EHW, a mistura das populações não irá exibir EHW e irá apresentar déficit de heterozigotos (Hedrick, 2000 p272). Essa seria uma possibilidade visto que, apesar dos trabalhos de Godoy (1954, 1957, 1959 e 1967) e de Silva (2004), aspectos do comportamento migratório e da possibilidade da ocorrência de *homing* (filopatria) em *P. lineatus* no rio Grande ainda permanecem pouco elucidados. Trabalhos de marcação física e genética aliados aos trabalhos com rastreadores de telemetria poderão auxiliar na resolução da delimitação de eventuais estoques mistos (Shaklee e Currens, 2003) no rio Grande.

A hipótese de existência de subestruturação na amostra, porém, fica fragilizada diante dos resultados da análise de agrupamento de genótipos, baseado em vários *loci*, do programa *Structure*. As diversas tentativas de detecção de agrupamentos dentro da amostra falharam. Foram experimentados valores de agrupamento (k) variando entre 2 e 10 (resultados não mostrados) e todos resultados apontaram para panmixia dentro da amostra. Portanto, considero que em função disso, aliado à detecção de EHW em alguns *loci* e falta de evidência para disequilíbrio de ligação na amostra, que os 95 indivíduos analisados pertencem de fato à mesma população.

A última possibilidade, a ocorrência de alelos nulos nesses marcadores (iii), seja talvez a explicação mais direta, pelo menos no caso do *locus* Pli60. Seu forte desvio do EHW e sua altíssima taxa de endogamia ( $F=0,36$ ) - maior que de estoques cativos - pode ser o reflexo da presença de alelos nulos, *i.e.* alelos que não amplificam com o par de iniciadores empregados, em função da ocorrência de mutação nas seqüências flanqueadoras correspondentes à região de anelamento da extremidade 3' (Brown e Epifanio, 2003). Quando um heterozigoto para o

alelo nulo é tipado, ele é considerado um homozigoto para o alelo alternativo e, então, o número de homozigoto e as freqüências de alguns alelos ficam distorcidas, levando à discrepâncias em relação às freqüências de equilíbrio. Para testar essa hipótese esse (e os demais marcadores), devem ser submetidos à exames de paternidade em linhagens de pisciculturas com parentesco conhecido.

Foi realizada uma análise empregando-se o estimador *jackknife* (Efron, 1981) sobre o número de alelos (riqueza alélica). A riqueza *jackknife* foi superior nos três *loci* mais polimórficos e idêntica ao riqueza observada nos dois *loci* menos polimórficos (Pli34 e Pli61). Na comparação estatística do número de alelos em cada *locus* não houve diferença entre os *loci* Pli43 e Pli60 (IC a 95% de probabilidade). O marcador Pli30 foi o de maior riqueza *jackknife* com 26 alelos estimados, cinco a mais do que os observado de fato. As estimativas *jackknife* são altamente influenciadas por ocorrências raras (alelos de baixa freqüência na amostra) e sugerem que, dada a distribuição dos dados, uma amostragem mais rigorosa (*i.e.* N maior) deveria revelar alelos não amostrados com o atual tamanho amostral. Para visualizar esse efeito foi plotado em um gráfico a acumulação gradual de estimativas de riqueza *jackknife* para tamanhos amostrais, desde um único indivíduo, adicionando-se à amostra um indivíduo por vez, até atingir-se o tamanho amostral N.

Essa análise se mostrou muito útil para avaliar o comportamento das estimativas em relação ao vício de amostragem de certos alelos (viés estatístico). Para os *loci* Pli34 e Pli61, o patamar com número de alelos amostrados de fato é logo atingido, com tamanhos amostrais relativamente pequenos (~10 indivíduos). Antes de estabilizar, porém, esse número fica superestimado quando o tamanho amostral é muito pequeno (até cerca de 5 indivíduos). Isso ilustra a importância em obter-se tamanhos amostrais suficientemente grandes para a análise populacional. Essa análise se refere exclusivamente ao número de alelos no *locus*. Para a obtenção de estimativas verossímeis de suas freqüências, tamanhos amostrais maiores são ainda mais importantes.

O formato da curva de acumulação construída para os marcadores Pli30 e Pli60 sugere que, se fosse mantido o regime de amostragem para se genotipar um número ainda maior de indivíduos, novos alelos seriam eventualmente encontrados. Isso acontece pela presença de muitos alelos de freqüência muito baixa (ver Apêndice B). No *locus* Pli60, apesar de muito polimórfico, o procedimento aleatório de reamostragem estima a presença de menos do que dois alelos na amostra de apenas um indivíduo (primeiro ponto relativo à esse *locus*, Figura. Isso se deve a significativa presença de excesso de homozigotos na população e à alta probabilidade de se observar apenas um alelo no primeiro indivíduo amostrado.

Como os alelos raros ( $p < 0,01$ ) não formaram mais do que 20% do total de alelos nos *loci* mais polimórficos (e.g. o *locus* mais polimórfico, Pli30, teve apenas quatro alelos raros, Pli60 teve três e Pli43 teve apenas um) - Apêndice B – as estimativas de riqueza alélica e de suas frequências deve estar bem representada com os tamanhos amostrados utilizados nesse trabalho. Segundo simulações relatadas em Kalinowski (2005), *loci* polimórficos como microsatélites têm maior coeficiente de variação de distâncias genéticas, como distância de Nei, Distância de Corda de Cavalli-Sforza ou  $F_{ST}$ , para marcadores de menor taxa de mutação. Um resultado novo encontrado nesse trabalho é que tamanhos amostrais ideais (aqueles com coeficiente de variação minimizados) dependem exclusivamente das distâncias genéticas reais entre populações e não do polimorfismo do *locus* ou da taxa de mutação. Populações muito diferenciadas requerem no máximo 20 indivíduos para detectarem fidedignamente a distância genética, enquanto populações muito pouco diferenciadas (e.g.  $F_{ST} < 0.01$ ) até 100 indivíduos são necessários para estimativas confiáveis de diferenciação genética entre populações. O conhecimento obtido até hoje sobre a natureza da estrutura genética de *P. lineatus* no rio Grande e na bacia do Paraná (Revaldaves *et al.*, 1997; Sivasundar *et al.*, 2001; Carvalho, 2002) sugerem que o último caso deve se aplicar a esses peixes nessa região: além de forte migrador (Godoy, 1975 e Silva, 2004), essa espécie tem uma quantidade grande de polimorfismos genéticos e constituem um grupo historicamente antigo no continente. Esses fatores apontam para pequenos níveis de diferenciações genéticas onde de fato há fatores contribuindo para uma estruturação de significância biológica (Sivansundar *et al.*, 2001; Guillermo Ortí, comunicação pessoal). Por isso estudos com *P. lineatus* devem empregar tamanhos populacionais preferencialmente grandes (cerca de 100 indivíduos por população).

A avaliação de desequilíbrio de ligação entre todos os pares de *loci* possíveis foi realizada considerando-se  $\alpha = 0,05$ . Não houve significância de associação entre nenhuma das dez combinações possíveis de *loci* (Tabela). Isso indica que os marcadores devem segregar ao acaso (diferentes grupos de ligação) Além disso, essa pode ser encarada como uma evidência contra a ocorrência de mistura no estoque da análise, uma vez que não foi observado desequilíbrio gamético (desequilíbrio de ligação). Esse desequilíbrio é esperado como extensão do efeito Wahlund para vários *loci*. Mesmo se cada eventual sub-população dentro do cardume migrador exibir equilíbrio de ligação, a mistura irá mostrar uma associação não-aleatória dos alelos nos diferentes *loci* (Garrett e Zhivotovsky, 2003). Esse fato, aliado à existência de *loci* em EHW e de *loci* fora do EHW, porém sem excesso de homocigotos, são fortes indicativos de que a causa do alto coeficiente de endogamia, particularmente observado em Pli60, pode ser devido a existência de alelo nulo segregando na amostra populacional.

### 1.6.3 – Considerações finais

Os marcadores desenvolvidos nesse trabalho certamente serão de grande valia para os estudos populacionais futuros relacionados às práticas de gerenciamento de recursos pesqueiros no rio Grande e em outras bacias Sul-Americanas. O uso conjunto desses *loci* determinados aqui e dos dois *loci* descritos em Carvalho (2002), com os gerados para espécies próximas como *P. costatus* (Carvalho-Costa *et al.*, 2006) e para *P. argenteus* (Barbosa *et al.*, 2006), fornece aos pesquisadores da área de genética de peixes e de gerenciamento da pesca no Brasil, um conjunto de marcadores microssatélites potencialmente heterólogos para o gênero *Prochilodus*. Visto o alto potencial de amplificações cruzadas interespecíficas bem sucedidas (Carvalho-Costa, 2006; Barbosa *et al.*, 2006), esse conjunto de *loci* (até 26 marcadores microssatélites) pode agora ser utilizado no entendimento básico da biologia das espécies de *Prochilodus*. Os estudos de padrões mutacionais nesses *loci*, nas diferentes espécies do gênero, poderão potencialmente apontar um subconjunto de marcadores com comportamento de mutação conhecido e que aumentarão o grau de informação e inferência viabilizadas na análise populacional e filogeográfica (Ellegren, 2004). De forma mais prática, o conjunto de microssatélites pode ser triado para a associação com marcadores cariotípicos (como cromossomos supranumerários), no mapeamento genético e na busca de QTLs para características de importância ecológicas e de interesse para produção comercial de curimbas em pisciculturas.

Sua aplicação na delimitação de estoques e seu potencial para a avaliação de possíveis impactos genéticos e da eficiência de procedimentos peixamentos e de práticas de pisciculturas será de grande valor para guiar a tomada de decisões no gerenciamento ambiental. Isso irá contribuir garantindo a presença do pescado para as populações ribeirinhas e auxiliará na conservação da biodiversidade nos sistemas hídricos da região, amplamente afetados pela atividade humana. O uso de ferramentas moleculares e o conhecimento gerado em sistemas de pisciculturas/peixamento será de enorme utilidade para os a pesca sustentável no Brasil.

## 1.7 - Conclusões

- A biblioteca genômica primária de *Prochilodus lineatus* aqui produzida poderá ser triada para diversos genes de interesse, incluindo outros microssatélites e está depositada no Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares (ICB – UFMG).
- Os cinco *loci* de microssatélites isolados e caracterizados para *P. lineatus* são apropriados para a análise genética populacional.
- Esses e os demais *loci* aqui descritos (Apêndice A) poderão ser testados em espécies próximas de *Prochilodus*.
- A amostra populacional examinada não apresentou EHW no conjunto dos cinco *loci* e uma investigação mais profunda é necessária para discernir a real causa desse fato.
- Uma análise do comportamento mendeliano e a presença de alelos nulos é necessária, particularmente para o *loci* Pli60 que pode ter, potencialmente, alelos nulos segregando.
- Uma análise de reamostragem evidenciou a existência de viés amostral em alguns *loci* mais polimórficos, indicando cuidados na determinação de um tamanho amostral ótimo para a estimativa da riqueza alélica em cada *locus*.
- O conjunto dos *loci* desenvolvidos nesse trabalho, com os marcadores isolados para outras espécies do gênero *Prochilodus*, tem um grande potencial para a investigação de comportamento mutacional, bem como aplicações práticas como na prospecção de QTLs de importância econômica e ecológica.
- Os marcadores desenvolvidos nesse estudo serão de grande utilidade no gerenciamento dos recursos pesqueiros em bacias Sul Americanas.

## Capítulo II

**Avaliação genética de práticas para formação de estoques procriadores em *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) utilizados em peixamentos.**



# **Avaliação genética de práticas para formação de estoques procriadores em *Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) utilizados em peixamentos.**

## **2.1 Introdução**

Esta parte do trabalho foi realizada durante um estágio de um ano no Canadá, financiado pelo programa de Doutorado Sanduíche no Exterior, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Durante esse período tive a oportunidade de participar, com diferentes graus de envolvimento, nas seguintes linhas de pesquisas em genética populacional de peixes:

- Avaliação genética de práticas para formação de estoques procriadores de truta-arco-íris -*Oncorhynchus mykiss* (Salmoniformes) - utilizados em peixamentos. Esse tópico é o objeto deste capítulo;

- Distinção genética de alevinos das formas anádroma e exclusiva de água doce do salmão vermelho -*Oncorhynchus nerka* (Salmoniformes) - através de RFLP em genes mitocondriais;

- Análise genética de populações isoladas de esturjão branco - *Acipenser transmontanus*, (Acipensiformes) - por meio de RFLP em genes mitocondriais; e

- Estrutura genética populacional do peixe solha-estrelado-do-pacífico – *Platichthys stellatus* (Pleuronectiformes), inferida através do uso de microssatélites.

Todos os projetos foram conduzidos no Departamento de Biologia da Universidade de Victoria (*University of Victoria*), Victoria, Columbia Britânica, sob coordenação do Dr. R. John Nelson, no laboratório do Dr. Benjamin F. Koop. O estágio foi incorporado no contexto do projeto bilateral Brasil-Canadá coordenado pelo *World Fisheries Trust* e pela Universidade Federal de São Carlos, chamado Peixes, Pessoas e Água, primariamente voltado para o rio São Francisco e visando, entre outros objetivos, a transferência de experiências canadenses em questões relacionadas à gestão da pesca. O Dr. Joachim Carolsfeld me orientou durante minha estadia no Canadá, conjuntamente com o Dr. John Nelson. Ambos já haviam colaborado com o grupo do Dr. Evanguedes Kalapothakis via Centro de Transposição de Peixes do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Nessa parte serão detalhadas as atividades de pesquisa que foram realizadas com avaliação genética de um sistema de formação de estoques procriadores utilizados em programas de peixamentos no Canadá. Esse é um sistema cuja compreensão pode servir de referencial para as pisciculturas Brasileiras, que deverão desempenhar um papel cada vez mais

importante na manutenção de variabilidade genética das populações de peixes de piracema na América do Sul, frente a constante degradação ambiental sofrida em grande parte de seus sistemas hídricos (poluição, desmatamentos da vegetação ripária, perda de nascentes, implementação de barragens, entre outros fatores).

### **2.1.1 – Sistemas de peixamento e conceitos genéticos associados**

Durante os últimos dez anos, quase 1300 pequenos lagos (<1000ha) sofreram procedimentos de repovoamento (peixamentos) de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* - Walbaum, 1792), constituindo uma parte importante do esforço de pesca com linha e anzol na província da Columbia Britânica, Canadá (FFSBC, 2004). Esses lagos devem ser repovoados recorrentemente, todos os anos, por causa das altas taxas de mortalidade que incidem nas populações durante o inverno ou, simplesmente por que esses lagos não fornecem ambientes propícios à reprodução desses peixes. Os indivíduos utilizados nos peixamentos são oriundos de alguns lagos gerenciados para se manter estoques procriadores dessa espécie (lagos de procriação).

Essa prática tem como objetivo principal fornecer ampla oportunidade de pesca esportiva e não tem como meta gerar populações auto-suficientes nem substituir permanentemente as populações selvagens. No entanto, para que esse programa seja bem sucedido, os peixes devem sobreviver até atingirem um tamanho mínimo para a captura e devem ter características comportamentais, ecológicas e de história de vida compatíveis com esse sistema de pesca “tira e põe” (Allendorf e Ryman, 1987; Post *et al.*, 2003; Arlinghaus e Hallerman, 2007). Como esses traços têm um importante componente genético (*e.g.*: Øverli *et al.*, 2002; Funk *et al.* 2005; Kaue *et al.* 2006; Tobin *et al.*, 2006) é desejável que sejam conservadas as características genético-populacionais de populações utilizadas como estoques de procriação.

Populações utilizadas em programas de piscicultura, procriação ou de repovoamento devem ser fundadas a partir de um número suficientemente grande de indivíduos (Allendorf e Ryman, 1987; Miller e Kapuscinski, 2003; Araki *et al.*, 2007) a fim de evitar-se uma redução drástica no tamanho efetivo da população ( $N_e$ ). Esse é um dos parâmetros mais importantes nos modelos preditivos de genética de populações e foi proposto por Sewall Wright (1931; 1939).  $N_e$  pode ser definido como sendo o tamanho de uma população mendeliana (idealizada) que resultaria na mesma perda de heterozigosidade, aumento da variância da frequência alélica  $p_i$ , ou aumento da taxa de endogamia, do que o observado na população analisada (Hedrick, 2000 p245). O parâmetro  $N_e$  é influenciado por vários fatores como, tipo de reprodução, número de

indivíduos sexualmente maduros, razão sexual na população, flutuações demográficas através das gerações, estrutura etária e variação nos tamanhos de famílias (e.g. Araki *et al.*, 2007). Populações grandes fundadas a partir de um número pequeno de indivíduos ou com contribuição desigual de progenitores podem exibir um  $N_e$  muito baixo (Briscoe *et al.*, 1992; Ayllon *et al.* 2004; Borley e White, 2006).

A insuficiência dos tamanhos populacionais efetivos é provavelmente a causa mais importante de perda de variabilidade genética nas populações, em função da deriva genética (Frankham, 1996). A deriva genética é a mudança probabilística aleatória das frequências alélicas, que eventualmente leva à perda de diversidade (fixação ou diminuição do número de alelos) dentro das populações e à diferenciação entre populações. Populações pequenas ficam sujeitas a dois principais problemas de base genética, relacionados, porém de consequências distintas: i) aumento da frequência da exposição de alelos deletérios em homozigose, em função da endogamia, levando ao aparecimento de depressão endogâmica e conseqüente perda de valor adaptativo populacional (impacto de curto prazo), e ii) perda de variabilidade genética intrapopulacional e incapacidade de evolução futura (impacto de longo prazo) (Lande, 1999).

A variabilidade genética é parte fundamental da biodiversidade e requer medidas ativas de conservação (Reed e Frankham, 2003). Acredita-se que a existência de variação genética é que permite que populações submetidas a mudanças ambientais respondam a novas pressões ecológicas (e.g. doenças, espécies competidoras exóticas, mudanças climáticas, mudanças físico-químicas do meio, poluição, etc.) e evitem a extinção local.

Recentemente a associação entre valor adaptativo e níveis de variabilidade genética tem sido demonstrada com diferentes marcadores e em diversos grupos (e.g. Ferreira e Amos, 2006; Kretzmann *et al.*, 2006; Ramirez *et al.*, 2007; Schmeller *et al.*, 2007, Timmermans *et al.*, 2007). Ottová *et al.*, (2007) verificaram superioridade do heterozigoto em *loci* do complexo principal de histocompatibilidade em peixes da espécie *Abramis brama* e Oosterhault *et al.*, (2006), em gupis (*Poecilia reticulata*). Já Eyto *et al.*, (2007) mostrou a importância da variabilidade desses marcadores no salmão do Atlântico (*Salmo salar*). Tiira *et al.*, (2003) mostraram a associação entre heterozigosidade em marcadores microssatélites e características relacionadas a um maior valor adaptativo em truta marrom (*Salmo trutta*). Reed e Frankham (2003) demonstraram, através de uma meta-análise com 34 conjuntos de dados, que existe uma correlação positiva, ainda que tênue (~20%), entre o nível de variabilidade genética para diversos tipos de marcadores e medidas associadas ao valor adaptativo. A manutenção da variabilidade intra e

interpopulacional deve ser uma meta de todos os programas de conservação e manejo de salmonídeos (Wang *et al.*, 2002), bem como das demais espécies da ictiofauna.

Um programa de piscicultura/procriação bem planejado deve evitar mudanças genéticas associadas ao número limitado de procriadores, além de observar a existência de adaptações estoque-específicas. Por exemplo, Araki *et al.*, (2007) mostrou que trutas-arco-íris criadas em pisciculturas e depois soltas no ambiente natural mostraram diferenças de sobrevivência relacionadas à origem de linhagens. O cruzamento entre formas adaptativamente distintas, naturais ou cultivadas, pode levar ao surgimento de depressão exogâmica (rompimento de adaptações locais) (Frankham *et al.*, 2002 p385). A ocorrência de híbridos entre indivíduos de pisciculturas e peixes selvagens tem sido implicada na perda de valor adaptativo em *O. mykiss* (Miller *et al.*, 2004).

Outro problema associado com a criação de organismos *ex-situ* é a ocorrência de adaptação às condições de cativeiro e a perda de adaptações importantes ao ambiente selvagem (Allendorf, 1993; Reed e Frankham, 2002 p452). Entretanto, apenas através de um programa de monitoramento é possível verificar se estas mudanças estão ocorrendo. O monitoramento da variabilidade molecular de marcadores neutros e de características adaptativas, tais como dados morfológicos e/ou de história de vida, são importantes para essa finalidade (Allendorf e Ryman, 1987).

Tradicionalmente, marcadores de isoenzimas foram amplamente aplicados nessa tarefa e se mostraram eficientes na detecção da perda de variabilidade genética em populações de pisciculturas (*e.g.* Ryman e Stahl, 1980; Verspoor *et al.* 2005). Estes marcadores, porém, necessitam geralmente da aplicação de uma grande número de *loci* (segundo Allendorf e Ryman, 1987, até 60). Os marcadores nucleares de microssatélites têm a vantagem de, por serem altamente polimórficos, permitir a utilização de um número menor de *loci* (Kalinowski, 2002). Estes marcadores já foram aplicados com sucesso na determinação da perda de variabilidade genética entre populações selvagens fundadoras e estoques de piscicultura de salmonídeos e vários outros grupos de peixes (*e.g.* Hansen *et al.*, 2000; Sekino *et al.*, 2002; Evans *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2004; Page *et al.* 2005; Aho *et al.*, 2006; Frost *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2006). Modelos teóricos demonstram que mesmo utilizando-se estoques de pisciculturas, fundados a partir de tamanho efetivo de 100 indivíduos, dificilmente uma população natural poderá manter seu nível de variabilidade genética original se forem incorporados na população mais de 45% de indivíduos do peixamento (Ryman e Laikre *apud* Taniguchi, 2003).

A passagem de alelos espécie-específicos, ou de alelos privados (particulares de alguma população ou linhagem genética), para outros grupos denomina-se introgressão. Sua ocorrência é possível por causa do acontecimento de cruzamentos híbridos (entre espécies/populações/linhagens diferentes) e devido ao cruzamento de volta desses híbridos com uma das formas parentais (Ryman *et al.*, 1995). A ocorrência de introgressão devido à suplementação de populações naturais com peixes de pisciculturas tem sido demonstrada e discutida em diversos casos (*e.g.* Docker *et al.*, 2003; Marzano *et al.*, 2003; McLean *et al.*, 2003; Aparicio *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2006; Sanz *et al.*, 2006; Sprowles *et al.* 2006; Small *et al.* 2007).

### **2.1.2 – Sistema provincial de lagos de procriação**

O programa de lagos de procriação da província da Columbia Britânica é conduzido pela *Freshwater Fisheries Society of BC* (FFSBC) e envolve a formação de plantéis com peixes coletados em populações selvagens, em vários eventos recorrentes de amostragem, para serem criados e reproduzidos em lagos de procriação. Cada lago de procriação recebe peixes de uma ou duas fontes selvagens, onde cada indivíduo é identificado com etiqueta metálica na nadadeira ou na maxila. O objetivo desses lagos é gerar um número suficientemente grande de indivíduos de cada linhagem para serem utilizados na formação de plantéis utilizados em peixamentos e, dessa forma, aliviar a pressão de captura diretamente nas fontes selvagens originais.

