

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**  
**JULIANA VIANA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA TABARANA,  
*Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characiformes: Characidae)  
DA BACIA DO ALTO PARANÁ POR MARCADORES  
MICROSSATÉLITES**

**Mogi das Cruzes, SP**  
**2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES**  
**JULIANA VIANA DA SILVA**

**CARACTERIZAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA DA TABARANA,  
*Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characiformes: Characidae)  
DA BACIA DO ALTO PARANÁ POR MARCADORES  
MICROSSATÉLITES**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Ciências Biológicas

**Orientador: Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf**

**Mogi das Cruzes, SP**

**2009**

### FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Silva, Juliana Viana da

Caracterização da diversidade genética da tabarana, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (*Characiformes* : *Characidae*) da Bacia do Alto Paraná por marcadores microssatélites / Juliana Viana da Silva. – 2009.

114 f.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) -  
Universidade de Mogi das Cruzes, 2009

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

1. Tabarana 2. *Salminus hilarii* 3. Microssatélites 4.  
Genética da conservação I. Hilsdorf, Alexandre Wagner  
Silva

CDD 597

### ATAS

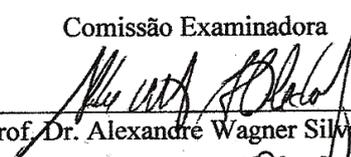
#### ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE APRESENTAÇÃO DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES

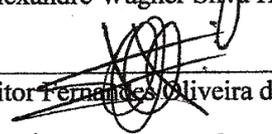
Às catorze horas do dia catorze de agosto de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Caracterização da diversidade genética da tabarana, *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) (Characiformes: Characidae) da Bacia do Alto Paraná por marcadores microsatélites" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Juliana Viana da Silva**. Tendo sido o número de créditos alcançados pelo(a) mesmo(a) no total de 56 (cinquenta e seis), a saber: 32 unidades de crédito em disciplinas de pós-graduação e 24 unidades de crédito no preparo da dissertação, o(a) aluno(a) perfaz assim os requisitos para obtenção do grau de Mestre. A Comissão Examinadora estava constituída dos Senhores Professores Doutores Alexandre Wagner Silva Hilsdorf e Vitor Fernandes Oliveira de Miranda da Universidade de Mogi das Cruzes e Claudio de Oliveira da Universidade Federal de São Paulo, sob a presidência do(a) primeiro(a), como orientador(a) da dissertação. A Sessão Pública da defesa de dissertação foi aberta pelo Senhor Presidente da Comissão que apresentou o(a) candidato(a). Em seguida o(a) candidato(a) realizou uma apresentação oral da dissertação. Ao final da apresentação da dissertação, seguiram-se as arguições pelos Membros da Comissão Examinadora. A seguir a Comissão, em Sessão Secreta, conforme julgamento discriminado por cada membro, considerou o(a) candidato(a)