As linhagens selvagens são conhecidas como Pennask, Blackwater e Tzenzaicut, de acordo com o nome do lago ou rio de origem. Além das linhagens oriundas de fontes selvagens, o programa provincial utiliza um estoque domesticado exclusivamente de piscicultura e três outros estoques “residentes” de lagos de procriação que são peixes não-marcados. Acredita-se que essas populações são originárias de eventos de peixamentos não registrados no passado. A Tabela 2.1 sumariza as linhagens utilizadas pelo programa provincial da Columbia Britânica.

Cada sessão de coleta de matrizes selvagens para formação dos estoques de procriação envolve a captura de adultos (geralmente 50 machos e 50 fêmeas) na época da subida migratória de cardumes, em cercas localizadas na embocadura de tributários nos lagos (no caso de Pennask e Tzenzaicut) ou diretamente no rio (Blackwater). Os peixes são levados para reprodução em pisciculturas e em seguida são descartados como reprodutores. Peixes que não atingiram a maturação sexual capturados nesse estágio são mantidos por mais dois ou três anos na piscicultura, quando são utilizados na reprodução com novas levadas recém capturadas. Ao atingir tamanho adulto, a prole oriunda desses cruzamentos é então marcada e solta em lagos

de procriação. A introdução de novos indivíduos (oriundos de cruzamentos selvagens) nos lagos de procriação ocorre a cada dois ou três anos. Essa prática de formação de estoques procriadores é única dentre os principais programas de pisciculturas de *O. mykiss* na América do Norte: todos peixes utilizados no peixamento têm pais exclusivamente selvagens (FFSBC, 2004). Um diagrama esquemático da relação entre linhagens selvagens e lagos de procriação enfocados nesse estudo pode ser visto na Figura 2.1.

O lago Dragon comporta duas linhagens de *O. mykiss* distintas, com seus indivíduos respectivamente marcados. Alguns lagos de procriação, como por exemplo o lago Premier, contam com populações residentes de *O. mykiss* não-marcados. Acredita-se que esses indivíduos são oriundos da reprodução livre de peixes introduzidos por peixamentos nesses lagos e que estes são de origens diversas (FFSBC, 2004). Esses peixes não tem sido usados no programa, em função desta indeterminação.

Nas épocas de reprodução, quando os peixes nos lagos de procriação procuram os tributários para subida migratória, são capturados cerca de 100 peixes marcados para realizar-se os cruzamentos que irão dar origem aos estoques utilizados nos diversos lagos do programa de peixamentos na província. Os peixes capturados nesse momento, constituem uma amostra heterogênea de classes etárias (adultos de 2-5 anos, porém majoritariamente com 3 anos de idade). Os peixes oriundos desse cruzamento são levados em diferentes estágios de desenvolvimento para os lagos de peixamento. A decisão sobre qual linhagem é utilizada e em qual fase, baseia-se em características como a produtividade dos lagos-alvo, presença de outras espécies, presença de populações selvagens de *O. mykiss* e forma de transporte dos peixes, que pode ser em caminhões tanque e até de helicóptero, nos locais mais ermos e de difícil acesso.

### **2.1.2 - *Oncorhynchus mykiss***

*O. mykiss* é uma espécie de salmonídeo que já foi introduzida em ao menos 45 países para pesca esportiva ou criação para consumo. A espécie conta com duas formas distintas de história de vida: uma anádroma, na qual os indivíduos nascem nos rios e lagos de água doce no continente e realizam migração até o oceano, onde forrageiam e se desenvolvem antes de retornar para o mesmo rio onde nasceram. Esse peixes são conhecidos como *steelhead*. A outra forma é as vezes denominada *landlocked*, ou simplesmente truta-arco-íris (ou ainda *redband*) e vive exclusivamente em rios e lagos de água doce. Aquela atinge até cerca de 120 cm e 20 kg e esta pode medir até aproximadamente 90 cm e pesar até cerca de 10 kg. O cruzamento entre essas duas formas distintas tem sido observado (*e.g.* Small *et al.*, 2007)

A espécie tem sido descrita como sendo formada por vários taxa infraespecíficos, sendo tradicionalmente distinguidas quatro principais subespécies: *O. m. irideus* (forma costeira) e *O. m. gaidineri* (forma *redband*), ambas encontradas na costa oeste da América do Norte; e *O. m. mykiss* (forma Kamchatkan), do leste da Sibéria e uma quarta possível subespécie no rio Athabasca em Alberta, Canadá (a forma Athabaskan), *O. m* subsp. (Behnke, 1992), uma das poucas bacias que drenam para o leste do Canadá em que essa espécie ocorre naturalmente. Essa classificação se baseou originalmente em diferenças morfológicas e em análise isoenzimática (Behnke, 1992, Carl *et al.*, 1994). Porém, a classificação em forma *redband* e forma costeira tem sido questionada pela falta de verificação de reciprocidade monofilética entre as duas formas na análise de haplótipos mitocondriais (McCusker *et al.*, 2000). Esses autores também não encontraram a existência de diferenças nas frequências haplotípicas no mtDNA da forma costeira/Kamchatkan e da forma Athabaskan. O trabalho de Taylor *et al.*, (2007), utilizando 10 *loci* de microssatélites, confirma esses resultados e ambas as investigações defendem a idéia de que esses peixes do rio Athabasca são descendentes de uma população relictual de migrantes pós-glaciais, oriundos das cabeceiras do rio Fraser, que drena para o oceano Pacífico, a oeste.

McCusker *et al.*, (2000) analisaram a variação de DNA mitocondrial (mtDNA) através da área de distribuição geográfica original da truta arco-íris, que vai desde o Pacífico leste, da península de Baja no México, costa e interior da Califórnia, Oregon, Columbia Britânica, sul do Alaska (América do Norte) até a península Kamchatkan, no leste da Sibéria (Ásia, noroeste do Oceano Pacífico) (Figura 2.1). Nesse estudo os autores reforçam a hipótese que considera a Califórnia como o centro de origem da espécie, dado que este local apresenta a maior variabilidade de haplótipos mitocondriais e morfológica através das bacias e mesmo dentro de bacias. Os estudos de McCusker *et al.*, (2000), também apontaram locais potenciais de refúgios durante as últimas glaciações do final do pleistoceno (entre 16.000 e 10.000 anos atrás), que teriam servido como fontes regionais de recolonização, quando da retração das geleiras glaciais: o rio Columbia, na costa oeste da América do Norte e rios nas ilhas Rainha Charlotte, ao norte da costa da Columbia Britânica. Isso se baseia na diversidade haplotípica encontrada nessas regiões, ainda que a espécie deva ter persistido também, em menor número, ao longo da costa dos estados de Washington, Oregon e Califórnia, nos Estados Unidos. Apesar das formas de vida marcadamente distintas e da existência de múltiplas levas migratórias (inverno, verão), análises de variância molecular (AMOVA) não mostraram significância para arranjos de populações por grupos de história de vida. Porém estes autores detectaram estruturação significativa em função de distribuição geográfica em bacias (McCusker *et al.*, 2000).

Portanto, postula-se que inicialmente a espécie expandiu-se do sul para o norte, porém que a distribuição recente derivou do processo de recolonização pós-glacial, a medida que as geleiras da região retrocederam. Isso parece ter proporcionado um grau diverso de ambientes propícios colonizados, com particularidades ambientais que proporcionaram o surgimento de uma ampla gama de linhagens distintas com características morfológicas, comportamentais e ecológicas adaptativas variáveis (adaptações locais).



**Figura 2.1.** Representação da Terra com destaque para a área aproximada da distribuição original de *O. mykiss* (região em vinho). Modificado a partir de imagem obtida no *Google Earth*.

Um aspecto de grande impacto na genética populacional de salmonídeos migratórios é o seu comportamento de *homing* (grande número de indivíduos anádromos, retornam exatamente ao mesmo rio no qual nasceram). Essa habilidade parece depender de orientação por meio de campos magnéticos (Walker *et al.*, 1997). Dessa forma, há a tendência a uma forte estruturação genética populacional, com evidente delimitação de estoques entre bacias diferentes e, até mesmo, rios distintos dentro de uma mesma bacia (*e.g.* Was e Wenne, 2002; Nelson *et al.*, 2003; Stewart *et al.*, 2003; Ludwig, 2006; Rich *et al.*, 2006; Neville *et al.*, 2006 e 2007).

Diferentemente das outras espécies de *Oncorhynchus* do Pacífico, *O. mykiss* não possui ciclo de vida semélparo (no qual os indivíduos morrem logo após a reprodução). Adultos das



duas formas podem se reproduzir por vários anos seguidos (iteroparidade) e um indivíduo anádromo pode sobreviver a várias idas e vindas entre rio e oceano.

Das linhagens selvagens exclusivas de água doce utilizadas nos programas da FFSBC, podemos destacar as seguintes características:

- Pennask: a linhagem selvagem do lago Pennask é caracterizada por hábitos alimentares predominantemente insetívoros, alimentando-se principalmente de cladóceros e de larvas de dípteros quironomídeos, limnéticos (águas médias) de atividade preferencialmente crepuscular. Esses peixes são bons saltadores, relativamente pequenos e de crescimento lento e não são considerados candidatos adequados para peixamentos em lagos que possuem outras espécies de peixes (Figura 2.2).



**Figura 2.2:** Fêmea selvagem de *O. mykiss* do lago Pennask. Fonte: FFSBC (2004).

- Blackwater: os peixes dessa linhagem preferem caracteristicamente presas relativamente grandes como ninfas de odonatos, caramujos e pequenos peixes não-salmonídeos. São descritos como altamente piscívoros quando adultos e forrageiam preferencialmente em cardumes, explorando águas rasas, com maior atividade durante o dia. É considerado uma forma agressiva, atrativa para a pesca esportiva. Esse peixes costumam obter boas taxas de crescimento e sobrevivência em sistemas com várias espécies de peixes e, em função de seu forte potencial migratório, são preferencialmente usados em peixamentos de lagos sem tributários, para minimizar o risco de colonização indesejada (Figura 2.3)



**Figura 2.3:** Macho sub-adulto selvagem de *O. mykiss* do rio Blackwater. Fonte: FFSBC (2004).

- Tzenzaicut: Esses peixes têm hábitos semelhantes aos peixes da linhagem Pennask, porém são mais marcadamente piscívoros, predando pequenos peixes não-salmonídeos. Esses peixes tem sido descritos como forrageadores crepusculares de águas abertas, que evitam o bentos e de performance mais eficiente em águas mais geladas. Por esse motivo a linhagem é preferencialmente utilizada no peixamento de lagos de águas frias e de baixa produtividade, com abundância de espécies de não-salmonídeos. São descritos como fortes lutadores no momento da captura com anzol e demonstram altas taxas de sobrevivência quando soltos após serem pescados. (Figura 2.4)



**Figura 2.4:** Macho (acima) e fêmea (abaixo) adultos do lago Tzenzaicut. Fonte: FFSBC (2004).

Este estudo propõe a avaliação genética das práticas de culturas utilizadas para formação de estoques utilizados no sistema “tira e põe” de pesca na província da Columbia Britânica, Canadá.

## **2.2 Justificativa**

A atividade de suplementação de estoques naturais e peixamentos é uma importante parte do foco das atividades de pisciculturas (Miller e Kapuscinski, 2003), tanto para mitigação de impactos ambientais, quanto para a criação de oportunidade de pesca (esportiva e comercial). A compreensão dos efeitos genéticos associados a essas práticas são fundamentais para o planejamento de estratégias de manejo e conservação da diversidade selvagem de peixes de importância econômica e ecológica. Os resultados gerados pela avaliação genética de sistemas de peixamento de salmonídeo pode gerar conhecimento importante para guiar medidas visando a preservação da diversidade genética selvagem, minimizando os potenciais efeitos negativos dessa atividade. O conhecimento gerado para o sistema canadense pode ser utilizado como ponto de referência inicial para a implementação de sistemas geneticamente eficientes em pisciculturas brasileiras utilizadas para programas de repovoamento e transposição de peixes.

## **2.3 Objetivos**

### **2.3.1 - Objetivos gerais**

O objetivo deste trabalho é avaliar a eficiência das práticas de pisciculturas da província da Columbia Britânica, Canadá, na manutenção da variação genética neutra de microssatélites em estoques procriadores (matrizes) de truta arco-íris (*O. mykiss*), utilizados em atividades de peixamentos.

### **2.3.2 - Objetivos específicos**

Comparar parâmetros de variabilidade genética entre amostra das populações selvagens originárias e amostras das linhagens correspondentes nos lagos de procriação e gerar diretrizes para os procedimentos de coleta para formação de plantel de procriação.

Um objetivo secundário deste trabalho foi determinar a origem genética de uma população de reprodução natural (animais não-marcados) encontrada em um dos lagos de procriação (lago Premier).

## **2.3 Material e Métodos**

### **2.3.1 Coleta de amostras**

Esse estudo focaliza três populações selvagens de truta arco-íris e várias amostras populacionais de lagos de procriação da Columbia Britânica que são regularmente mantidos pela FFSSBC, com prole  $F_1$  dessas três populações (Tabela 2.2). O lago Tzenzaicut, o lago Pennask e o rio Blackwater foram selecionados pelo programa provincial de pisciculturas por serem considerados sistemas que possuem populações grandes e saudáveis de truta arco-íris, com características desejáveis para a pesca esportiva e compatíveis com os alvos finais dos peixamentos (pequenos lagos espalhados pela província). Essas populações são consideradas como sendo originalmente selvagens e, fora a remoção de peixes para a formação de estoques procriadores, não sofreram peixamentos ou impactos ambientais por operações de cultura de peixes no passado (FFSBC, 2004).

O lago Pennask é um sistema de monocultura (não possui outras espécies de peixes) de baixa produtividade. O rio Blackwater é um sistema de tamanho médio, que conta com inúmeras áreas amplas e rasas e com um grande número de espécies de peixes. O lago Tzenzaicut é um sistema de baixa produtividade, porém com diversas espécies de não-salmonídeos e possui águas mais geladas do que os outros dois locais mencionados. As populações desses lugares podem ser prontamente diferenciadas com base em padrões de coloração e manchas, bem como através de medidas morfológicas.

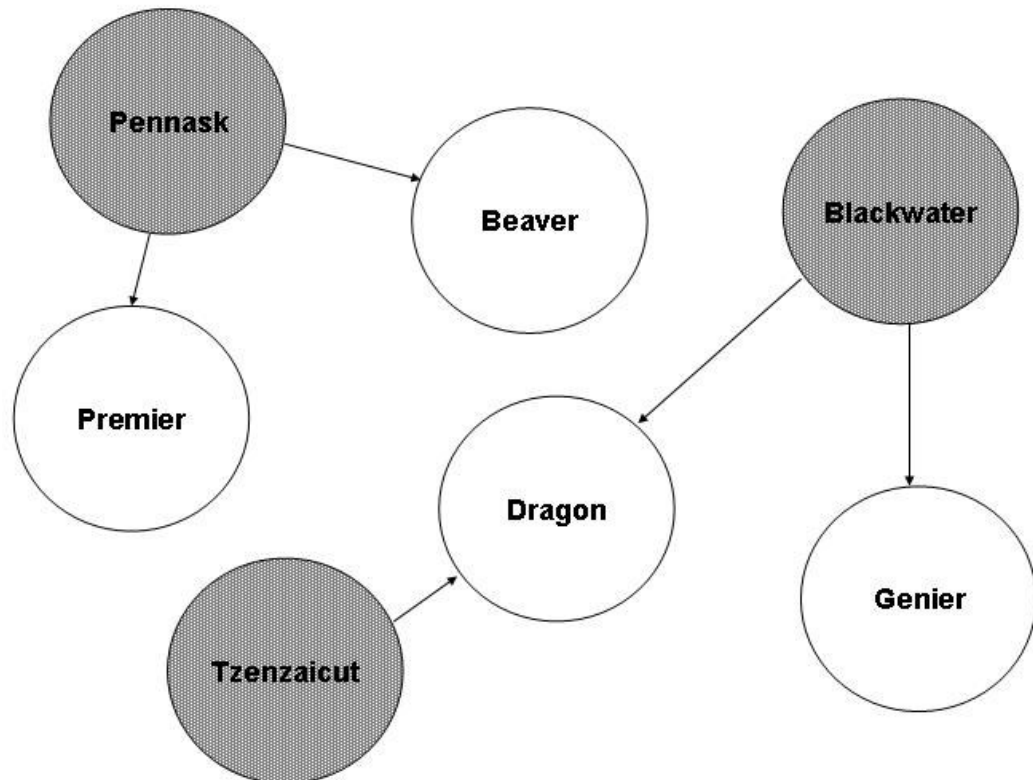
#### **2.1.1 Desenho amostral**

A amostragem de tecidos nas populações selvagens foi realizada exclusivamente em indivíduos adultos capturados durante as coletas para as pisciculturas de procriação através de cercas, redes e anzol. Essas coletas foram feitas em um mesmo instante e local para cada população, durante a estação reprodutiva quando, durante dias, milhares de peixes procuram os tributários de águas lóticicas, em grandes cardumes. Uma pequena porção de nadadeira (1-2 cm<sup>2</sup>) foi removida e imediatamente colocada em etanol 95% em tubos individualizados e identificados e mantidos assim até a extração de DNA.

Amostras dos lagos de procriação foram coletadas no ato da formação dos plantéis de peixamento e consistiram em peixes marcados, originalmente coletados nas populações selvagens, compreendendo vários eventos distintos de introdução de indivíduos novos nesses lagos. Portanto, cada amostra populacional dos lagos de procriação abrange diferentes anos de levadas migratórias, com classes de idade variando entre dois e cinco anos. Os indivíduos da

Linhagem Pennask criados no lago Premier foram amostrados em duas ocasiões distintas, bem como amostras de uma população residente (não-marcada) desse lago (Tabela 2.2). Uma amostra histórica (1987) de escamas desidratadas de indivíduos de *O. mykiss* não-marcados do lago Premier (fornecida pelo programa da FFBC) foi usada para a extração de DNA.

No total, foram coletadas 12 amostras populacionais (Tabela 2.1). Além das três populações selvagens, foram amostradas quatro populações dos lagos de procriação associados (lago Genier, lago Dragon, lago Beaver e lago Premier). A Figura 2.5 ilustra a relação entre as populações selvagens e os lagos de estoques procriadores analisados.



**Figura 2.5:** Diagrama esquemático ilustrando a relação das populações selvagens (em cinza) e os lagos de estoques procriadores (em branco) analisados nesse estudo.

**Tabela 2.1:** Amostras populacionais de truta arco-íris, códigos, origem e tamanho amostral (N). A primeira letra do código se refere à linhagem e a segunda ao local de coleta.

<b>Amostra populacional</b>	<b>Código</b>	<b>Ano de Coleta</b>	<b>Origem</b>	<b>N</b>
<b>Lago Pennask</b>	Pn/PnL	1999	Selvagem	100
<b>Pennask no Lago Beaver</b>	Pn/BeL	1999	Estoque de procriação	100
<b>Pennask no Lago Premier (1)</b>	Pn/PrL1	1999	Estoque de procriação	100
<b>Pennask no lago Premier (2)</b>	Pn/PrL2	2003	Estoque de procriação	48
<b>Rio Blackwater</b>	BI/BIR	1999	Selvagem	48
<b>Blackwater noLago Genier</b>	BI/GeL	1999	Estoque de procriação	100
<b>Blackwater no Lago Dragon</b>	BI/DgL	1999	Estoque de procriação	100
<b>Lago Tzenzaicut</b>	Tz/TzL	1999	Selvagem	95
<b>Tzenzaicut no Lago Dragon</b>	Tz/DgL	1999	Estoque de procriação	95
<b>Lago Premier (1)</b>	Pr/PrL1	1999	Não-marcados	100
<b>Lago Premier (2)</b>	Pr/PrL2	2003	Não-marcados	48
<b>LagoPremier - Escama</b>	PrSc	1987	Amostra histórica (não-marcados)	91
<b>TOTAL</b>				<b>1025</b>

### 2.2.3 Extração de DNA, PCR e eletroforese

O DNA de cada indivíduo foi extraído a partir de pequenos pedaços de nadadeira (ou escamas secas para a amostra histórica), através do método Chelex-proteinase K descrito no Capítulo I (item 1.4.2.9) (Nelson *et al.*, 1998). Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foram utilizadas Corrêa.T.C., diluições de 1/10 a partir do estoque de DNA.

Foram amplificados cinco *loci* de microssatélites num total de 1025 indivíduos analisados: quatro eram microssatélites de repetições de tetranucleotídeos - OTS 103 (Small *et al.*, 1998),

OTS 4 (Banks *et al.*, 1999), OTS 100 (Nelson e Becham, 1999) e Oki 20 (Smith *et al.*, 1998) - e um, de repetições de dinucleotídeos - Omy 77 (McConnell *et al.*, 1995). As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em placas de 96 poços (microtitier), em um termociclador MJ PTC-100 (MJ Research). As reações de PCR tinham um volume total de 12,5 µl, continham 10 pmol (0.4µM) de cada iniciador (*primer*), 80µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatados, 20 mM Tris-HCl pH 8.8; 2mM Mg SO<sub>4</sub>, 100mM KCl,; 0,1% TritonX-100, 10mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> e 0,2µl de Taq Polimerase *Hot-start* (Quiagen). Os ciclos de temperaturas foram precedidos por incubação de desnaturação de 15 min a 95°. Os ciclos de amplificação foram 30 segundos a 94°C (desnaturação) 30 segundos a X °C (anelamento – onde X é a temperatura específica de cada par de iniciadores, ver Tabela 2.2) e 30 segundos a 72°C (extensão), por 30 ciclos, quando então as amostras eram refrigeradas a 4°C.

Os alelos dos microssatélites foram fracionados por tamanho, em géis de poliacrilamida não desnaturantes contendo uma razão de 19:1 de acrilamida para bis-acrilamida. Os géis foram preparados em tampão TAE 2X concentrado e montados em placas de vidro com 17 cm de largura por 14,5 cm. A Tabela 2.2 mostra as concentrações dos géis para cada par de iniciadores. Os géis foram colocados em cubas verticais contendo TAE 2X e submetidos a um campo elétrico de 70 V por 15 horas. Após a corrida, os géis foram corados com 0.5 µg/mL de brometo de etídeo e fotografados sob luz ultra-violeta em sistema de fotodocumentação digital (Eagle-Eye II). Cada gel incluiu três canaletas com marcadores de 20 pares de base (bp) (GenSura, Laboratórios Inc.) para criar uma grade de tamanho em pares de base, para aumentar a precisão na estimativa dos tamanhos dos alelos amplificados. Alguns indivíduos foram analisados mais de uma vez a fim de se obter uma estimativa da precisão da tipagem dos alelos por tamanho. As imagens digitais dos géis foram analisadas com o programa Intelligent Quantifier (Millipore Corp.). A partir dos tamanhos das bandas observadas e medidas com o programa de análise de géis, foram criadas classes (*bins*) alélicas manualmente, segundo metodologia descrita em Small *et al.*, (1998).

**Tabela 2.2:** Temperaturas de anelamento e concentração dos géis de poliácridamida e seqüências dos iniciadores direto e reverso utilizados para cada *locus*.

<b>Locus</b>	<b>Iniciadores (3'-5')</b>	<b>Temp.</b>	<b>Poliácridamida</b>
OTS 103	AGGCTCTGGGTCCGTG GACATAGCGTTCAGCACAG	47°C	12%
OTS 100	TGAACATGAGCTGTGTGAG ACGGACGTGCCAGTG AG	56°C	8%
OTS 4	GACCCAGAGGACAGCACAA GGAGGACACATTTTCAGCAG	63°C	10%
Omy 77	CGTTCTCTACTGAGTCAT GGGTCTTTAAGGCTTCACTCGA	58°C	10%
Oki 20	TGTCAGTTTCTGTTTCTGTTTCTG GACAGTAGAGAGGATAGAAGTTCA	52°C	8%

### 2.3.4 Análises populacionais e estatísticas

Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram testados para cada população através de teste exato (Guo e Thompson, 1992) com o uso do programa Genepop 3.3 (Raymond e Rousset 1995), sendo os níveis de significância estatística ajustados através de uma correção seqüencial de Bonferroni ( $\alpha$ /número de loci = 0.01) (Rice, 1989), devido ao número elevado de teste de hipóteses simultâneas. Para se avaliar a eficiência da manutenção da variabilidade molecular neutra nos estoques de procriação foi calculada a divergência genética entre pares de populações, utilizando-se valores de  $F_{ST}$  par-a-par, através do estimador de Weir e Cockerham (1984). A significância destes valores foi testada por meio de procedimentos de permutação utilizando-se o programa Arlequin versão 2.000 (Schneider *et al.*, 1997).  $F_{ST}$  é uma medida da variação distribuída entre populações, que reflete o grau de estruturação genética populacional. Complementarmente a essa análise realizamos um teste de diferenciação de freqüências genotípicas entre pares de populações no Genepop. Através do programa Arlequin, também realizamos uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA – Excoffier *et al.*, 1992). Foi calculada a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) a fim de se construir uma árvore de similaridade, pelo método de *Neighbour Joining*, através do consenso de 100 réplicas *bootstrap*, utilizando-se programas do pacote Phylip (Felsenstein, 1989). A árvore resultante foi visualizada por meio do programa TreeView (Page, 1996).

Para se ter uma medida de variabilidade intrapopulacional, o número de alelos (riqueza alélica) encontrado nas populações selvagens e de procriação foram calculados por meio de um estimador *jackknife* (reamostrando-se indivíduos), de forma que um intervalo de confiança de 95% pudesse ser construído e plotado em um gráfico. Isso permite a comparação visual, com confiabilidade estatística, das riquezas alélicas. Para isto, nós empregamos o programa EstimateS (Cowell, 2000), com modificações. Na avaliação da origem da população não-

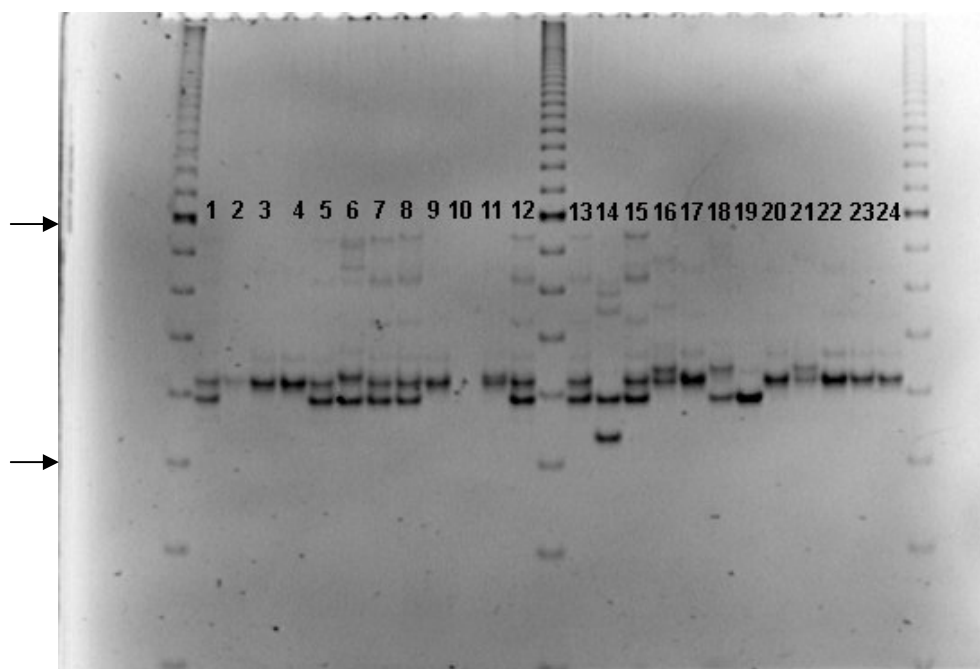


marcada do lago Premier, utilizamos o programa GMA (Genetic Mixture Analysis) de análise de estoques mistos – Kalinowski, (2003).

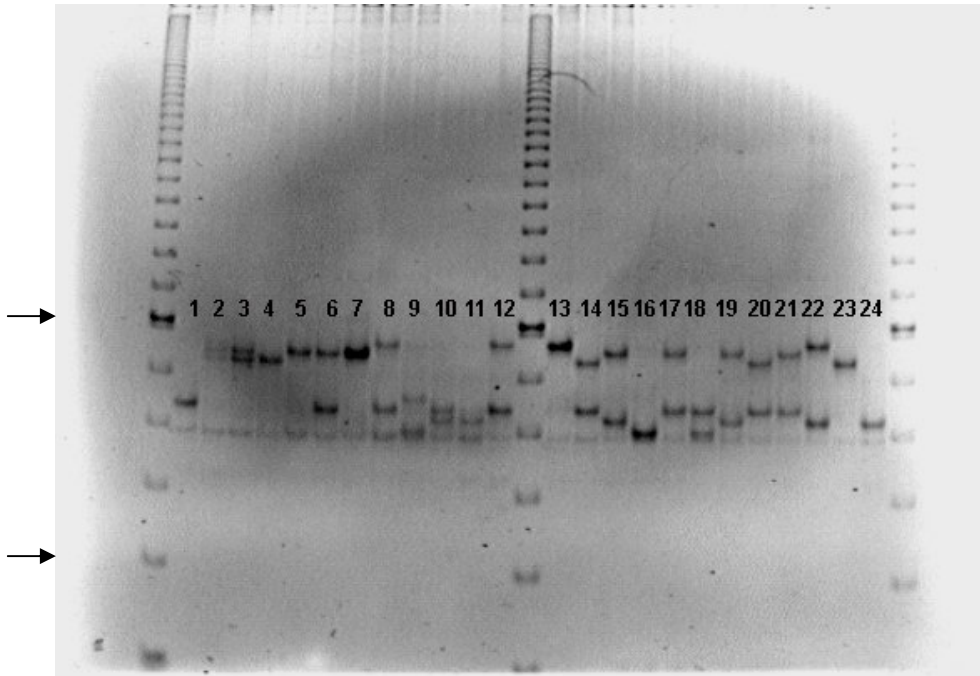
## 2.4 Resultados

### 2.4.1 Amplificações

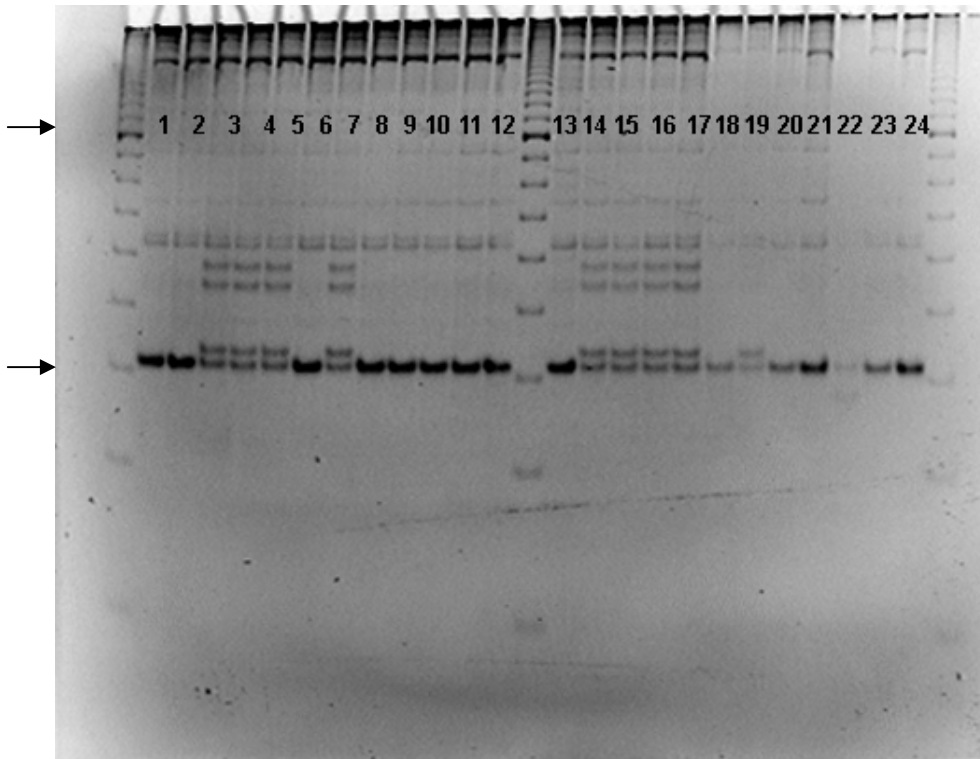
As análises populacionais foram feitas utilizando-se cinco *loci* de microssatélites, OTS 4, OTS 100, OTS 103, Oki 20 e Omy 77. As Figuras 2.6 a 2.10 mostram exemplos de amplificações desses *loci*. Todos *loci* apresentaram polimorfismos em de todas amostras populacionais analisadas. O *locus* com o menor número de alelos observados foi OTS 4, com apenas cinco alelos diferentes dentre quase os 1025 indivíduos genotipados. O *locus* com o maior número de alelos foi Oki 20, com 29 alelos observados. A média observada de número de alelos por *locus* foi 12 ( $dp \pm 9,87$ ). Os fragmentos amplificados ficaram entre cerca de 220pb e 80pb. Todos os *loci* apresentaram um alto grau de sucesso nas amplificações (>95%).



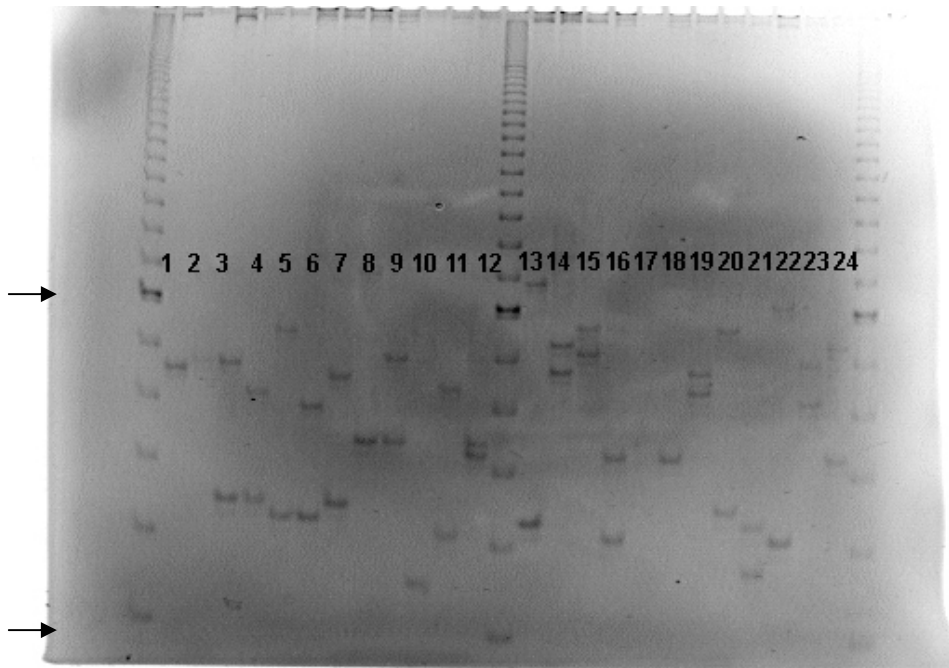
**Figura 2.6:** Exemplo de amplificação no *locus* OTS 4 (canaletas 1 a 24). As canaletas não assinaladas contêm um padrão de 20 pb cada. As setas compreendem a região entre 100 e 200 pb.



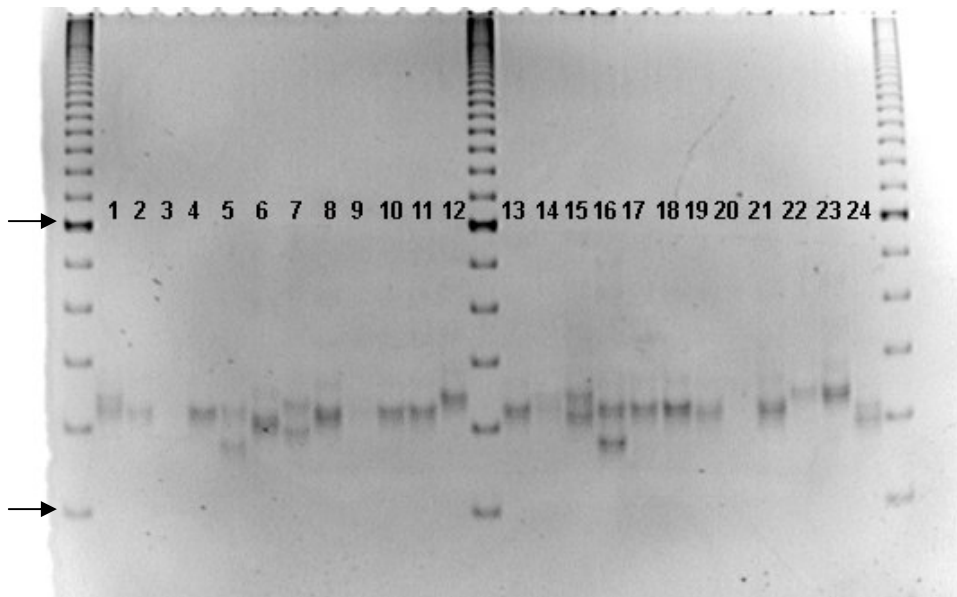
**Figura 2.7:** Exemplo de amplificação no *locus* OTS 100 (canaletas 1 a 24). As canaletas não assinaladas contêm um padrão de 20 pb cada. As setas compreendem a região entre 140 e 200 pb.



**Figura 2.8:** Exemplo de amplificação no *locus* OTS 103 (canaletas 1 a 24). As canaletas não assinaladas contêm um padrão de 20 pb cada. As setas compreendem a região de 80 e 200 pb.



**Figura 2.9:** Exemplo de amplificação no *locus* Oki 20 (canaletas 1 a 24). As canaletas não assinaladas contêm um padrão de 20 pb cada. As setas compreendem a região de 100 e 200 pb.



**Figura 2.10:** Exemplo de amplificação no *locus* Omy 77 (canaletas 1 a 24). As canaletas não assinaladas contêm um padrão de 20 pb cada. As setas compreendem a região de 100 e 200 pb.

#### 2.4.2 Testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

A Tabela 2.3 mostra os resultados para o teste para desvios do EHW. No *locus* Omy 77, oito das 12 amostras populacionais desviaram do equilíbrio ( $p < 0,01$ ;  $\alpha = 0,05/N_{loci}$ ). No *locus* OTS

4, 11 das 12 amostras também não estavam em EHW. Os *loci* OTS 103 e Oki 20 estiveram em EHW no maior número de populações (11 e nove respectivamente).

A população selvagem do rio Blackwater (BI/BIR) foi a única amostra populacional que exibiu EHW consistentemente, entre todos os cinco loci analisados ( $p=0,36$ ). Na população de procriação oriunda de Blackwater no lago Genier (BI/GeL), apenas o locus OTS 4 desviou do EHW ( $p<0,01$ ), sugerindo a ausência de diferenciação entre este par de estoques selvagem e estoque de procriação associado. O *locus* mais polimórfico – Oki 20 – desviou do EHW em apenas três das 12 amostras populacionais (Pr/PrL1, Pr/PrL2 e Pn/PrL2). A primeira amostra dos animais não-marcados capturados no lago Premier (Pr/PrL1) foi a única amostra populacional com apenas 1 *locus* sob EHW, seguido pela segunda amostra de animais não-marcados desse lago (Pr/PrL2) e pela população selvagem do lago Pennask (Pn/PnL), cada uma com apenas dois *loci* sob EHW. De 60 comparações possíveis *locus* x populações, pouco mais da metade (35) seguiam o EHW.

**Tabela 2.3:** Valores exatos de probabilidade de desvios do EHW. Valores em negrito são não-significativos a 1% de probabilidade ( $0,05/N_{loci}$ ), (i.e. não houve desvio do EHW).

População	Oki 20	Omy 77	OTS100	OTS103	OTS4	Todos
Pn/PnL	<b>0,086</b>	0,000	<b>0,723</b>	0,003	0,000	0,000
Pn/BeL	<b>0,626</b>	0,003	<b>0,570</b>	<b>0,293</b>	0,000	0,000
Pn/PrL1	<b>0,038</b>	0,000	0,002	<b>0,718</b>	0,000	0,000
Pn/PrL2	0,000	<b>0,052</b>	<b>0,111</b>	<b>0,665</b>	0,000	0,000
BI/BIR	<b>0,693</b>	<b>0,072</b>	<b>0,290</b>	<b>1</b>	<b>0,286</b>	<b>0,361</b>
BI/GeL	<b>0,498</b>	<b>0,060</b>	<b>0,336</b>	<b>1</b>	0,000	0,002
BI/DgL	<b>0,795</b>	0,000	<b>0,832</b>	<b>1</b>	0,000	0,000
Pr/PrL1	0,001	0,000	<b>0,038</b>	0,000	0,000	0,000
Pr/PrL2	0,000	0,000	<b>0,119</b>	<b>0,422</b>	0,000	0,000
PrSc	<b>0,575</b>	0,000	<b>0,031</b>	<b>0,327</b>	0,000	0,000
Tz/TzL	<b>0,653</b>	<b>0,057</b>	<b>0,562</b>	<b>1</b>	0,000	0,000
Tz/DgL	<b>0,044</b>	0,000	<b>0,324</b>	<b>0,106</b>	0,000	0,000

#### 2.4.3 Número de alelos

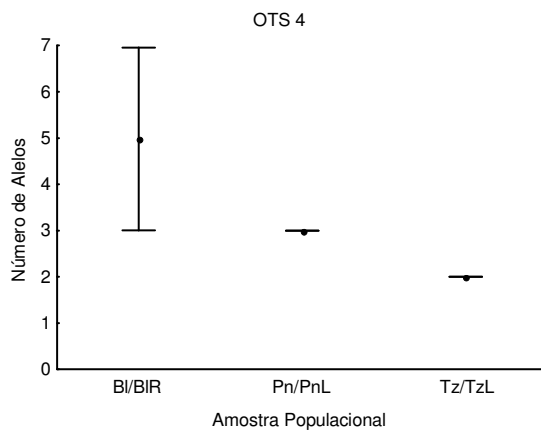
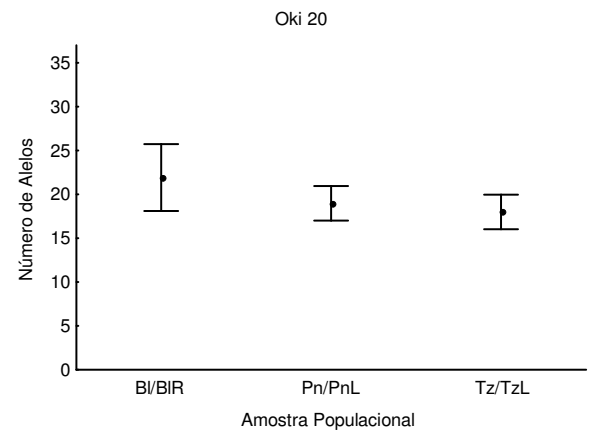
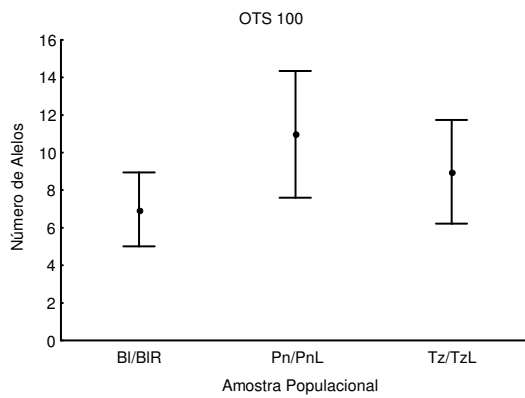
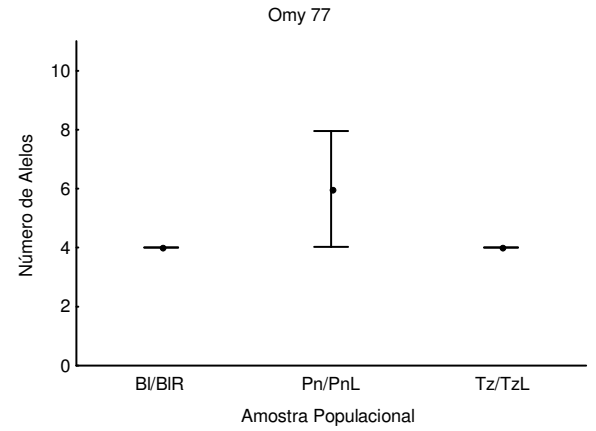
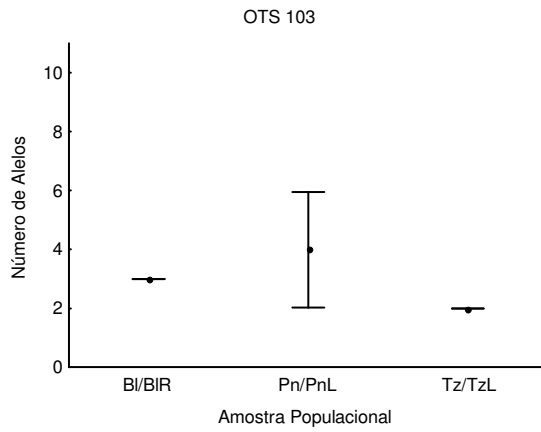
A Tabela 2.4 mostra o número de alelos observados por amostra populacional. A riqueza alélica foi também estimada através do método de reamostragem estatística *jackknife*, descrito no Capítulo 1. Através destes valores e de seus erros padrão associados, foram calculados intervalos de confiança a 95% a probabilidade. Os gráficos resultantes podem ser visualizados nas Figura 2.13 a 2.18 e foram organizados por grupos. Pares de populações onde um dos limites de confiança sobrepõe-se com o valor estimado de riqueza alélica de outra estimativa, indicam ausência de diferença estatística.

No locus Oki 20, o grupo Blackwater (BI/BIR, BI/GeL e BI/DgL), o grupo Tzenzaicut (Tz/TzL e Tz/DgL) e o grupo Premier (amostras não-marcadas) mostraram o mesmo número de alelos. A mesma tendência foi encontrada para o grupo Tzenzaicut no locus Omy 77. Em alguns casos, a amostra da população selvagem fonte pode exibir um número menor de alelos do que as populações procriadoras associadas, como no grupo Pennask (Pn/PnL, Pn/BeL, Pn/PrL1 e Pn/PrL2) no locus Oki 20, o grupo Blackwater nos loci Omy 77 e OTS 100 e o grupo Tzenzaicut nos loci OTS 4 e OTS 103. E, finalmente, em alguns casos, a amostra populacional selvagem tem um número igual ou maior de alelos do que as populações procriadoras relacionadas (como o par do grupo Tzenzaicut no *locus* OTS 100 ou o grupo Blackwater no *locus* OTS 103).

**Tabela 2.4:** Número de alelos observados em cada locus para todas amostras populacionais (riqueza alélica absoluta)

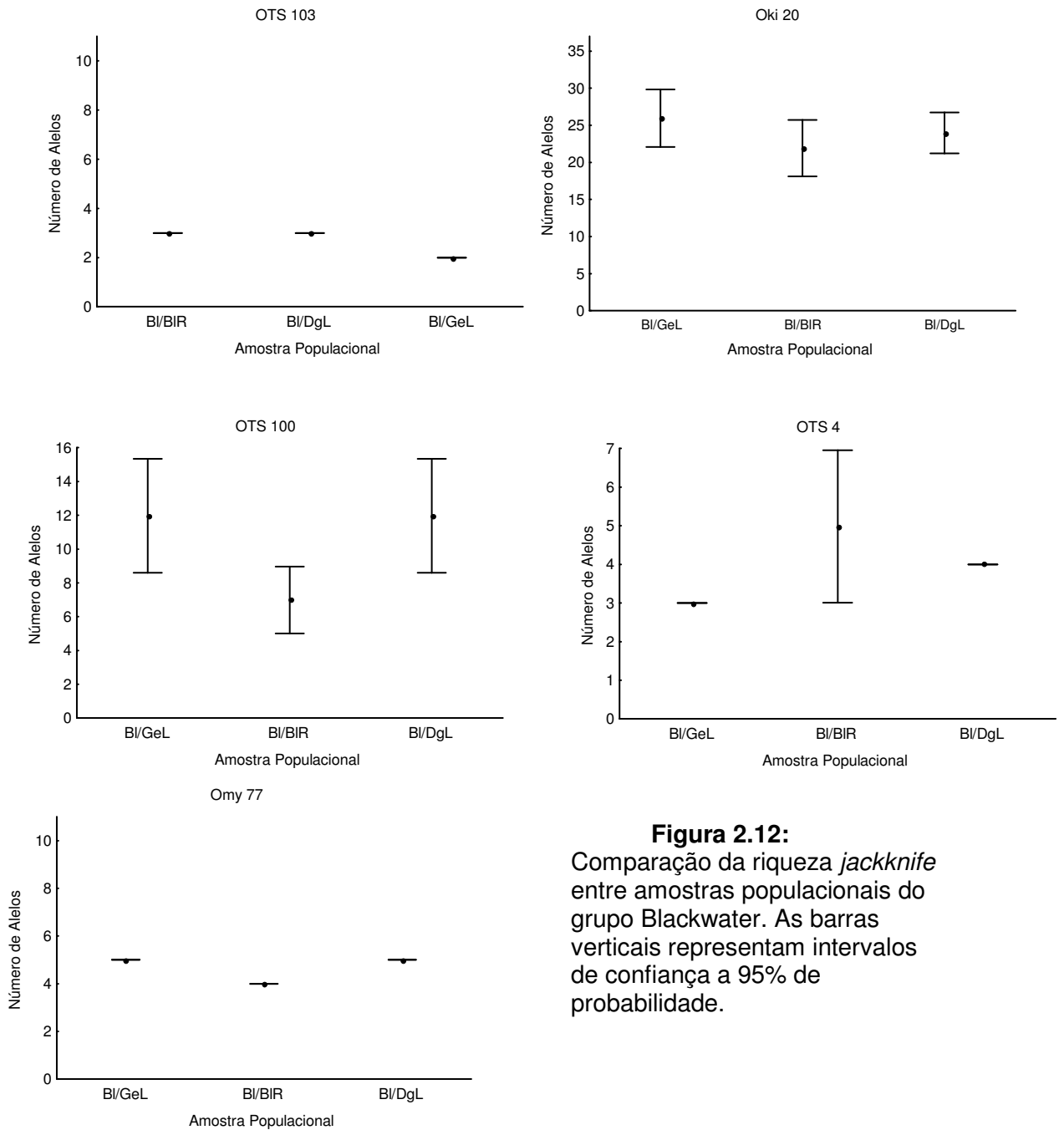
<b>Amostra</b>	<b>Oki 20</b>	<b>Omy 77</b>	<b>Ots100</b>	<b>Ots103</b>	<b>Ots4</b>
Pn/PnL	18	5	8	3	3
Pn/BeL	26	6	7	2	4
Pn/PrL1	24	6	8	3	3
Pn/PrL2	24	4	7	3	3
BI/BIR	18	4	6	3	4
BI/GeL	22	5	10	2	3
BI/DgL	22	5	9	3	4
Pr/PrL1	23	8	8	4	4
Pr/PrL2	20	8	9	3	4
PrSc	21	7	10	4	4
Tz/TzL	17	4	7	2	2
Tz/DgL	16	4	6	6	3
<b>Total</b>	<b>29</b>	<b>8</b>	<b>12</b>	<b>6</b>	<b>5</b>

Grupo Selvagem



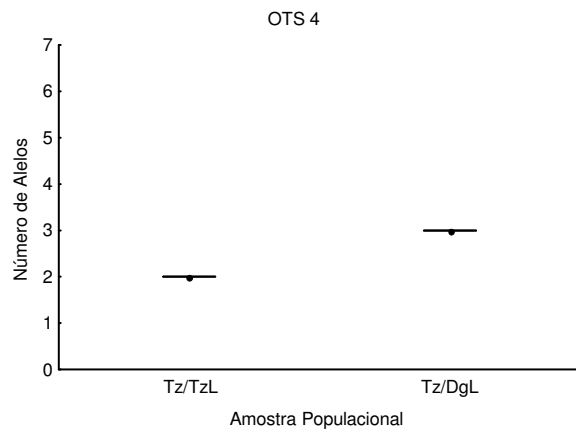
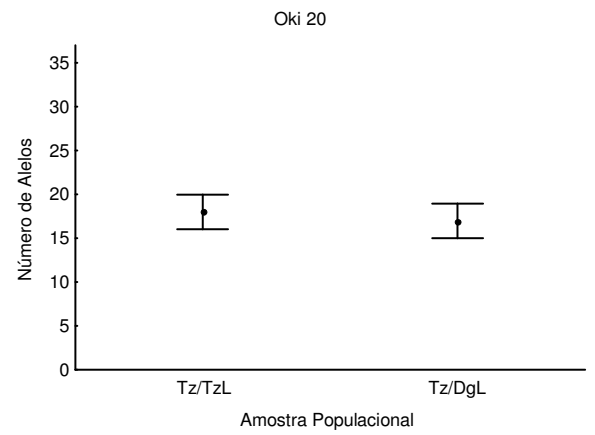
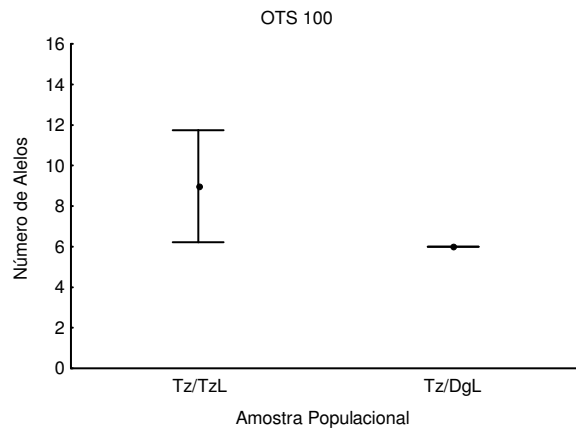
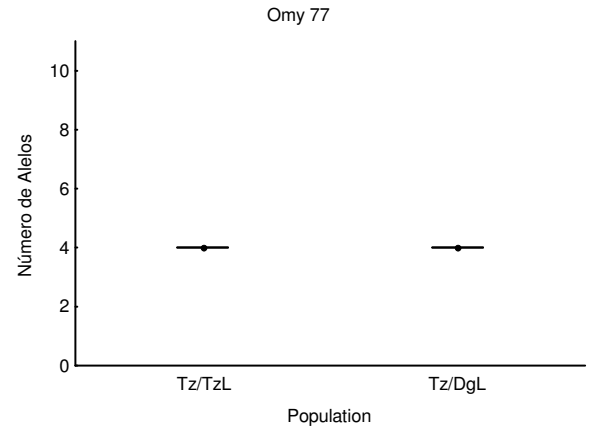
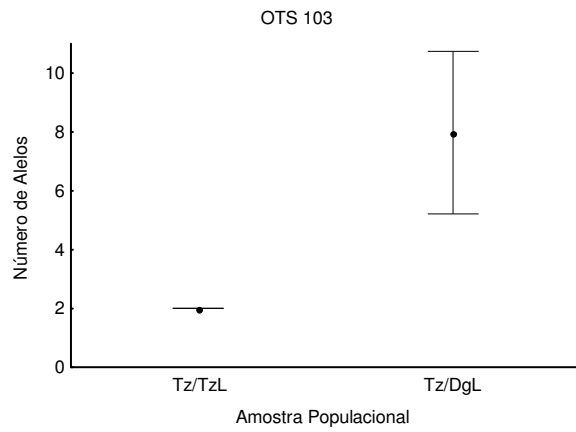
**Figura 2.11:** Comparação da riqueza *jackknife* entre amostras populacionais do grupo de fontes selvagens. As barras verticais representam intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

## Grupo Blackwater



**Figura 2.12:** Comparação da riqueza *jackknife* entre amostras populacionais do grupo Blackwater. As barras verticais representam intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

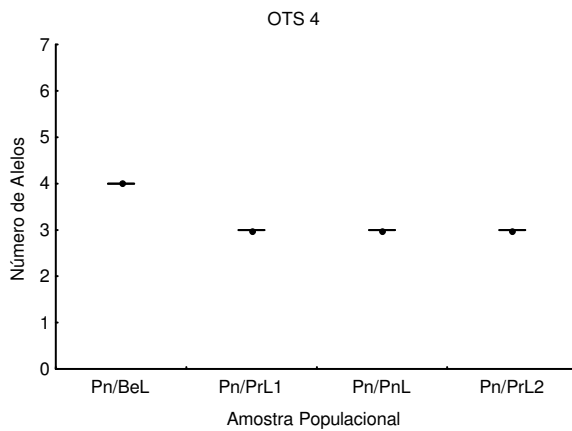
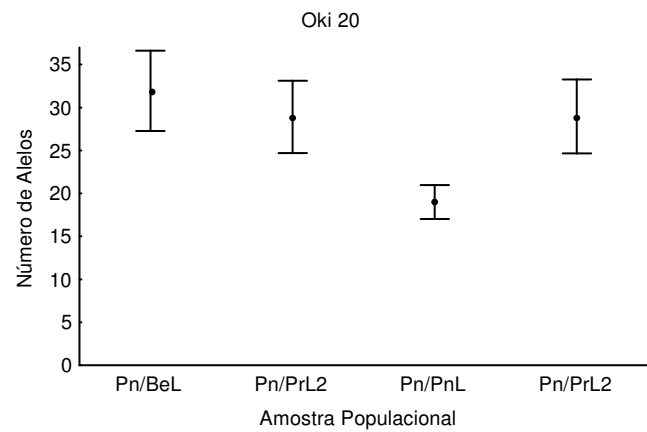
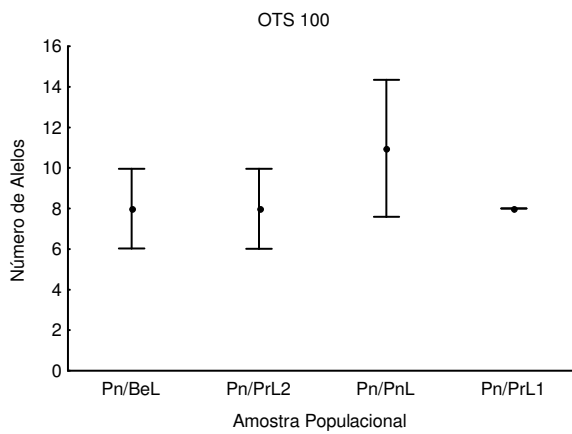
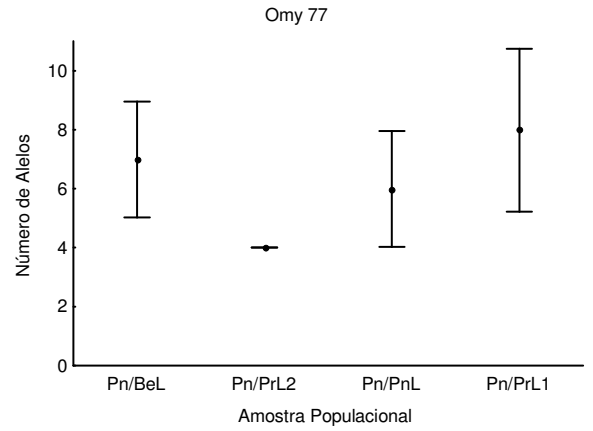
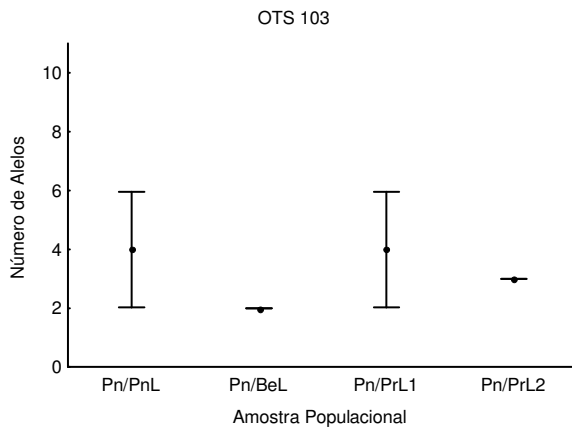
## Grupo Tzenzaicut



**Figura 2.13:**  
 Comparação da riqueza *jackknife* entre amostras populacionais do grupo Tzenzaicut. As barras verticais representam intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

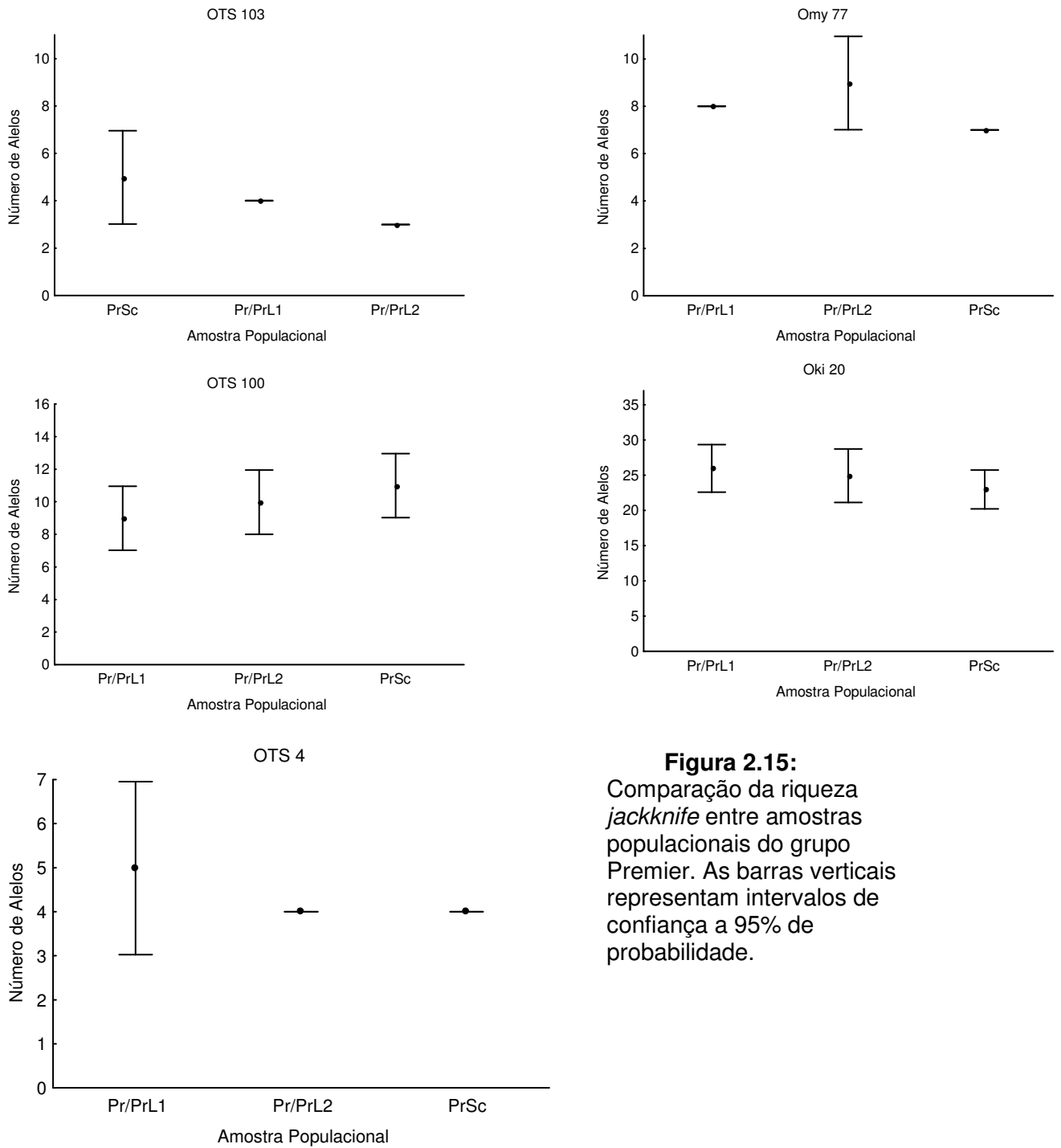


### Grupo Pennask



**Figura 2.14:** Comparação da riqueza *jackknife* entre amostras populacionais do grupo Pennask. As barras verticais representam intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

## Grupo Premier



**Figura 2.15:** Comparação da riqueza *jackknife* entre amostras populacionais do grupo Premier. As barras verticais representam intervalos de confiança a 95% de probabilidade.

#### 2.4.4 Diferenciação e estrutura populacional

A diferença entre a amostra selvagem e os lagos de procriação relacionados foram comparados pelo estimador  $F_{ST}$  de Weir e Cockerham. Foi observada diferenciação genética significativa, entre a maioria dos pares de populações ( $p < 0.05$ ), incluindo em comparações entre lagos de procriação e suas populações de origem (Tabela 2.5). Valores de  $F_{ST}$  não-significativos (ausência de estrutura) foram observados entre a população selvagem do lago Pennask (Pn/PnL) e seu estoque procriador no lago Beaver (Pn/BeL) -  $p = 0,124$  - entre aquela e a primeira amostra de procriadores de Pennask no lago Premier (Pn/PrL1) -  $p = 0,664$ ; e entre as duas últimas entre si (Pn/BeL vs Pn/PrL1 -  $p = 0,15$ ). O par da população do rio Blackwater (BI/BIr) e seu estoque procriador no lago Genier (BI/GeL), também teve seu valor de  $F_{ST}$  não-significativo ( $p = 0,022$ ). Esses resultados mostram que, aparentemente, o programa provincial consegue manter as características genético-populacionais da população selvagem em alguns lagos de procriação. Porém, na maioria dos casos, os estoques procriadores exibem, desde uma pequena diferenciação genética com sua população originária (2,8% entre a população selvagem do rio Blackwater - BI/BIr - e o estoque procriador de Blackwater no lago Dragon - BI/DgL) até um valor moderado, entre a população selvagem de Pennask (Pn/PnL) e a segunda amostra populacional do seu estoque procriador no lago Premier (Pn/PrL2), na ordem de 10,3% de diferenciação. Considerando os grupos de pares de linhagens selvagens e lagos de procriação isoladamente temos os seguintes valores de  $F_{ST}$ : Grupo selvagem,  $F_{ST} = 0,126$ ; Grupo Blackwater,  $F_{ST} = 0,014$ ; Grupo Tzenzaicut,  $F_{ST} = 0,056$ ; Grupo Pennask,  $F_{ST} = 0,035$  e Grupo Premier (peixes não-marcados),  $F_{ST} = 0,024$ .

Foram realizados testes de diferenciação de frequências genotípicas entre pares de amostras populacionais no Genepop. Esse teste não depende de pressupostos de EHW nas amostras e foi também realizado para cada *locus* separadamente. Todos pares de populações exibiram diferenciação significativa na combinação de todos o *loci* (resultados não mostrados), exceto entre os dois estoques de procriação oriundos do lago Pennask (Pn/PrL1 e Pn/BeL,  $p = 0,11$ ) e entre Pn/PrL1 e a população selvagem fonte (Pn/PnL) -  $p = 0,54$ . Porém, quando analisados locus por locus, vários pares de estoques procriadores e suas populações originárias mostram uma não diferenciação genotípica. Por exemplo, o *locus* mais polimórfico, Oki 20 (portanto, aquele que possui o maior número de classes genotípicas) aponta para uma conservação (não-diferenciação) das frequências genotípicas entre os seguintes pares: BI/DgL vs. BI/GeL ( $p = 0,048$ ); Pn/PrL1 vs. Pn/PnL ( $p = 0,30$ ); Pn/BeL vs. Pn/PrL1 ( $p = 0,68$ ); Pn/PrL2 vs. Pn/BeL ( $p = 0,26$ ); Pr/PrL2 vs. Pn/PrL2 ( $p = 0,21$ ) e PrSc vs. Pr/PrL1 ( $p = 0,13$ ). Estes resultados não só apontam para as mesmas conclusões alcançadas

com os valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações, mas também confirmam as semelhanças entre os peixes não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2) e os animais marcados de Pennask nos lagos Beaver (Pn/BeL) e Premier (Pn/PrL2).

Uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada sobre as diferenças entre pares de populações, organizando-se populações selvagens e de estoques de procriação relacionados em grupos (Tabela 2.6). A análise indica que 9,78% da variação genética total está alocada entre populações ( $F_{ST}$  geral). Esse valor tem alta significância estatística ( $p < 0,0001$ ). Ele indica que a grande maioria da variabilidade é devida a diferenças de indivíduos dentro de populações. Dessa variação entre populações, 6,94% da variação é devida a diferenças entre grupos de populações e apenas 2,84% é devida a diferenças entre populações dentro de grupos..

**Tabela 2.5:** Valores de  $F_{st}$  entre pares de populações. Valores em negrito são não significativos a 5% de probabilidade e indicam ausência de estruturação no par de populações

	<b>Pn/PnL</b>	<b>BI/BIR</b>	<b>BI/GeL</b>	<b>BI/DgL</b>	<b>Pn/PrL1</b>	<b>Pr/PrL1</b>	<b>Pn/BeL</b>	<b>Tz/DgL</b>	<b>PrSc</b>	<b>Tz/TzL</b>	<b>Pn/PrL2</b>	<b>Pr/PrL2</b>
<b>Pn/PnL</b>	-											
<b>BI/BIR</b>	0.128	-										
<b>BI/GeL</b>	0.115	<b>0.009<sup>ns</sup></b>	-									
<b>BI/DgL</b>	0.119	0.028	0.010	-								
<b>Pn/PrL1</b>	<b>0.004<sup>ns</sup></b>	0.128	0.107	0.107	-							
<b>Pr/PrL1</b>	0.095	0.093	0.069	0.043	0.075	-						
<b>Pn/BeL</b>	<b>0.003<sup>ns</sup></b>	0.099	0.085	0.085	<b>0.003<sup>ns</sup></b>	0.060	-					
<b>Tz/DgL</b>	0.155	0.084	0.094	0.110	0.156	0.135	0.129	-				
<b>PrSc</b>	0.085	0.074	0.059	0.033	0.071	0.012	0.053	0.117	-			
<b>Tz/TzL</b>	0.139	0.088	0.073	0.097	0.128	0.113	0.106	0.056	0.102	-		
<b>Pn/PrL2</b>	0.103	0.114	0.098	0.074	0.103	0.103	0.082	0.178	0.073	0.211	-	
<b>Pr/PrL2</b>	0.105	0.088	0.068	0.034	0.092	0.049	0.073	0.154	0.023	0.161	0.019	-

**Tabela 2.6:** Análise de Variância Molecular – AMOVA. Todas estimativas são altamente significativas. Os grupos de populações foram definidos da seguinte forma: Pennask (Pn/PnL, Pn/BeL, Pn/PrL1 e Pn/PrL2); Blackwater – (Bl/BIR, Bl/GrL e Bl/DgL); Tzenzaicut – (Tz/TzL e Tz/DgL) e Premier (PrS, Pr/PrL1, e Pr/PrL2).

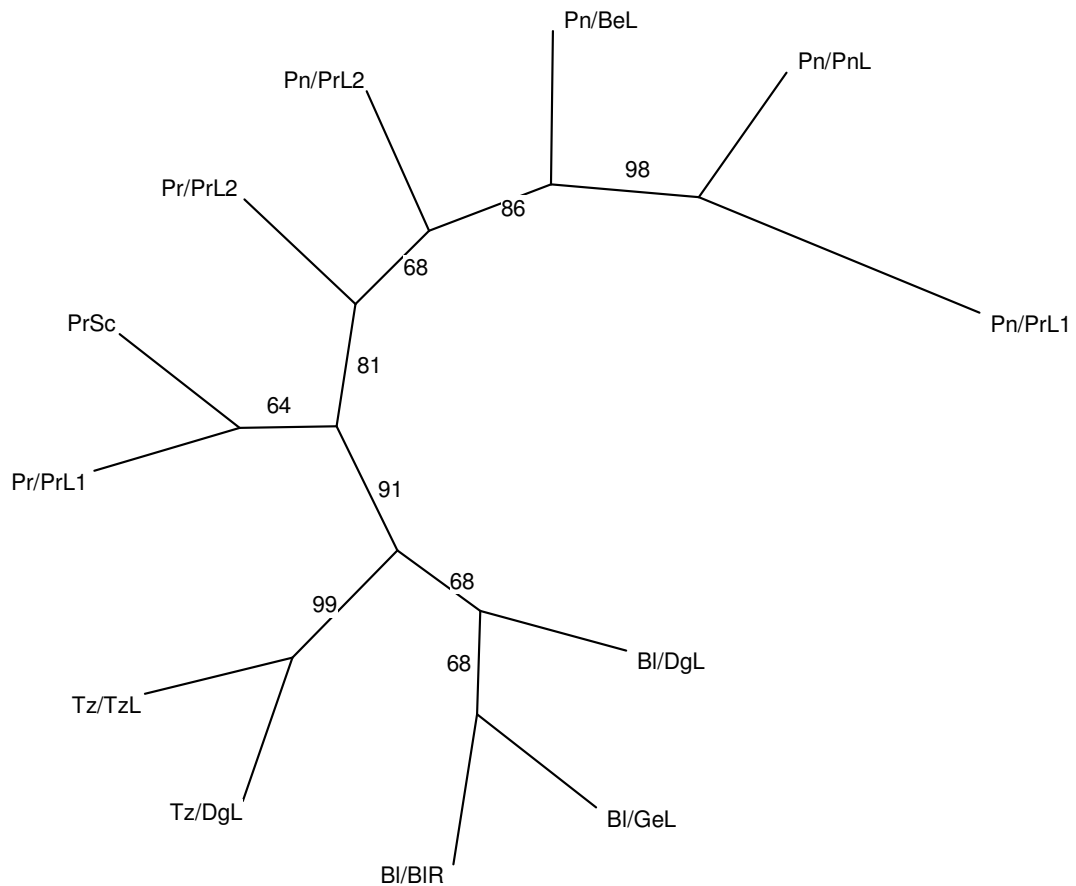
Fonte de variação	g.l.	Soma de quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	3	201,12	0,1138	6,94
Entre populações dentro de grupos	8	72,97	0,0465	2,84
Dentro de populações	2030	3001,72	1,48234	90,22
<b>Total</b>	<b>2041</b>	<b>2375,81</b>	<b>1,63</b>	

$F_{ST}$ : 0,0978  $p < 0,0001$

Uma árvore de similaridade foi construída a partir da distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards (1967), por meio de metodologia de *neighbour joining*. A árvore resultante obteve um bom suporte estatístico (todos valores *bootstrap* acima de 60%) e pode ser visualizada na Figura 2.16. A árvore claramente reflete os arranjos esperados de grupos de populações selvagens fonte e estoques de procriação associados. A única exceção é a última amostragem de peixes não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2), que se encontra entre os ramos que formam os grupos Pennask e Premier. Esse resultado sugere que os peixes não marcados podem estar recebendo genes do estoque de peixes Pennask criados no lago Premier.

#### 4.5 Análise de Estoque misto

Para confirmar a hipótese de introgressão nos peixes não-marcados realizamos uma análise genética de estoques mistos com o programa GMA (Kalinowski, 2003) com o método Bayesiano de Rannala and Mountain (1997, equação 9).



**Figura 2.16:** Árvore *neighbour joining* de similaridade utilizando-se a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards.

Nesse programa utilizamos as populações do grupo Pennask e do grupo Premier (as amostras históricas e a primeira amostragem de animais não-marcados – Pr/PrL1) como base de referência e a população mais recente de animais não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2) como sendo o suposto estoque misto. Foram feitas análises de estimativa de proporções de populações contribuindo para a formação do estoque misto, segundo procedimento descrito em Ranalla e Moutain, (1997), onde os indivíduos do suposto estoque misto (Pr/PrL2) são verificados quanto às chances de origem a partir das populações de referência. A análise de mistura atribuiu aos animais não-marcados coletados recentemente no lago Premier (Pr/PrL2) uma composição de quase 46% dos indivíduos como tendo origem a partir da amostra histórica do lago Premier (PrSc), quase 40% de indivíduos recentes marcados de Pennask no lago Premier (Pn/PrL2) e cerca de 15% de animais oriundos da população de Pennask no lago

Beaver (Pn/BeL). Essa mesma análise foi realizada com os primeiros animais não-marcados de Premier (Pr/PrL1) sendo considerado o estoque misto, e os resultados apontam para uma constituição quase que exclusiva (98,5%) de origem da amostra histórica deste lago (PrSc).

## 2.5 - Discussão

### 2.5.1 - Amostras populacionais, loci e EHW

Cinco *loci* de microssatélites foram empregados nas análises genético-populacionais propostas nesse trabalho, quatro do tipo tetranucleotídeos e um dinucleotídeo. Nos mais de 1000 indivíduos submetidos à PCR com cada um desses marcadores foram encontrados de 5 a 29 alelos por *locus*, com média de 12, compreendendo fragmentos de DNA entre 80 e 220 pb. Os resultados foram obtidos através de binagem manual (Small *et al.*, 1988). Esse procedimento, quando realizado com critério, se mostra muito eficiente e erros de tipagem se tornam mais freqüentes em classes de dinucleotídeos. Com o advento do seqüenciamento automático e o uso de biotinizados para tipagem genética de microssatélites, no entanto, a necessidade de automação para a binagem precisa de fragmentos amplificados adquiriu maior importância. Erros nesses processos podem comprometer a qualidade do resultado de formação de classes alélicas e nas estimativas, afetando as estimativas populacionais subsequentes (Amos *et al.*, 2007 – ver discussão no item 1.6.2.4). A tendência para organismos intensamente estudados como peixes, particularmente salmonídeos, é de que seja acumulada uma quantidade tal de tamanhos de alelos para compor um imenso banco de dados para *loci* ortólogos de espécies próximas, que podem ser utilizados nos processos de automação de binagem. Isso já se encontra em prática em alguns marcadores microssatélites comumente utilizados em investigações de paternidade humana, por exemplo.

Os resultados dos testes de EHW revelaram um grande número de amostras populacionais/*loci* fora do EHW. Vários fatores podem levar a esse resultado, como por exemplo heterogeneidade (subestrutura) dentro da amostra. Dentre as três amostras selvagens apenas os peixes do rio Blackwater exibiram EHW consistentemente através dos cinco *loci* analisados ( $p=0.36$ ). Os indivíduos do lago Tzenzaicut apresentaram desvio apenas em um *locus*, OTS 4, que é o que explica o desvio global sobre todos *loci* nessa população. Apenas a amostra originária do lago Pennask desviou na maioria dos *loci* (Omy 77, OTS 103 e OTS 4).

Das três amostras de populações selvagens, Blackwater (Bl/BIR) tem o menor tamanho amostral ( $N=48$ ). Dado o polimorfismo desses marcadores, pode-se excluir o tamanho amostral como causa desses desvios observados (Kalinowski, 2002; 2004). Podemos assumir, para fins de argumentação, que a população do lago Tzenzaicut está de fato em EHW e que o desvio



observado, devido ao *locus* OTS 4, na verdade reflete algum fator ou mesmo problema intrínseco desse marcador (ex.: alelo nulo segregando, seleção). OTS 4 desviou em todas amostras populacionais, exceto uma. Já a população de Pennask, que é onde tradicionalmente acontece uma das maiores subidas de cardumes de salmões e trutas (a cada primavera mais de 20.000 indivíduos de truta passam pelo lago – dados da FFSSBC), pode de certa forma estar sub-representada na amostra populacional Pn/PnL, ou ainda exibir sub-estrutura genética interna, devido à possível captura de peixes de cardumes de rios interiores distintos. Isso por que as coletas nesse lago acontecem na foz de um tributário do rio, que proporciona um verdadeiro gargalo por onde os peixes devem passar a fim de continuar sua rota migratória até o seu destino final. Dependendo do nível de estruturação genética populacional proporcionada pelo grau de ramificação desse tributário a jusante, diversas populações próximas, porém distintas, poderiam estar sendo amostradas na cerca da saída do lago Pennask. Esse padrão de uma pequena porém significativa estruturação em função da disposição microgeográfica de leitos de rios próximos foi observado para *O. mykiss* por Small *et al.*, (2007).

Dentre os lagos de procriação apenas a população de procriação da linhagem Blackwater no lago Genier (Bl/GeL) teve todos *loci*, exceto OTS 4, em EHW. As demais amostras todas tinham dois ou mais *loci* com frequências genotípicas fora do esperado dentro do equilíbrio. Isso é parcialmente consistente com o fato de que lagos de procriação estão constantemente recebendo novos indivíduos. A mistura de diferentes grupos etários pode ser uma explicação. Resultados semelhantes foram encontrados em Small *et al.*, (2007) e a mistura populacional foi invocada por Winams *et al.*, (2004) para explicar os poucos desvios do EHW encontrados em sua amostra de *O. mykiss* analisada com microsatélites e outros genes nucleares (no caso, mistura de populações semi-isoladas ao serem capturados na descida comum aos tributários).

### **2.5.2 – Riqueza alélica e sistemas de formação de estoques reprodutores**

O estimador *jackknife* de riqueza alélica nos permite mensurar os efeitos do viés estatístico causado por alelos raros na amostra. Portanto o estimador é útil para incorporar a importância de alelos raros e/ou alelos privados no resultado da estimativa de riqueza alélica. Na prática, ele pode sugerir a existência de alelos não amostrados em uma população. Por exemplo, no locus Oki 20, a população de peixes de Pennask no lago Beaver (Pn/BeL) exibe 26 alelos distintos (veja Tabela 2.5). Porém, como nesse locus há muitos alelos em baixa frequência, a estimativa *jackknife* aponta para a existência de 32 alelos ou mais (Figura 2.14)

nessa mesma população, ou seja, seis a mais do que o número de alelos observado. A raridade de alelos também influencia a amplitude do erro padrão e, portanto, dos intervalos de confiança.

Resultados diversos foram encontrados nas análises de comparação do número de alelos dentro de grupos de populações selvagens e de procriação. As amostras selvagens e suas respectivas amostras de lagos de procriação podem: i) exibir o mesmo número de alelos (*e.g.* grupos Blackwater, Tzenzaicut e Premier no locus Oki 20 e Tzenzaicut no locus Omy 77); ii) as fontes selvagens podem exibir um número menor de alelos do que os estoques de procriação associados (grupo Pennask no locus Oki 20; grupo Blackwater nos loci Omy 77 e OTS 100; grupo Tzenzaicut nos loci OTS 4 e OTS 103) ou, iii) menos freqüentemente, a fonte selvagem pode possuir um número maior de alelos do que os estoques procriadores (grupo Tzenzaicut no locus OTS 100). No primeiro caso (i), as populações utilizadas para a fundação dos estoques procriadores são bem representativas da variabilidade genética selvagem. Esse é um bom resultado em termos de sucesso na manutenção da variabilidade genética nos estoques utilizados para procriação, uma vez que o processo de fundação de plantel procriador, a partir da população selvagem, envolve a possibilidade de erro de amostragem (efeito fundador) e conseqüente sub-representação da riqueza alélica (Taniguchi, 2003; Allendorf e Luikart, 2007 p126).

No segundo cenário (ii), a população selvagem exibe um número de alelos inferior ao da população residente no lago de procriação. Esse resultado, a primeira vista contraditório (teoricamente espera-se maior diversidade na população selvagem do que na de procriação), parece ter explicação no desenho amostral e na natureza das operações da manutenção dos lagos de procriação: como a cada dois ou três anos há a introdução de novos indivíduos oriundos da população selvagem, a amostra populacional dos lagos de procriação podem estar mais bem representadas em relação ao total da variabilidade genética existente nas populações naturais, do que a amostra realizada diretamente nas populações selvagens. Isso aconteceria porque a coleta de material para análise de DNA amostrado nas populações selvagens é feita de forma pontual (único local físico e em um espaço de tempo bem limitado, apenas o suficiente para amostra-se de cerca de 50 até 100 indivíduos).

Diferentemente, as amostras populacionais dos lagos de procriação são constituídas por classes de idades variadas que compreendem diferentes gerações (dois a cinco anos), coletadas em eventos distintos e, as vezes, até mesmo em locais diferentes na fonte selvagem (não é o caso para o rio Blackwater onde as amostras sempre são tiradas do mesmo local de acesso – Tim Yesaki, comunicação pessoal). Dada a grande variabilidade nos microsatélites e a presença de alguns alelos raros, a riqueza alélica é eventualmente melhor representada na

amostra das populações de procriação. Um efeito análogo ao da curva de acumulação de espécies biológicas (curva do coletor) discutidas no capítulo 1 (Kalinowski, 2004). Portanto, a prática de constante adição de novos indivíduos do *pool* original da linhagem leva a uma amostragem mais representativa, do que uma única visita à população selvagem para coleta visando a formação do plantel. Esse resultado é de grande importância para a genética da conservação de práticas de formação de plantéis *ex-situ* em lagos de procriação ou pisciculturas de salmonídeos.

### 2.5.3 – Diferenciação genética e estrutura populacional

Na comparação par-a-par de todas 12 amostras populacionais, os valores de  $F_{ST}$  variaram de 0,003 até 0,156 (Tabela 2.7). O valor global sobre todas amostras populacionais foi de 0,098. Quando analisados exclusivamente dentro de grupos de populações selvagens e seus respectivos estoques procriadores, os valores de  $F_{ST}$  estiveram entre 0,012 e 0,056. Dentro do grupo formado apenas pelas três fontes selvagens, o  $F_{ST}$  foi de 0,126. Essa diferenciação é considerável e deve ser reflexo das diferenças neutras acumuladas por essas três linhagens. Acredita-se que essas formas de truta estão isoladas desde o fim do último período glacial (McCusker, 1994, 2000).

As diferenças genéticas acumuladas entre populações nessas seqüências repetitivas devem ser em sua maior parte explicadas por diferenças geradas pela dinâmica de surgimento de novas classes de alelos (ou alelos homoplásicos, idênticos por estado, mas não por descendência) por mutação e pela perda e alteração radical de suas freqüências alélicas por deriva genética.

As diferenças adaptativas de cada linhagem ao seu ambiente característico (Pennask: ambientes sem outros salmonídeos; Blackwater: ambientes com ictiofauna diversificada e Tzenzaicut: temperaturas baixas), podem provavelmente também explicar uma pequena parte das diferenças genéticas encontradas nesses marcadores (cujo modo principal de evolução, teoricamente, independe de seleção natural), uma vez que esses marcadores neutros podem, até certo ponto, refletir divergência adaptativa (Wood e Miller, 2006; Willi *et al.*, 2007). Essas diferenças de características ecológicas e comportamentais são levadas em conta no manejo da prole da população de procriação, utilizada nos peixamentos dos mais diversos tipos de lagos para a pesca esportiva na província. A manutenção da integridade genética dessas linhagens e de suas adaptações locais é de extrema importância para a conservação de parte da variabilidade interpopulacional existente nessa espécie (McCusker, 1994), que ainda conta

com um mosaico de subespécies na sua distribuição ao sul e ao noroeste da Columbia Britânica.

No entanto, de forma geral, os valores de  $F_{ST}$  entre pares de populações formados por estoques procriadores e suas fontes selvagens foram consideravelmente mais baixos do que de pares não relacionados e do que o nível de divergência observado dentro do grupo de amostras de populações naturais (Bl/BIR, Pn/PnL e Tz/TzL). Considerando-se todos pares possíveis (ignorando o arranjo hierárquico de grupos), os valores significativos de  $F_{ST}$  entre pares variaram de entre 0,028 (Bl/BIR vs Bl/DgL) até 0,161 (Tz/TzL vs Pr/PrL2). Para a facilitação do entendimento da discussão a seguir é preciso ter em mente o diagrama da Figura 2.5 e os códigos da Tabela 2.3.

O grupo Pennask não exibiu diferenciação genética entre o conjunto de amostras selvagens (Pn/PnL), o estoque no lago Beaver (Pn/BeL) e a primeira amostra dessa linhagem no lago Premier (Pn/PrL1). Os resultados dos três pares possíveis não são significativos e indicam total identidade genética entre essas populações. Os testes de diferenciações genotípicas também não apontou diferenciação significativa entre os loci nesse conjunto de amostras populacionais. No entanto, nesse grupo, onde foi feita uma amostragem complementar separada por quatro anos, houve uma diferenciação estatisticamente significativa e geneticamente considerável (aproximadamente 10% de fixação entre o estoque selvagem e da primeira amostragem dessa linhagem em Premier (Pn/PrL1). Ainda que uma quantidade de deriva seja esperada com o passar de algumas poucas gerações de reprodução (Wang e Ryman, 2001), considero esse valor muito elevado em relação às demais comparações dentro de grupos.

Em relação à comparação dentro do grupo de peixes não-marcados do lago Premier, que também contam com duas amostragens temporalmente distintas, houve praticamente o dobro de diferenciação em um tempo menor (considerando-se as escamas de 1987 como fonte “selvagem” das duas amostras posteriores). Dentro do grupo não-marcado do lago Premier, a amostra histórica de escamas coletadas em 1987 (PrSc) e a primeira amostragem de peixes não-marcados (Pr/PrL1), mostraram uma baixa diferenciação genética ( $F_{ST} = 0,012$ ). Porém, tanto a amostra histórica, quanto a segunda amostragem de peixes não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2) se mostraram mais diferenciadas da primeira amostra de peixes não-marcados (Pr/PrL1) –  $F_{ST} = 0,023$  e  $0,049$  respectivamente).

Uma possibilidade é que os animais marcados do programa provincial, da linhagem Pennask, vivendo no lago Premier estejam promovendo introgressão genética, contribuindo de

alguma forma para reprodução do estoque residente não-marcado. O contrário (*i.e.* peixes não-marcados influenciando geneticamente na linhagem Pennask no lago Premier), aparentemente é impossível, uma vez que apenas peixes marcados são capturados para a fundação de estoques de peixamento. A possibilidade de “contaminação” depende do rigor dos procedimentos no ato da coleta de sêmen e óvulos dos peixes marcados no lago de procriação, que parece contar com estrutura e sistematicidade operacional seguras desse ponto de vista.

O grupo Blackwater também não mostrou diferenciação genética entre um de seus lagos de procriação (Bl/GeL.) O par formado pela amostra selvagem e a linhagem Blackwater do lago Dragon (Bl/DgL) teve  $F_{ST}=0,028$ . Essa diferenciação deve ser atribuída a um efeito de deriva genética ou mistura, talvez um aumento de variação etária e/ou potenciais sub-linhagens nas amostras do lago de procriação. O grupo Tzenzaicut mostrou uma diferenciação de 0,056 entre amostra selvagem e linhagem Blackwater no lago Dragon. Portanto, a diferenciação entre pares de populações selvagens e seus respectivos estoques de procriação pode ser considerada baixa no conjunto de amostras originais realizadas nos lagos de procriação em 1999.

O elevado grau de divergência entre os peixes Pennask do lago Premier amostrados em 2003 e a amostra selvagem de 1999 chama a atenção para uma melhor compreensão de sua real causa, uma vez que a diferenciação excessiva do estoque procriador do estoque selvagem pode levar à perda de variabilidade genética adaptativamente importante, subjacente às características próprias dessa linhagem. *O. mykiss* oriundos de Pennask são preferencialmente usadas em lagos isolados, incapazes de manter populações viáveis sem o auxílio do programa de peixamento, mas que abrigam uma rica fauna de invertebrados onde peixes Pennask conseguem se desenvolver e atingir seus maiores tamanhos. Na presença de outros competidores salmonídeos, esses peixes tendem a desenvolver tamanhos corporais menores (FFSBC, 2004), que nesse caso pode implicar em decréscimo do valor adaptativo para os indivíduos (Hendry e Day, 2005; McLean *et al.*, 2005), ainda que McLean *et al.*, (2004) não tenha encontrado essa relação no monitoramento de diversas características adaptativamente importantes na forma anádroma de *O. mykiss*.

Os resultados dos testes de diferenciação genotípica também demonstraram que em vários *loci* não houve diferenciação entre as populações, mostrando que, até certo ponto, o programa de procriação consegue manter certas características genético-populacionais das populações selvagens. A existência de diferenciação entre a maioria dos pares de amostras, quando se consideram todos os *loci* em conjunto, deve servir para alertar que ainda que o

programa consiga aparentemente amostrar a riqueza alélica das populações fonte, maiores esforços devem ser despendidos para aliviar as mudanças genéticas advindas da fundação de estoques. Uma introdução mais constante de indivíduos selvagens pode contribuir para diminuir a velocidade dessas mudanças (Keller e Waller, 2002; Hansen *et al.*, 2006; Hansen *et al.*, 2007).

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA) corroboram a existência de uma maior similaridade genética entre as linhagens selvagens e seus estoques procriadores respectivos. Isso indica que ainda que esteja havendo uma pequena diferenciação genética nos estoques procriadores, eles ainda mantêm grande parte das características genético-populacionais das populações selvagens. Dos quase 10% de diferenciação entre amostras populacionais, menos de 3% é explicado por diferenças entre populações dentro de grupos e mais de 6% se deve às diferenças entre grupos distintos. Portanto a maior parte das diferenças está alocada entre indivíduos, depois entre grupos e finalmente entre populações dentro de grupos. Esse resultado aponta para um bom resultado geral no objetivo de manter uma coesão genética das linhagens selvagens. Novamente, para diminuir a taxa de diferenciação ocorrendo por efeitos estatísticos de deriva entre gerações, é importante aumentar a freqüência de introduções com indivíduos oriundos da população selvagem nos respectivos lagos de procriação.

A árvore NJ feita com a Distância de corda de Cavalli-Sforza também mostra as mesmas tendências em relação à coesão genética dos grupos aqui analisados e a topologia resultante tem forte suporte estatístico em todos ramos (>60%). Nessa árvore fica claro o fenômeno de diferenciação das amostras de 2003: Pennask em Premier (Pn/PrL2) se distanciando do grupo Pennask e a segunda amostra de peixes não marcados de Premier (Pr/PrL2) se distanciando do grupo Premier de peixes não marcados. Esse resultado sugere fortemente que o cardume não marcado de Premier está se aproximando geneticamente dos peixes da linhagem Pennask nesse lago. Isso pode estar ocorrendo através de introgressão, ocasionada pelo surgimento de “híbridos” das formas marcada e não marcadas co-habitando o lago e, em seguida, desses híbridos com as formas parentais. Para testar essa hipótese, realizamos uma análise genética de estoques mistos utilizando-se as populações que compõe os grupos Pennask e Premier (Pn/Pnl, Pn/BeL, PN, Pr/PnL1 + PrSc, Pr/PrL1) como base de referência (potenciais grupos de origem) e utilizando o estoque de peixe não-marcados recentes (Pr/PrL2) como suposto estoque misto. O resultado aponta que essa população seria uma mistura de indivíduos da população histórica do lago Premier e indivíduos recentes marcados de Pennask no lago Premier (Pn/PrL2) com uma menor contribuição de animais da população de Pennask no lago Beaver (Pn/BeL).

Ainda que feita de forma um tanto quanto artificial (existe heterogeneidade temporal nas amostras), é interessante notar que em anos recentes, anteriores à segunda amostragem do lago Premier, o lago sofreu peixamento com animais de Pennask no lago Beaver, devido a uma baixa populacional temporária da população selvagem de Pennask (Pn/PnL). Se durante a subida dos cardumes de trutas, não forem registrados mais de 13.000, a coleta de indivíduos para reprodução na piscicultura e introdução nas populações de procriação não ocorre. Por essa razão o estoque de peixes Pennask no lago Beaver foram utilizados na introdução do lago Premier (Tim Yesaki, comunicação pessoal). Isso explicaria a contribuição de cerca de 15% de peixes Pn/BeL e seria um indício que de fato análise é robusta. Outro indicativo da eficiência desse método é constatado quando comparamos os primeiros animais não-marcados de Premier (Pr/PrL1) como sendo o estoque misto, e 98,5% dos indivíduos são designados à população histórica de peixes não-marcados do lago Premier (PrSc).

Esses resultados sugerem que os animais não-marcados do lago Premier estão sofrendo introgressão a partir dos animais da linhagem Pennask. Os peixes não-marcados parecem ter uma origem distinta dos animais marcados, porém recentemente, estão se tornando mais semelhantes aos animais marcados usados para os peixamentos em outros lagos. Com essa conclusão, podemos afirmar que os animais não-marcados podem ser usados nas práticas de peixamento, desde que sejam identificadas características únicas dessa linhagem, que tenham utilidade em contextos específicos de peixamento. Porém, esses peixes não devem ser utilizados para complementar peixamentos com a linhagem Pennask, pela aparente possibilidade de descaracterização dos traços das trutas Pennask, em função da ocorrência de mistura. A investigação dessa hipótese é recomendada *in situ* no lago Premier, inclusive para verificar a possibilidade de ocorrência de introgressão no sentido oposto, via alguma forma de contaminação genética de alelos privados das formas não-marcadas para as formas da linhagem Pennask. Se os estoques Premier não-marcados conseguem se manter nesse lago, não há razão para crer que os estoques Pennask não poderiam estar contribuindo para o *pool* alélico dos animais residentes.

Steven Kalinowski discutiu detalhadamente em dois artigos (Kalinowski, 2002 e Kalinowski 2004) a influência do número de marcadores e do número de alelos por marcador, nas estimativas de quatro medidas de distância e diferenciação genética muito utilizadas, entre elas, duas aplicadas em nosso estudo, os estimadores das estatísticas F de Wright, desenvolvidos por Weir e Cockerham (1984) e a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards (1967), além de avaliar sua influência em análises de estoques mistos (também aplicadas aqui). As conclusões daquele autor, que se valeu de simulações em computadores para realizar uma

avaliação analítica dos coeficientes de variação e dos erros quadráticos esperados, demonstram que o fator preponderante na precisão e verossimilhança das estimativas é o número independente de alelos analisados, que é medido pelo somatório do número total de alelos em cada locus analisado, menos 1. Isso significa que, em regra geral, 12 loci com 2 alelos cada um têm, em média, o mesmo coeficiente de variação que dois loci com 12 alelos cada. Fatores como a adição de *loci* só se tornam importantes quando a diferenciação genética entre as populações é realmente pequena. Este trabalho conta com 59 alelos independentes segregando em 5 *loci* e, baseado nos estudos de Kalinowski, consideramos esse número apropriado para a detecção da diferenciação genética das populações estudadas.

#### **2.5.4 –Considerações finais**

As práticas desenvolvidas na província da Columbia Britânica em relação à formação de estoques procriadores de *O. mykiss* são singulares na América do Norte, onde a prática mais comum é realizar os programas de peixamento ou suplementação de estoque, a partir de peixes criados com matrizes de pisciculturas. A operação na Columbia Britânica, promove a coleta de gametas para fecundação diretamente a partir de indivíduos de fontes selvagens, que são utilizados para formar os estoques de procriação. Essa forma de conduta parece ser benéfica para a manutenção de variabilidade genética intrapopulacional, conforme verificado pela análise de riqueza alélica, uma vez que múltiplas amostragens da fonte selvagem parecem tornar representativas as populações dos lagos de procriação. No início foi observada pouca ou nenhuma diferenciação dos estoques procriadores quando comparadas com amostras selvagens. Essa tendência parece ter sido revertida, com forte diferenciação de uma amostra mais recente de um dos lagos de procriação. Resta saber se esse efeito é exclusivamente por causa de deriva genética (inerente ao esquema das pisciculturas e suas limitações de ordem física), ou se há contribuição de algum tipo de introgressão na linhagem Pennask do Lago Premier com contaminação genética dos indivíduos residentes não-marcados.

A introdução de novas levas migratórias a cada dois ou três anos parece ser uma forma eficiente de aumentar o número de alelos presentes na população de procriação em contraste com a fundação de um estoque a partir de apenas uma única amostragem de peixes selvagens. Isso parece ser reflexo da forma como a qual se estrutura a variabilidade genética entre localidades próximas nessa espécie, reflexo do seu hábito habitado filopátrico. Isso torna as levas migratórias a serem constituídos de misturas de sub-populações distintas, o que torna



necessário um aumento do esforço amostral para garantir uma representatividade da diversidade genética presente nas populações selvagens.

Se eventualmente ficar demonstrada a presença de comportamento de *homing* nas espécies migratórias da América do Sul poderemos, a partir daí, traçar um paralelo teórico entre os peixes de piracema e esses salmonídeos e postular que um mesmo efeito pode potencialmente acontecer em algumas situações no Brasil. Os trabalhos clássicos de Godoy (1975) e observações recentes como as de Silva (2004), além do conhecimento tradicional sobre peixes de piracema, mostram que espécies como curimba formam enormes cardumes de centenas de indivíduos antes de transporem obstáculos no acesso aos seus sítios de reprodução. Esses cardumes podem constituir levas discretas de genótipos associados à locais específicos (tributários, determinados pontos no leito principal do rio) que chegam em momentos diferentes no obstáculo, ou misturas simultâneas de diferentes estoques migrando para locais distintos. Em qualquer um dos casos, a amostragem espacial e temporalmente diversificada se faz necessária para o aumento da representatividade de novos alelos. Se verificada uma propensão à esse tipo de efeito amostral nas espécies migratórias Brasileiras, a recomendação de prática de introdução recorrente deve ser enfaticamente recomendada para a formação de conjunto de matrizes utilizadas para reprodução de alevinos e adultos utilizados em peixamento.

## 2.5 Conclusões

As análises genético-populacionais realizadas em estoques do sistema provincial de procriação e peixamentos de truta arco-íris na Columbia Britânica, Canadá, nos permitem alcançar as seguintes conclusões:

- O esquema de lagos de procriação pode, até certo ponto, manter as características genético-populacionais das populações selvagens, porém quase sempre são observadas pequenas diferenciações genéticas. Essas pequenas divergências observadas entre estoques procriadores e populações selvagens associadas devem ser devidas, principalmente, a efeitos de deriva genética.

- A população selvagem do rio Blackwater se mostrou uma fonte apropriada para a formação de estoques procriadores devido à constatação da existência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em todos seus loci e devido aos mais baixos valores de diferenciação dos estoques procriadores associados. A população selvagem de Pennask, apesar de não exibir EHW na combinação dos loci analisados, obteve, inicialmente, os mais bem sucedidos resultados com estoques procriadores (ausência completa de diferenciação genética em relação a alguns estoques procriadores associados).

- Populações fundadoras de estoques procriadores podem exibir: i) mais alelos (perda de diversidade por deriva), ou ii) o mesmo número de alelos, ou um número menor de alelos que os estoques fundados. Um maior número de alelos nas populações procriadoras em relação à sua fonte selvagem é atribuída ao efeito complementar de vários eventos de amostragem da população selvagem para formar o estoque procriador. A prática de múltiplas introduções é de grande relevância para a conservação genética em salmonídeos.

- Os peixes não-marcados do lago Premier parecem ter uma origem distinta dos estoques de Pennask cultivados naquele lago. Porém, a última amostragem dos animais não-marcados aponta para uma possível mistura populacional dos peixes residentes do lago Premier, com peixes marcados oriundos de Pennask no lago Premier.

- Recomenda-se um aumento na frequência de introduções de peixes selvagens nas populações de procriação para tamponar mais eficientemente o efeito de deriva e assim contribuir para a manutenção da variabilidade interpopulacional presente nessas três linhagens genéticas selvagens.

## Bibliografia

- Afanas'ev, K.I., Rubtsova, G.A., Malinina, T.V. et al. (2006)** Microsatellite variability and differentiation of hatchery stocks of chum salmon *Oncorhynchus keta* Walbaum in Sakhalin. *Russian Journal of Genetics* 42: 1431-1438.
- Agostinho, A.A., Thomaz, S.M. e Gomes, L.C. (2005)** Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters *Conservation Biology* 19 (3), 646–652.
- Aho, T., Rönn, J., Piironen, J. e Björklund, M. (2006)** Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations *Aquaculture* 253: 244-248.
- Allendorf, F.W. (1993)** Delay of Adaptation to Captive Breeding by Equalizing Family Size *Conservation Biology* 7: 416-419.
- Allendorf, F W. e Ryman, N. (1987)** Genetic management of hatchery stocks in N. *Population Genetics and Fishery Management* Ryman e Utter, F. eds., University of Washington Press, Seattle, 141- 159.
- Allendorf, F W. e Luikart, G. (2007)** *Conservation and the genetics of populations*, Blackwell Publishing, Oxford, 623p.
- Amos W., Hoffman J.I., Frodsham A. et al. (2007)** Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* 7: 10-14.
- Amos, W. e Balmford, A. (2001)** When does conservation genetics matters? *Heredity* 87: 257-265.
- Angers, B. e Bernatchez, L. (1997)** Complex evolution of a Salmonid microsatellite locus and its consequences in inferring allelic divergence from size information. *Molecular Biology and Evolution* 14: 230–238.
- Aparicio, E., García-Berthou, E., Araguas, R.M. et al. (2005)** Body pigmentation pattern to assess introgression by hatchery stocks in native *Salmo trutta* from Mediterranean streams. *Journal of Fish Biology* 67: 931-949.
- Araki, H.; Ardren, W.R.; Olsen, E. et al. (2007)** Reproductive Success of Captive-Bred Steelhead Trout in the Wild: Evaluation of Three Hatchery Programs in the Hood River. *Conservation Biology* 21: 181-190.
- Arlinghaus R. e Hallerman J. (2007)** Effects of air exposure on mortality and growth of undersized pikeperch, *Sander lucioperca*, at low water temperatures, with implications for catch-and-release fishing. *Fisheries Management and Ecology* 14: 155–160.
- Armour, J.A.L. (2006)** Tandemly repeated DNA: Why should anyone care? *Mutation Research – Fundamentals and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 98: 6-14.

- Avise, J.C. (2004)** Molecular Markers, Natural History and Evolution, 2<sup>nd</sup> Edition. Chapman & Hall, Nova York, 541p.
- Ayllon, F., Daivane, P., Beall, E. et al. (2004)** Bottlenecks and genetic changes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) stocks introduced in the Subantarctic Kerguelen Islands. *Aquaculture* 237: 103-116.
- Banks, M.A., M.S. Blouin, B.A. Baldwin et al. (1999)** Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Journal of Heredity* 90: 281- 288.
- Barbosa, A.C.D.L., Galzerani, F. et al. (2006)** Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Molecular Ecology Notes* 6: 936-938.
- Bazin, E., Glémin, S. e Galtier, N. (2006)** Population Size Does Not Influence Mitochondrial Genetic Diversity in Animals *Science* 312: 570-572.
- Behnke R.J. (1992)** Native Trout of Western North America. American Fisheries Society Monograph 6. *American Fisheries Society*, Bethesda, 275p.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. e Bonhomme F. (2004)** GENETIX 4.05, logiciel sous Windows pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France.
- Berkamp, G., McCartney, M., Dugan, P., McNeely, J., Acreman, M. 2000.** Dams, Ecosystem Functions and Environmental Restoration Thematic Review II.1 prepared as an input to the World Commission on Dams, Cape Town, [www.dams.org](http://www.dams.org)
- Borley K. e White, M.M. (2006)** Mitochondrial DNA variation in the endangered Colorado pikeminnow: A comparison among hatchery stocks and historic specimens. *North American Journal of Fisheries Management* 26: 916-920.
- Briscoe, D.A., Malpica, J.M., Robertson, A., Frankham, R. et al. (1992)** Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology* 6: 416-425.
- Billington. (2003)** Mitochondrial DNA. in EM Hallerman (ed), *Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, 59-100.
- Bowen, M. D., Marques, S., Silva, L. G. M., Vono, V. e Godinho, H. P. (2006)** Comparing on site human and video counts at Igarapava fish ladder, Southeastern Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 4: 291-294.
- Brookfield, J.F.Y. (1996)** A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology* 5: 453–455.
- Brown, B. e Epifanio, J. (2003)** Nuclear DNA in Population Genetics *In: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. Hallerman, (ed), American Fisheries Society: Bethesda, 101-123.

- Cagigas, M.E., Vazquez, E., Blanco, G. e Sanchez, J.A. (1999)** Genetic effects of introduced hatchery stocks on indigenous brown trout (*Salmo trutta* L.) populations in Spain. *Ecology of Freshwater Fish* 8: 141-150.
- Calabrese, P.P., Durrett, R.T. e Aquadro, C.F. (2001)** Dynamics of microsatellite divergence under stepwise mutation and proportional slippage/point mutation models. *Genetics* 159: 839–852.
- Carl L.M., Hunt C. e Ihssen P.E. (1994)** Rainbow trout of the Athabasca River, Alberta: a unique population. *Transactions of the American Fisheries Society* 123: 129–140.
- Carvalho, D.C. (2002)** Identificação e caracterização de regiões microssatélites de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes). Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 77p.
- Carvalho-Costa, L.F., Hatanaka, T. e Galetti Jr., P.M.(2006)** Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 818-819.
- Castro, F. e Begosi, A. (1995)** Ecology of fishing on the Grande River (Brazil): technology and territorial rights, *Fisheries Research* 21: 361-373.
- Castro, R.M.C. (1990)** Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostriophysi, Characiformes). Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 293p.
- Castro, R.M.C. e Vari, R.P. (2003)** Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). p. 65-70. In: R.E. Reis, S.O. Kullander and C.J. Ferraris, Jr. (eds.) *Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: EDIPUCRS, Brasil.
- Caapeleti, A.R. e Petreire Jr., M. (2006)** Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall “Cachoeira de Emas” of the Mogi-Guaçu River - São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 66: 651-659.
- Cavalli-Sforza, L.L. e Edwards, A.W.F. (1967)** Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics* 19: 233-257.
- Colwell, R. K. 2000.** EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 6 Beta. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>
- Cunico, A.M. e Agostinho, A.A. (2006)**, Morphological patterns of fish and their relationships with reservoirs hydrodynamics. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49, 125-134.
- Deiner, K., Garza, J.C. e Robert; G.D. (2007)** Population structure and genetic diversity of trout (*Oncorhynchus mykiss*) above and below natural and man-made barriers in the Russian River, California. *Conservation Genetics* 8: 437-454.
- Docker M.F.; Dale A. e Heath, D.D. (2003)** Erosion of interspecific reproductive barriers resulting from hatchery supplementation of rainbow trout sympatric with cutthroat trout *Molecular Ecology* 12: 3515-3521.

- Dupont, P., Bourret, V. e Bernatchez, L. (2007)** Interplay between ecological, behavioural and historical factors in shaping the genetic structure of sympatric walleye populations (*Sander vitreus*). *Molecular Ecology* 16: 937-951.
- Edwards A., Cititello A., Hammond H.A. e Caskey, C.T. (1991)** DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *American Journal Human Genetics* 49: 746-756.
- Efron B (1981)** Nonparametric estimates of standard error: the jackknife, the bootstrap and other methods. *Biometrika* 68: 589-599.
- Ellegren, H. (2004)** Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics* 5: 435-445.
- Engelbrecht G.D., Bank F.H.D. e Mulder, P.F.S. (1997)** Allozyme Variation in Schilbe intermedius Ruppel, 1832 (Pisces: Siluriformes) From Two Localities in the Limpopo River System, South Africa - Potentialities and limitations *Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 117: 179-184.
- Evans, B., Bartlett, J., Sweijd, N. et al. (2004)** Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery produced abalone in Australia (*Haliotis rubra*) and South Africa (*Haliotis midae*). *Aquaculture* 233: 109-127.
- Ewing B e Green P: (1998)** Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. e Quattro, J. M. (1992)** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Eyto, E., McGinnity, P., Consuegra, S. et al. (2007)** Natural selection acts on Atlantic salmon major histocompatibility (MH) variability in the wild. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences* 274: 861-869.
- Falconer, D.S. e Mackay, T.F.C. (1996)** *Introduction to quantitative genetics*. 4.ed. Longman Group Limited, Edinburgh 464p.
- FAO (2002)** Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação - *The State of World Fisheries and Aquaculture*, Endereço eletrônico na rede mundial de computadores (acessado dia 10 de Maio de 2007) <http://www.fao.org/docrep/005/y7300e/y7300e00.htm>
- Felsenstein, J. (1989)** PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166.
- Ferguson, M.M. e Duckworth, G.A. (1997)** The status and distribution of Lake Sturgeon, *Acipenser fulvescens*, in the Canadian provinces of Manitoba, Ontario and Quebec: a genetic perspective. *Environmental Biology of Fishes*. 48: 299-309.
- Ferreira, A.G.A. e Amos, W. (2006)** Inbreeding depression and multiple regions showing heterozygote advantage in *Drosophila melanogaster* exposed to stress. *Molecular Ecology* 15: 3885-3893.

- FFSBC (2004)** Freshwater Fisheries Society of British Columbia. *Rainbow trout strains currently stocked in BC waters*. FFSBC, Victoria, 18p.
- Frankham, R. (1995)** Conservation Genetics. *Annual Review of Genetics* 29: 305-27.
- Frankham, R. (1996)** Relationship of genetic variation to populations size in wildlife. *Conservation Biology* 10: 1500-1508.
- Frankham R., Ballou, J.D. e Briscoe D.A. (2002)** *Introduction to conservation genetics*, Cambridge University Press, Cambridge, 617p.
- Freitas, L.M. (2007)** Simulações evolutivas com microssatélites ligados para estudos de tempos de divergência populacional. Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 50p.
- Frost, L.A., Evans, B.S. e Jerry, D.R. (2006)** Loss of genetic diversity due to hatchery culture practices in barramundi (*Lates calcarifer*). *Aquaculture* 261: 1056-1064.
- Funk, W.C., Tyburczy, J. A., Knudsen, K. L., Lindner, K.R. e Allendorf, F.W. (2005)** Genetic Basis of Variation in Morphological and Life-History Traits of a Wild Population of Pink Salmon. *Journal of Heredity* 96: 24–31.
- Garant, D., Fleming, I.A., Einum, S. e Bernatchez, L. (2003)** Alternative male life-history tactics as potential vehicles for speeding introgression of farm salmon traits into wild populations *Ecology Letters* 6: 541-549.
- Gharrett, A.J. e Zhivotovsky, L.A. (2003)** Migration. *In: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. Hallerman, (ed), American Fisheries Society: Bethesda, 141-174.
- Godinho, H.P. e Godinho, A.L. (1994)** Ecology and conservation of fish in southeastern Brazilian river basins submitted to hydroelectric impoundments. *Acta Limnologica Brasiliensia* 5:187-197.
- Godinho, H.M., Romagosa, E. e Cestarolli, M.A. (1984)** Reprodução induzida do curimatá, *Prochilodus scrofa*, Steind. 1881 sob condições de cultivo experimental. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* 8: 113-119.
- Godoy, M.P. (1954)** Locais de desova de peixes em um trecho do Mogi Guassu, SP. *Revista Brasileira de Biologia* 14: 375–96.
- Godoy, M.P. (1957)** Marcação de peixes no rio Mogi Guassu. *Revista Brasileira de Biologia* 17: 479–90.
- Godoy, M.P. (1959)** Age, growth, sexual maturity, behaviour, migration, tagging and transplantation of the Curimbata (*Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881) of the Mogi Guassu River, Sao Paulo State, Brasil. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.*, 31: 447–77.
- Godoy, M.P. (1967)** Dez anos de observações sobre periodicidade migratória de peixes do Rio Mogi Guassu. *Revista Brasileira de Biologia* 27: 1–12.

- Godoy, M.P. (1972)** Brazilian tagging experiments, fishes migration, and upper Paraná River Basin eco-system. *Revista Brasileira de Biologia* 32: 473-484.
- Godoy, M.P. (1975)** *Peixes do Brasil – subordem Characoidei. Bacia do rio Mogi Guassu. v.1*, 216 p.
- Gordon D., Abajian C. e Green P (1998)** Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8 195-202.
- Guo, S.W. e Thompson, E.A. (1992)** Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometria* 48: 361-372.
- Hancock, J.M. (1999)** Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms, In D.B. Goldstein e C. Schlötterer (eds.), *Microsatellites: Evolution and Applications*. Oxford University Press, New York, 1-9.
- Hansen, M.M., Ruzzante, D.E., Nilsen, E.E. et al. (2000)** Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology* 9: 583-594.
- Hansen, M.M., Bekkevold, D., Jensen, L.F. et al. (2006)** Genetic restoration of a stocked brown trout *Salmo trutta* population using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. *Journal of applied ecology* 43: 669-679.
- Hansen, M.M., Skaala, Ø., Jansen., L.F. et al. (2007)** Gene flow, effective population size and selection at major histocompatibility complex genes: brown trout in the Hardanger Fjord, Norway. *Molecular Ecology* 16: 1413–1425.
- Hatanaka, T. e Galetti Jr. P.M. (2003)** RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology* 26: 19-25.
- Hatanaka, T., Silva, F.H. e Galetti Jr. P.M (2006)** Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 153-159.
- Hedrick, P.W. (2000)** *Genetics of Populations* (2<sup>nd</sup> edn). Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 553p.
- Hedrick, P. W. (2001)** Conservation genetics: where are we now? *Trends Ecology and Evolution* 16: 629-636.
- Hendry, A.P. e Day, T. (2005)** Population structure attributable to reproductive time and adaptation by time. *Molecular Ecology* (2005) 14: 901–916.
- Heggenes, J. e Røed, K.H. (2006 )** Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river *Ecology of Freshwater Fish* 15: 366-375.



- Hilsdorf, A. e Krieger, J. E. (1998)** Biologia molecular na conservação de peixes. *Biotecnologia, ciência e desenvolvimento*, 1: 10-12.
- Jager, H.I (2006)** Chutes and ladders and other games we play with rivers. II. Simulated effects of translocation on white sturgeon *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 176-185.
- Jarne P. e Lagoda, P.J.L. (1996)** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*. 11: 424-429.
- Kalendar, R. (2006)** FastPCR: a PCR primer design and repeat sequence searching software with additional tools for the manipulation and analysis of DNA and protein. ([www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm](http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/programs/fastpcr.htm))
- Kalinowski, S.T. (2002)** How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* 88: 62-65.
- Kalinowski, ST. (2003)** Genetic Mixture Analysis 1.0. Department of Ecology, Montana State University, Bozeman MT 59717. Available for download from <http://www.montana.edu/kalinowski>
- Kalinowski, S.T. (2004)** Genetic polymorphism and mixed-stock fisheries analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquature Sciences* 61: 1075–1082.
- Kalinowski, S.T. (2005)** Do polymorphic loci require large sample sizes to estimate genetic distances? *Heredity* 94: 33-36
- Kaur M., Makrigiorgos, G.M. (2003)** Novel amplification of DNA in a hairpin structure: towards a radical elimination of PCR errors from amplified DNA *Nucleic Acids Research* 31: e26
- Kause, A., Tobin, D., Houlihan, D.F. et al. (2006)** Feed efficiency of rainbow trout can be improved through selection: Different genetic potential on alternative diets. *Animal Genetics* 84: 807-817.
- Keller, L.F. e Waller, D.M. (2002)** Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*. 17: 230-241.
- Kimura, M. e Crow, J. (1964)** The Number of Alleles that Can Be Maintained in a Finite Population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kostow, K.E., Marshall, A.R. e Phelps, S.R. (2003)** Naturally spawning hatchery steelhead contribute to smolt production but experience low reproductive success. *Transactions of the American Fisheries Society* 132: 780-790.
- Kretzmann, M., Mentzer, L., DiGiovanni Jr., R. et al. (2006)** Microsatellite Diversity and Fitness in Stranded Juvenile Harp Seals (*Phoca groenlandica*) *Journal of Heredity* 97: 555-560.
- Krueger, C. C. e May, B. (1991)** Ecological and genetic effects of salmonid introductions in North America. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 48: 66-77.

- Kruglyak, S., Durrett, R. T., Schug, M. D. e Aquadro, C. F. (1998)** Equilibrium distributions of microsatellite repeat length resulting from a balance between slippage events and point mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95: 10774–10778.
- Lai, Y.L. e Sun F.Z. (2003)** The relationship between **microsatellite** slippage mutation rate and the number of repeat units. *Molecular Biology and Evolution* 20: 2123-2131.
- Latini, A. O. e Petreere, M. Jr. (2004).** Reduction of a native fish fauna by alien species: na example of Brazilian tropical freshwater lakes. *Fisheries Management and Ecology*, 10: 1-9.
- Lande, R. (1999)** Extinction risks from anthropogenic, ecological and genetic factors. *in Genetics and extinction of species*. 1 ed. Princeton, West Sussex: 1-22.
- Lenormand, T. (2002)** Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution* 17(4): 183-189.
- Levinson, G. e GUTMAN (1987)** Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular Biology.and Evolution* 4: 203-221.
- Lewontin, R. C. (2000)** The problems of population genetics. *In: Evolutionary Genetics from Molecules to Morphology*, pp. 5-23 R. S. Singh y C. B. Krimbras (eds.) Cambridge University Press, New York.
- Li, Q., Park, C., Endo, T. Kijima, A. (2004)** Loss of genetic variation at microsatellite loci in hatchery strains of the Pacific abalone (*Haliotis discus hanna*). *Aquaculture* 235: 207-222.
- Li, Q., Yu, H. e Yu, R. (2006)** Genetic variability assessed by microsatellites in cultured populations of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in China. *Aquaculture* 259: 95–102.
- Litt, M. e Luty, J.A. (1989)** A hypervariable microsatellite revealed by in vitro. *American Journal of Human Genetics* 44: 397-401.
- Louis, E.J. e Dempster, E.R. (1987)** An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics* 43: 805-811.
- Ludwig, A. (2006)** A sturgeon view on conservation genetics. *European Journal of Wildlife Research* 52: 3-8.
- Marzano F.N., Corradi N., Papa R., Tagliavini, J. r Gandolfi, G. (2003)** Molecular Evidence for Introgression and Loss of Genetic Variability in *Salmo (trutta) macrostigma* as a Result of Massive Restocking of Apennine Populations (Northern and Central Italy). *Environmental Biology of Fishes*, 68: 349-356.
- McConnell, S., Hamilton, L., Morris, D. et al. (1995)** Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon. *Aquaculture* 13: 19-30.
- McCusker M.R. (1994)** The biogeography and conservation of Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss*. Tese de Mestrado, University of British Columbia, Vancouver, 122p.

- McCusker M.R., Parkinson. E. e Taylor, E.B. (2000)** Mitochondrial DNA variation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) across its native range: testing biogeographical hypotheses and their relevance to conservation. *Molecular Ecology* 9: 2089-2108.
- McLean, J.E., Bentzen, P. e Quinn, T.P. (2003)** Differential reproductive success of sympatric, naturally spawning hatchery and wild steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) through the adult stage. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 60: 433-440.
- McLean, J.E., Bentzen, P. e Quinn, T.P. (2004)** Does size matter? Fitness-related factors in steelhead trout determined by genetic parentage assignment. *Ecology* 85: 2979-2985.
- McLean, J.E., Bentzen, P. e Quinn, T.P. (2005)** Nonrandom, Size- and Timing-Biased Breeding in a Hatchery Population of Steelhead Trout. *Conservation Biology* 19: 446-454.
- Miller, L.M e Kapuscinski, A.R. (2003)** Genetic guidelines for hatchery supplementation programs. in E.M. Hallerman, ed *Population Genetics: Principles and Practices for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, 329-355.
- Miller; L.M., Close; T. e Kapuscinski, A.R. (2004)** Lower fitness of hatchery and hybrid rainbow trout compared to naturalized populations in Lake Superior tributaries, *Molecular Ecology*, 13: 3379-3388.
- Nelson, R.J., Becham, T.D. e Small, P.M. (1998)** Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (*Ocorhynchus nerka*) stock complex using non-denaturing gel electrophoresis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7: 312-319.
- Nelson, R.J. e Beacham, T.D. (1999)** Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon. *Animal Genetics* 33: 228-229.
- Nelson, R.J., Wood, C.C., Cooper, G., Smith, C. e Koop, B. (2003)** Population structure of sockeye salmon of the central coast of British Columbia: Implications for recovery planning. *North American Journal of Fisheries Management* 23: 703-720.
- Neraas, P.L., Spruell, P. (2001)** Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*, 10: 1153-1164.
- Neville, H.M.; Isaak, D.J.; Dunham, J.B. et al. (2006)** Fine-scale natal homing and localized movement as shaped by sex and spawning habitat in Chinook salmon: Insights from spatial autocorrelation analysis of individual genotypes. *Molecular Ecology* 15: 4589-4602.
- Neville, H.M.; Isaak, D.; Thurow, R. et al. (2007)** Microsatellite variation reveals weak genetic structure and retention of genetic variability in threatened Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) within a Snake River watershed. *Conservation genetics* 8: 133-147.
- Oosterhaut, C., Joyce, D.A., Cummings, S.M. et al. (2006)** Balancing selection, random genetic drift and genetic variation at the MHC in two wild populations of guppies (*Poecilia reticulata*). *Evolution* 60: 2562-2574.

- Oppen, M.J.H., Rico, C., Turner, G.F. e Hewitt, G.M. (2000)** Extensive Homoplasy, Nonstepwise mutations, and shared ancestral polymorphism at a complex microsatellite locus in Lake Malawi cichlids. *Molecular Biology and Evolution* 17: 489-498.
- Otha, T. e Kimura, M. (1973)** A Model of Mutation Appropriate to Estimate the Number of Electrophoretically Detectable Alleles in a Finite Population. *Genetical Research* 22: 201-204.
- Ottová, E., Simkova, A. and Morand, S. (2007)** The role of major histocompatibility complex diversity in vigour of fish males (*Abramis brama* L.) and parasite selection *Biological Journal of the Linnean Society* 90: 525-538.
- Øverli, Ø., Pottinger T.G., Carrick, T.R., Øverli, E. e Winberg, S., (2002)** Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *Journal of Experimental Biology* 205: 391-395.
- Paiva, M.P., Andrade-Tubino, M.F. e Godoy, M.P. (2002).** *As represas e os peixes nativos do rio Grande*. Interciência, Rio de Janeiro: 78p.
- Page, K.S., Scribner, K.T., Bastner, D. et al (2005)** Genetic evaluation of a Great Lakes lake trout hatchery program. *Transactions of the American Fisheries Society* 134: 872-891.
- Page, R.D. (1996)** TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applied Biosciences*. 12: 357-358.
- Pampoulie, C., Jörundsdóttir, T.D., Steinarsson, A. et al. (2006)** Genetic comparison of experimental farmed strains and wild Icelandic populations of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture* 261: 556-564.
- Papa, R., Israel, J.A., Marzano F.N, e May, B. (2007)** Assessment of genetic variation between reproductive ecotypes of Klamath River steelhead reveals differentiation associated with different run-timings. *Journal of Applied Ichthyology* 23: 142–146.
- Paragamian, V.L., Powell, M.S. e Faler, J.C. (1999)** Mitochondrial DNA Analysis of Burbot Stocks in the Kootenai River Basin of British Columbia, Montana, and Idaho *Transactions of the American Fisheries Society* 128: 868–874.
- Paragamian, V. L., Kruse, G. e Wakkinen, V. (2001)** Spawning habitat of Kootenai River white sturgeon, post-Libby Dam. *North American Journal of Fisheries Management* 21: 10-21.
- Pereira, A.C.S., Borba, E.L. e Giuliatti, A.M. (2007)** Genetic and morphological variability of the endangered *Syngonanthus mucugensis* Giul. (Eriocaulaceae) from the Chapada Diamantina, Brazil: implications for conservation and taxonomy *Botanical Journal of the Linnean Society* 153: 401–416.
- Petrere, M. (1989)** River Fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management*. 4: 1-16.
- Post, J.R., Mushens, C., Paul, A. e Sullivan, M. (2003)** Assessment of alternative harvest regulations for sustaining recreational fisheries: model development and application to bull trout. *North American Journal of Fisheries Management* 23: 22-34.

- Primmer C.R., Müller A.P., Ellegren H. (1996)** A wide-ranging survey of cross-species amplification in birds. *Molecular Ecology* 5: 365-378.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. e Donnelly, P. (2000)** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Quenouille, M. (1956)** Notes on bias in estimation, *Biometrika* 43: 353-360.
- Ramella, M. S., Kroth, M. A., Meurer, S., et al. (2006)** Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin *Brazilian Archives of Biology and Technology* 49: 589-598.
- Rannala, B., e Mountain, J.L. (1997)** Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 9197-9201.
- Ramirez, M.G., Eiman, S.S., Wetkowski, M.M., Mooers, M.K. et al. (2007)** Heterozygosity and fitness in a California population of the labyrinth spider *Metepeira ventura* (Araneae, Araneidae) *Invertebrate Biology* 126: 67-73.
- Raymond, M.L. e Rousset, F. (1995)** An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283.
- Reed, D.H. e Frankham, R. (2003)** Correlation between Fitness and Genetic Diversity *Conservation Biology* 17: 230-237.
- Revaldaves, E. e Renesto, E. (1997)** Genetic Variability Of *Prochilodus Lineatus* (Characiformes:Prochilodontidae) In The Upper Paraná River. *Brazilian Journal of Genetics* 20: 381-388.
- Rice, W.R. (1989)** Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225.
- Rich, H.B., Carlson, S.M., Chasco, B.E. et al. (2006)** Movements of male sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*, on spawning grounds: effects of in-stream residency, density and body size. *Animal Behaviour*, 71: 971-981.
- Rosenblum, B.B., Oaks, F., Menchen S. et al. (1997)** Improved single-strand DNA sizing accuracy in capillary electrophoresis *Nucleic Acids Research* 25: 3925-3929.
- Ryman, N. e Stahl, G., (1980)** Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo truttal*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences* 37: 82-87.
- Ryman, N., Utter, F., Allendorf, F.W. et al. (1993)** Genetic concerns about hatchery populations - A comment on conclusions of Nyman and Ring. *Journal of Fish Biology* 42: 471-480.
- Ryman, N., Jorde, P.E. e Laikre, L. (1995)** Supportive breeding and variance effective population size. *Conservation Biology* 9:1619-1628.

- Saccheri, I., Kuussaari, M., Kankare, M. et al. (1998)** Inbreeding and extinction in a butterfly metapopulation. *Nature* 392: 491-494.
- Sambrook, J. and Russell, D. (2001)** Molecular cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 682p.
- Santibáñez-Koref, M.F., Gangeswaran, R. e Hancock, J.M. (2001)** A relationship between lengths of microsatellites and nearby substitution rates in mammalian genomes. *Molecular Biology and Evolution* 18: 2119–2123.
- Santos, N.P., Fontainhas-Fernandes A.A., Faria, R. et al. (2005)** Genetic evidence for limited introgression between wild and stocked individuals in Portuguese brown trout, *Salmo trutta* populations. *Folia Zoologica* 55: 433-443.
- Schmeller, D.S., Schregel, J. e Veith, M. (2007)** The importance of heterozygosity in a frog's life. *Naturwissenschaften* 94: 1432-1904.
- Schneider, S., Roessli, D., e Excoffier, L. (2000)** Arlequin: A software for population genetics data analysis. Ver 2.001. Genetics and Biometry Lab, Dept. of Anthropology, University of Geneva.
- Schölloterer, C. (2000)** Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma* 109: 365-371.
- Schlotterer, C. (2004)** The evolution of molecular markers: just a matter of fashion? *Nature Reviews Genetics* 5:63-69.
- Schlötterer, C. e Tautz, D. (1992)** Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*. 20: 211–215.
- Sekino M.; Hara, M. e Taniguchi, N. (2002)** Loss of microsatellite and mitochondrial DNA variation in hatchery strains of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 213: 101-122.
- SEMAD (2007)** Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável, Governo Estadual de Minas Gerais. Endereço eletrônico na rede mundial de computadores (acessado dia 10 de Maio de 2007) [www.semad.mg.gov.br/index.php?option=com\\_content&task=view&id=176&Itemid=128](http://www.semad.mg.gov.br/index.php?option=com_content&task=view&id=176&Itemid=128)
- Shaklee, J.B. e Currens, K.P. (2003).** Genetic stock identification and risk assessment. in. in E.M. Hallerman, (ed) *Population Genetics: Principles and Practices for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, Bethesda, 291-328.
- Small, M.P., Beacham, T.D., Withler, R.E. e Nelson, R.J. (1998)** Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within the Fraser River, British Columbia. *Molecular Ecology* 7: 141-155.
- Small M.P., Fraye, A.E., Bargens, J.F. e Young, S.F. (2006)** Genetic structure of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) populations in the lower Columbia River: are chum salmon in Cascade tributaries remnant populations. *Conservation Genetics* 7: 65-78.

- Small, M.P., McLean, J.G., Loxterman, J. et al. (2007)** Fine-Scale Population Structure of Rainbow Trout in the Spokane River Drainage in Relation to Hatchery Stocking and Barriers. *Transactions of the American Fisheries Society* 136: 301–317.
- Shiver, M.D., Jin L., Chakraborty R. e Boerwinkle, E. (1993)** VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation model: a computer simulation approach. *Genetics* 134: 983-993.
- Silva, L.G.M. (2004)** Migração de mandis-amarelos *Pimelodus maculatus* e curimbas *Prochilodus lineatus* no rio Grande, bacia do Alto Paraná. Dissertação de mestrado, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte. 73p
- Sivasundar, A., Bermingham, E. e Ortí, G. (2001)** Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-418.
- Slatkin, M. (1991)** Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical Research* 58: 167-175.
- Smith C.T., Koop, B. e Nelson, R.J. (1998)** Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Molecular Ecology* 7: 1614-1616.
- Song, J., ;Song, Z, Yue, B. e Zheng, W. (2006)** Assessing genetic diversity of wild populations of Prenant's schizothoracin, *Schizothorax prenanti*, using AFLP markers. *Environmental Biology of Fishes* 77: 79-86.
- Sønstebo, J.H., Borgstrøm, R. e Heun, M. (2007)** A comparison of AFLPs and microsatellites to identify the population structure of brown trout (*Salmo trutta* L.) populations from Hardangervidda, Norway. *Molecular Ecology* 16: 1427–1438.
- Sprowles, A.E., Stephens, M.R., Clipperton, M.W. e May, B.P. (2006)** Fishing for SNPs: A Targeted Locus Approach for SingleNucleotide Polymorphism Discovery in Rainbow Trout. *Transactions of the American Fisheries Society* 135: 1698–1721.
- Spruell, P; Hemmingsen, A.R., Howell, P.J., Kanda, N. e Allendorf, F.W. (2003)** Conservation genetics of bull trout: Geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*. 4: 17-29.
- Stamford, M.D. e Taylor, E.B. (2005)** Population subdivision and genetic signatures of demographic changes in Arctic grayling (*Thymallus arcticus*) from an impounded watershed *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic. Sciences* 62: 2548-2559.
- Stewart, I.J., Quinn, T.P., Bentzen, P. (2003)** Evidence for Fine-Scale Natal Homing Among Island Beach Spawning Sockeye Salmon, *Oncorhynchus nerka*. *Environmental Biology of Fishes* 67: 77-85.
- Sunnucks, P. (2000)** Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.

- Taniguchi, N. (2003)** Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 13: 177-185.
- Taylor, E., Tamkee, P.; Sterling, G. e Hughson, W. (2007)** Microsatellite DNA analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from western Alberta, Canada: native status and evolutionary distinctiveness of "Athabasca" rainbow trout. *Conservation Genetics* 8: 1-15.
- Tiira, K. Piironen, J. e. Primmer, C.R. (2006)** Evidence for reduced genetic variation in severely deformed juvenile salmonids *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 63: 2700-2707.
- Timmermans, M.J.T.N., Ellers J. e Van Straalen, N.M. (2007)** Allelic diversity of metallothionein in *Orchesella cincta* (L.): traces of natural selection by environmental pollution. *Heredity* 98: 311-319.
- Tobin, D., Kause, A., Mantysaari, E.A. et al. (2006)** Fat or lean? The quantitative genetic basis for selection strategies of muscle and body composition traits in breeding schemes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) *Aquaculture* 261: 510-521.
- Toledo-Filho, F.A., Almeida-Toledo, L.F., Foresti, F. et al. (1992)** Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética 1* Universidade de São Paulo, São Paulo, 21p.
- Toledo-Filho, F.A., Foresti, F. e Almeida-Toledo, L.F. (1996)** Biotecnologia genética aplicada à piscicultura. *Cadernos de Ictiogenética 3*, Universidade de São Paulo, São Paulo, 30p.
- Tomiuk, J., Bachmann, L., Bauer, C. et al. (2007)** Repeat expansion in spinocerebellar ataxia type 17 alleles of the TATA-box binding protein gene: an evolutionary approach *European Journal of Human Genetics* 15: 81-87.
- Utter, FM. (2003)** Genetic impacts of fish introductions. in EM Hallerman (ed), *Population Genetics: Principles and Applications for Fisheries Scientists*. American Fisheries Society, 357-378.
- Valone, P.M. e Butler, J.M. (2004)** AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. *Biotechniques*. 37: 226-31.
- Verspoor, E., Beardmore, J.A., Consuegra, S. et al. (2005)** Population structure in the Atlantic salmon: insights from 40 years of research into genetic protein variation. *Journal of Fish Biology* 67: 3-54.
- Veytsman B. e Akhmadeyeva, L. (2006)** Simple mathematical model of pathologic microsatellite expansions: When self-reparation does not work *Journal of Theoretical Biology* 242: 401-408.
- Vrijenhoek, R. C., (1998)** Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology* 53 (Supplement A): 394-412.
- Walker, M.M., Diebel, C.E., Haugh, C.V. et al. (1997)** Structure and function of the vertebrate magnetic sense *Nature* 390: 371-376.



- Winans, G.A., Paquin, M.M., Doornik, D.M. et al. (2004)** Genetic Stock Identification of Steelhead in the Columbia River Basin: An Evaluation of Different Molecular Markers. *North American Journal of Fisheries Management* 24: 672–685.
- Wang, J. e Ryman, N. (2001)** Genetic Effects of Multiple Generations of Supportive Breeding. *Conservation Biology* 15: 1619–1631.
- Wang, S., Hard, J.J. e Utter, F. (2002)** Genetic variation and fitness in salmonids. *Conservation Genetics* 3: 331-333.
- Waples, R.S., Winans, G.A., Utter, F.M. e Mahnken, C. (1990)** Genetic approaches to the management of Pacific salmon. *Fisheries* 15: 19–25.
- Was, A. e Wenne, R. (2003)** Microsatellite DNA Polymorphism in Intensely Enhanced Populations of Sea Trout (*Salmo trutta*) in the Southern Baltic. *Marine Biotechnology* 5: 1436-2228.
- Watkins, J.C. (2007)** Microsatellite evolution: Markov transition functions for a suite of models. *Theoretical Population Biology* 71: 147–159.
- WCD - World Commission on Dams (2000)** Dams and Development – A new framework. The Report of the WCD for Decision-making, Earthscan Publications Ltd, Londres, 356p.
- Weber, J.L. e May, P.E. (1989)** Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics* 44: 388-396
- Weber, J.L. e Wong, C. (1993)** Mutation of human short tandem repeats. *Human Molecular Genetics* 2: 1123-1128.
- Weir, B.S. e Cockerham, C.C. (1984)** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Weir, B.S. e W.G. Hill (2002)** Estimating F-statistics. *Annual Review of Genetics* 36: 721-750.
- Wenz, H.M., Robertson, J.M., Menchen S. et al. (1998)** High-precision genotyping by denaturing capillary electrophoresis *Genome Research* 8: 69-80.
- Willi Y., Buskirk, J., Schmid, B. e Fischer, M. (2007)** Genetic isolation of fragmented populations is exacerbated by drift and selection. *Journal of Evolutionary Biology* 20: 534-542
- Williams, R., Leary, R.F e Currens, K.P (1997)** Localized Genetic Effects of a Long-Term Hatchery Stocking Program on Resident Rainbow Trout in the Metolius River, Oregon *North American Journal of Fisheries Management*;17: 1079–1093.
- Wood, B.eMiller, J. (2006)** Linked selected and neutral loci in heterogeneous environments. *Journal of Mathematical Biology* 53: 939-975.
- Wright, S. (1931)** Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

- Wright S. (1939)** The distribution of self-sterility alleles in populations. *Genetics*, 24: 538-552.
- Wright, S. (1943)** Isolation by distance. *Genetics* 28: 114–138.
- Yamamoto, S., Maekawa, K, Tamate, T. et al. (2006)** Genetic evaluation of translocation in artificially isolated populations of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*). *Fisheries Research* 78: 352–358.
- Zane, L., Barceloni, L., Patarnello, T. (2002)** Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16.
- Zhang, D. e Hewitt, G.M. (2003)** Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects *Molecular Ecology* 12: 563–584.
- Zhang, S., Wang, D. e Zhang, Y. (2003)** Mitochondrial DNA variation, effective female population size and population history of the endangered Chinese sturgeon, (*Acipenser sinensis*) *Conservation Genetics* 4: 673-683.

### **III - Apêndices**









**>Pli66 (identificador 2E20)**

AGAGAGAGAGAGAAGTGTGTGGCTGCTACATTCCATTCCATACCTCTTTTACCCCTCGCTC  
**GCTCGTATAGAGCACATATGGCCT**ACATTTTCATACTTATATGTATATATACCTATACATATTC  
ATTTGTTTTTGTGTGTAAG**AGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGCGGAGAGAGAGAGAAA**  
GGAGCGCTTATTAACCTTTTCTACTACGGGGCCAACATGAATGAACATAACTATTTCTAATAC  
ACA**TGGGGAGCGTCCAGCTTCTACGGT**GTATAGAGATTTCGGGGCTTTTATCAGAGGGCAC  
TTAGGACACGGGCAGCTCACGAAACGCGAGTTCATTACTGATGACGGAGTCACACGAAAA

Direto

GCTCGTATAGAGCACATATGGCCT

Reverso

ACCGTAGAAGCTGGACGCTCCCCA

**Outros iniciadores não testados (todos 5'-3'):**

**Pli18 (identificador 2K20)**

Direto

GGATATCCCCTGTACTTGACAAA

Reverso

TTACATGGCCAAAAGTATCCGGA

**Pli19 (identificador 2I14)**

Direto

GGGCCGTTATTAGGACGGCA

Reverso

GCTTTTGTTGCGAAGCTGTCTGTC

**Pli21 (identificador 1U18)**

Direto

GGAAGAAGCTGGCTCGAAGACGT

Reverso

TACAGGGACATCAGTAGCTCGTT



**Pli23 (identificador 2D33)**

Direto  
GCTTACGGCTGACAGCATCCTGG

Reverso  
GTCAGTGTGCTGGTAGGAGC

**Pli24 (identificador 2E8)**

Direto  
GAGCACGAGAGGGTGCCATG

Reverso  
TGTCGCTCTGGATAAGAGCAGCTA

**6) Pli25 (identificador 2E10)**

Direto  
CCCACCTCATATCCTACAAGGACC

Reverso  
CATTGAGCTACACATTTGGCC

**7) Pli27 (identificador 2E29)**

Direto  
GAGTCTTAATGTGACTCCTGGAC

Reverso  
CTGGTGGAGGATGGTAGTTA

**8) Pli 29 (identificador 2F1)**

Direto  
TGAAGTCAAATCCAGCTTCAGGTG

Reverso  
CTGGTATCTAGAACAGCCCAC

**Apêndice B:**

**Tabelas de Frequência de Alelos de *Prochilodus lineatus***

**Amostra Populacional (N=95) coletada a jusante da AHE do Funil, Lavras, MG.**

<b>Pli30</b>		<b>Pli34</b>		<b>Pli60</b>	
(N)	88	(N)	85	(N)	84
Alelo	Freq.	Alelo	Freq.	Alelo	Freq.
1	0.0057	1	0.0647	1	0.0179
3	0.0057	2	0.4588	2	0.0536
4	0.0170	3	0.4059	3	0.1250
5	0.0114	4	0.0706	4	0.1310
6	0.0227			5	0.1905
7	0.0795	<b>Pli43</b>		6	0.1190
8	0.1023	(N)	92	7	0.0833
9	0.0341	Alelo	Freq.	8	0.0774
10	0.0398	1	0.0272	9	0.0893
11	0.1477	2	0.1141	10	0.0298
12	0.0909	3	0.1359	12	0.0060
13	0.0852	4	0.1685	13	0.0179
14	0.0739	5	0.1087	14	0.0119
15	0.1307	6	0.0435	15	0.0357
16	0.0625	7	0.0380	16	0.0060
17	0.0284	8	0.0652	17	0.0060
18	0.0057	9	0.0489		
19	0.0170	10	0.0707	<b>Pli61</b>	
20	0.0227	11	0.1033	(N)	81
21	0.0114	12	0.0109	Alelo	Freq.
25	0.0057	13	0.0163	1	0.3250
		14	0.0217	2	0.1375
		15	0.0217	3	0.5375
		17	0.0054		

## **Apêndice C:**

Manuscrito aceito para publicação na revista *Genetics and Molecular Research* volume 3 2007 (GMR 339)

**Title:** Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes).

**Running Title:** Prochilodus microsatellite.

**Authors:** Gabriel de Menezes Yazbeck<sup>1</sup> and Evanguedes Kalapothakis<sup>1</sup>.

**Author's affiliation:** <sup>1</sup> Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte Minas Gerais, CEP 31270-901.

**Corresponding author:** Evanguedes Kalapothakis, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte Minas Gerais, CEP 31270-901. Phone: +55 31 3499-2713, FAX +55 31 3499-2570, e-mail: [ekalapo@icb.ufmg.br](mailto:ekalapo@icb.ufmg.br)

## **Abstract**

We described five novel microsatellite loci for the piracema fish species *Prochilodus lineatus* (Characiformes), endemic to South America and of extreme importance to both commercial and artisanal fisheries across its occurrence area. A primary unriched genomic library was constructed and radioactively screened for repetitive motifs. Positive clones were automatically sequenced and upon the design of new primers, polymerase chain reaction (PCR) essays were carried out to determine optimum reaction and electrophoretic conditions for each characterized loci. We evaluated its usefulness in population genetic studies by analyzing Hardy-Weiberg Equilibrium (HWE),  $F_{IS}$  and a jackknife estimate of number of alleles for a sample of fish (N=95) caught below the Funil hydroelectrical power plant dam, Grande River, Brazil. Number of alleles varied from 3 to 21 and expected heterozigosity ranged from 0.58 to 0.91. Two out of five loci

were in HWE. Jackknife estimates of number of alleles were higher than the observed number of alleles for three loci and could provide a measure of sampling bias. Those markers should provide important tools for the determination of genetic structure, stock delimitation and reservoir fish management in the Grande River as well to improve hatcheries practices for environmental mitigation measures and help sustaining fisheries in the river.

**Keywords:** Microsatellites, Piracema species, *Prochilodus lineatus*, genomic library, jackknife estimate, fish.

## Introduction

Piracema is the term originally used by South American Tupi native nation to describe the reproductive migratory upstream run of freshwater species which takes place yearly, during the high rainy season (which in southeastern Brazil extends from circa October - March). Today it is commonly used to refer to Brazilian freshwater migratory fish, which constitutes a major group of species of high relevance to local fisheries and riverine ecosystems. *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836 – Prochilodontidae: Characiformes) is a piracema species which occurs in the Paraná-Paraguay and Paraíba do Sul hydrographic basins in South America (Castro & Vari, 2003). It is a medium sized, potamodromous, benthopelagic, detritivorous species and has been recorded to carry through migratory movements of as much as 1.200km/year (Godoy, 1975) and to reach up to 75 cm in total length (Castro and Vari, 2003). Previous population genetics studies of *P. lineatus* focused on mtDNA markers (Sivasundar *et al.*, 2001) and on allozymes (Revaldaves, 1997), pointed to a highly variable genetic diversity and lack of population structure within their respective analyzed geographic scales.

The Grande River is a major river in southeastern Brazil (~1300 km long), forming part of the Paraná-Paraguay basin and which is heavily impounded by a succession of 12 hydroelectrical power plant dams (Paiva *et al.* 2002). Because of the environmental impact caused by those dams, the Grande River has been target of intense restocking programs with *P. lineatus*, which are carried as environmental impact mitigation measures. There are two main hatcheries in activity in the Grande River (Furnas and Volta Grande). However stocking programs still lack deeper ecological and genetic assessments to evaluate its efficiency and best practices conduct (*e.g.* avoiding using fish from distinct river basins, avoid use of very few broodstock founders used in hatcheries). Therefore, the characterization of molecular markers, aiming populational genetic studies of piracema fish, is of critical interest for conservation actions and fisheries management efficiency.

This study aims the isolation of useful microsatellite loci to the population study of the Brazilian piracema species *P. lineatus* which plays a very important role in fisheries in the Grande River, MG, Brazil (Castro and Begossi, 1995) and in other river basins as well (Petriere, 1989).

## **Material and Methods**

### Microsatellite Isolation

A primary genomic library of *P. lineatus* was constructed according to the following steps: total genomic DNA was extracted from 3 g of muscle tissue. Macerated tissue was put into TEN9 (Tris-EDTA pH 9.0, NaCl) buffer with 0.1% SDS and 5 mg of proteinase K before it was incubated at 50°C for 12 hours. Extractions were carried out with phenol (pH 7.4), phenol-chlorophorm (1:1) and then. chlorophorm and standard precipitations and quantification were made. The genomic DNA was then digested with Sau3A1 and small fragments (< 400 bp) removed using Sepharose 400 and Sephacryl 400 columns (GE Helthcare). The genomic DNA was than ligated in the pUC18 vector previously treated with BamH I, alkaline phosphatase and purified from the agarose gel. After transformation and selection (ampicillin and IPTG/x-gal), 2,000 white colonies were collected and inoculated in 1 mL of 2XYT liquid medium with ampicillin and incubated at 37°C for 8-12 hours, prior to alkaline cell lysis and plasmid purification. Individual plasmids were spotted in a nylon membrane and screened for simple sequence interactions with 5'- end labeled 16 bp oligonucleotides (repeat motives: GATA, TATC, GACA, GGAT, TATT, TACT, CGGA, GTCA, CCGT, GAGG, GATT, CATG, CCAG, CATG, CCAG, CTTG, CAGC, TATG, TAGT, AAGT, AAGT, CAT, CAC, GTA, GAA, AAT, CTT, CAC, CCG, CAG, CA, CT and TA). Oligo labeling was carried out with radioactive [ $\gamma^{32}\text{P}$ ] ATP (10 mCi/mL – GE Healthcare) using T4 kinase (5' Labelling kit, GE Healthcare). After pre-hybridization (6X SSC (NaCl 0.9 M, sodium citrate 0.09 M), 0.1% SDS and 5% BLOTO) membranes were incubated with hybridization buffer (6X SSC and 0.1% SDS) containing 5ng/mL of labeled probes for 14 h at 48°C. The membranes were then washed and exposed to autoradiography films (35 x 43 cm Kodak T-Mat G/RA) at -80°C for variable periods (4-24h). Subsequently to each exposure, the membranes were washed in SSC buffer with varying conditions: increased temperatures (50°C to 55°C) and diminishing salt concentrations (5X to 2X SSC) to progressively increase the hybridization stringency and for control of false positive signals. Positive clones were spotted in a new membrane and subject to a confirmatory hybridization. The resulting positive clones were used to transform TG1 *E. coli* cells and after purification, plasmids were submitted to sequencing in an MegaBace 96 capillar automatic sequencer, using

DYEnamic ET Terminator Dye kits (GE Healthcare) and M13 primers (M13 –20: GTAAAACGACGGCCAGT and M13 reverse: GGAAACAGCTATGACCATG). Sequences were screened for microsatellites using Tandyman (<http://hpv-web.lanl.gov/tandyman/index.html>; Robert Leach unpublished) and were further sequenced in both directions so consense contigs could be built using Phred/Phrap/Consed (Ewin and Green, 1998; Gordon *et al.*, 1998). Using specific primers (5 pmols of each), microsatellite PCR products were screened for polymorphisms on 6-10% polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) performed with 2X TAE for 16h at 75V and stained with silver nitrate (Sambrook and Russell, 2001). Annealing temperature ranging from 50-70°C and Taq DNA polymerase (0.5 U of DNA Taq Polymerase (Phonutria), buffer IVB) were used. Gels were photographed and then scored with aid of a 25bp DNA ladder. PCR product fragment sizes were determined using the LabImage<sup>®</sup> software (Kaplan, Halle, Germany), grouped into allelic bin classes automatically with aid of William Amos's algorithm (Amos *et al.*, 2007) and then manually checked.

### **Statistical analysis**

Population genetics analyses were carried out using Genpop 3.4 (Raymond and Rousset, 1995). Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) tests were conducted by the Markov Chain Monte Carlo method (Guo and Thompson, 1992) and the complete enumeration method for loci with four or less alleles (Louis and Dempster, 1987).  $F_{IS}$  values were calculated by Weir and Cockerham's estimator (1984). We used a jackknife resampling procedure (Efron, 1981) - jackknifing over individuals - to estimate the number of alleles and generate 95% confidence intervals. We also carried out an accumulation curve analysis to evaluate sample size effect in jackknife estimation of the number of alleles for each locus. These routines were done with the EstimateS computer program (Cowell, 2000) treating alleles as biological species and individuals as sampling unities.

### **Population sampling.**

We extracted genomic DNA from 95 *P. lineatus* individuals caught right below the Funil Hidrelétrica Power Plant dam (45° 02' 16" W and 21° 08' 36" S) in the Grande River, Minas Gerais, Brazil in December 2005, during the piracema run. Fish were net trapped and a small fin clip (1 cm<sup>2</sup>) was collected in a tube containing 70% ethanol. DNA extraction was made using 5% Chelex, 0.1% Tween-20 and 2 µg Proteinase K.

## Results

Approximately 5.9% of the spotted plasmids showed positive hybridization to the pool of primers used in the radioactive screening. Sixty seven positive clones were sequenced, from which 46 (68.6%) sequences showed at least a short microsatellite motif. Fifteen sequences were selected for primers construction. Upon PCR amplification two loci showed monomorphic patterns, eight exhibited unspecific or uneven amplifications and five were successfully standardized for populational analysis.

The five isolated loci were given names that started with the *Pli* prefix (from *P. lineatus*) followed by the clone number: Pli30, Pli34, Pli43, Pli60 and Pli61. Table 1 shows primer sequences, microsatellite motifs, amplicon size range, annealing temperature and acrylimide gel concentrations for each locus. Amplified fragments ranged from 130-360 bp.

The novel microsatellite loci were applied to a population sample to evaluate their usefulness to population genetic analysis. Individual sample amplification success ranged from 85-97% (N=95) among the five loci. The observed number of alleles ranged from 3 to 21. Jackknife estimates of number of alleles were higher than the observed number of alleles, three out of five times (Table 2 and Figure 1). Jackknife estimators might indicate the existence of non-sampled alleles in a population due to sample size and/or sampling bias. Figure 1 shows 95% confidence intervals of number of alleles. Confidence interval bars which overlap another locus' jackknife estimate do not show statistical differences in number of alleles (i.e. Pli43 and Pli60). Figure 2 shows the effect of sampling size in jackknife estimates of number of alleles. The accumulation curve is plotted with randomized sample subsets, starting by sampling only one individual and estimating the number of alleles (i.e. one or two) and by subsequently adding one more individual to the sample and recalculating this value. Thus Pli34 and Pli61 which showed the smaller number of alleles (four and three respectively) quickly reach a plateau after few individuals are sampled. The shape of the curves for Pli30 and Pli60 suggest that further sampling might reveal new rarer alleles for those loci.

Table 2 also shows expected and observed heterozigoties, exact p values for HWE tests ( $\alpha=0.05$ ),  $F_{IS}$  estimates and sample sizes. Expected heterozigoties ranged from 0.58 to 0.91, for the less and most polymorphic markers, respectively. Only two loci, Pli43 and Pli61, showed HWE ( $p>0.05$ ). Two out of the remaining three loci, Pli30, and Pli60, displayed heterozigotes deficit ( $p=0.0001$ ). Heterozigote deficit could be a sign of the presence of null alleles segregating or population sub-structuring (mixed stock).  $F_{IS}$ , the inbreeding coefficient, values ranged from -0.05 to 0.36. Negative  $F_{IS}$  values can be indicative of heterozygote excess,

what was not the case with our data ( $p > 0.5$ ), nevertheless, and thus these values should be regarded as zeros.

No possible loci pair showed linkage disequilibrium. Complete statistics summary for linkage disequilibrium test can be seen in Table 3.

## Discussion

The *P. lineatus* genomic library developed in this study showed a higher percentage of positive clones (5.9%) than the average (3.1%) reported by Zane *et al.* (2002) for fish, when using similar methods as employed here. The genomic library was constructed for this species, with genomic fragments above 400 bp. This library can be screened for other genes of potential interests. Many positive clones are still to be sequenced in search of new microsatellite markers. A large percentage (almost 69%) of positive sequenced clones showed inserts with repetitive motifs. Other di and tetranucleotides were found as well as some trinucleotides. Some rarer microsatellite motifs such as octa and hepta and hexanucleotide were also found, as well as two minisatellites (12 and 13 bp repetition blocks - results not shown). Approximately 52% of observed microsatellites motifs observed were dinucleotides (CA/GT and GA/CT).

Five microsatellites have shown to produce diploid, polymorphic amplification patterns under tested conditions. Loci Pli30 and Pli34 have tetranucleotides core sequences, Pli30 being an imperfect complex sequence. Loci Pli43, Pli60 and Pli61 showed dinucleotide motifs, Pli61 displaying a small interruption on its core. Pli30 also showed the broader variation in PCR product length (~160-360 bp) with the most prevalent allele being 225 bp long. Annealing temperatures were rather high (up to 69°C) due to primers' GC content and length.

Those loci proved to be informative for population genetics analysis. Most out of 95 individuals used in population analysis responded positively to PCR essays, being the poorest result observed at Pli61, where 81 of individuals (85%) showed amplification. This is probably due PCR sensibility to DNA concentration, which can vary considerably among individuals in a Chelex DNA extraction. Number of alleles varied from 3 to 21. The observation of number of alleles, as well as their frequencies, depends critically on the binning method chosen (Amos *et al.*, 2007). We opted for using Amos' automated procedure (2007) and manually check for bin class assignments. Alternatively, we applied a jackknife estimator to determine number of alleles (Table 2), because of their usefulness in accessing sample bias and their robustness in generating confidence intervals (Mooney and Duval, 1993). When sampling different individuals systematically reveal new alleles, confidence intervals are broader (e.g. Pli30 and Pli60) because standard deviations are higher (Figure 1). For the less polymorphic loci Pli34 and Pli61,



only a handful of individuals are needed to sample the different kind of alleles present in the population (although many more might be necessary to an accurate estimation of their frequencies), thus number of alleles estimates are precise at our sampling size. Figure 1 also shows that Pli43 and Pli60 do not exhibit statistical difference for number of alleles, even though jackknife estimates vary if compared with the observed number of alleles. It is interesting to note, on Figure 2, that before a critical level is attained, the jackknife estimator actually slightly overestimates the number of alleles for Pli34 and Pli61, an effect probably due to sampling bias (insufficient sampling). The shapes of the accumulation curves on Figure 2 for Pli30 and Pli60 do not seem to stabilize at our actual sample size. This could mean that, due to sampling bias, further sampling of the population might likely reveal new rarer alleles.

Pli30 and Pli60 were also the two loci to exhibit steep heterozygote deficit ( $p=0.0001$ ) and highest inbreeding coefficients (0.11 and 0.36 respectively). This could be attributed to the presence of null alleles on those loci, the existence of population sub-structuring on our sample (Wahlund effect) or a reflection of highly inbred individuals in the river due to hatcheries broodstock fish on the Grande River, which are produced at large amounts of fish, from a small number of spawners (genetic bottleneck). The presence of null alleles might be addressed with paternity tests, with fish from hatcheries. The presence of sub-structuring is a plausible possibility since fish were caught right below Funil's dam which mean that fish from different tributaries or region of the Grande River could be meeting before the attempt to mount the river towards their spawning waters. The Funil Hydroelectrical Power Plant started its commercial activities in 2002 and counts mainly on a fish elevator to take fish from below to above the dam, although the system seems to be more effective for smaller species such as the mandi species (*Pimelodus maculatus*) – personal observation. The effects of inbreeding due to few spawners in hatchery facilities in the Grande River is also possible, although we would expect a more spread effect among the other loci, since endogamy promotes increasing homozygosities across all loci simultaneously. Further scrutiny of those hypotheses will need additional information and sampling of different populations, on the hatcheries and in the river. No pair of loci exhibited linkage disequilibrium, indicating they all must segregate independently from each other.

The genetic markers described here will provide useful tools in the monitoring of *P. lineatus* population genetic structure, genetic diversity, in the river as well as in hatchery facilities and it can be used on the evaluation of broodstocking success and their relevance in maintaining a substantial fish biomass for riverine populations, commercial and artisanal fisheries in the Grande River and other basins.

## Acknowledgements

This work was funded by CT-HIDRO/CNPq which also included a doctoral scholarship to Gabriel de M. Yazbeck. Authors would like to extend their thanks to Alexandre L. Godinho, the personnel at the Fish Passage Center (CTP/UFGM), R. John Nelson (University of Victoria, BC) and to Joachim Carolsfeld, Brian Harvey and the personnel at the World Fisheries Trust (BC).

## Bibliography

Amos W, Hoffman JI, Frodsham A, Zhang, JI, Best, S *et al.* (2007). Automated binning of microsatellite alleles: problems and solutions. *Molecular Ecology Notes* 7: 10-14.

Castro, F. and Begossi, A (1995). Ecology of fishing on the Grande River (Brazil): technology and territorial rights. *Fisheries Research* 23: 361-373.

Castro, F. and Begossi, A (1996). Fishing at Rio Grande (Brazil): Ecological and Competition. *Human Ecology*. 24: 401-411

Castro, R.M.C. and. Vari, R.P (2003). Prochilodontidae (Fannel mouth characiforms). 65-70. In: Reis RE, Kullander SO and Ferraris Jr CJ (eds.). Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipucrs, Porto Alegre, SC, Brasil.

Colwell RK, (2000). EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 6 Beta. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>

J.F. Crow, "Population genetics history: a personal view," *Annual Review of Genetics* 21 (1987): 1-22.

Efron B (1981). Nonparametric estimates of standard error: the jackknife, the bootstrap and other methods, *Biometrika*, 68: 589-599.

Ewing B and Green P: (1998). Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8: 186-194.

- Godoy, MP (1975). Peixes do Brasil, sub-ordem Characoidei da Bacia do Rio Mogi Guassú. Editora Franciscana, Piracicaba, SP, Brasil
- Gordon D, Abajian C and Green P (1998). Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Research* 8: 195-202.
- Guo SW and Thompson EA (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Louis EJ and Dempster ER (1987). An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. *Biometrics* 43: 805-811.
- Mooney CZ, and Duval R D (1993). Bootstrapping: A nonparametric approach to statistical inference. Sage Publications. Newbury Park, CA, USA.
- Neraas LP and Spruell P (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology* 10: 1153–1164.
- Paiva, MP, Andrade-Tubino MF and Godoy, MP (2002). As represas e os peixes nativos do rio Grande. Interciência, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.
- Petrere M (1989). River Fisheries in Brazil: a review. *Regulated Rivers: Research and Management*. 4: 1-16
- Raymond ML and Rousset F (1995). An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.
- Revaldaves E and Renesto E (1997). Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes:Prochilodontidae) in the upper Paraná River. *Brazilian Journal of Genetics*, 20: 381-388.
- Sambrook J and Russell D (2001). Molecular cloning: A laboratory manual, 3<sup>rd</sup> Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.

Schlötterer, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, v. 109(6):, p. 65-71, set 2000.

Sivasundar A, Bermingham E and Ortí G (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Molecular Ecology* 10: 407-418.

Weir BS and Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.

Zane L, Bargelloni L and Patarnello T (2002) Strategies for microsatellite isolation: a review *Molecular Ecology* 11: 1–16.

[Tabelas e figuras omitidas]

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)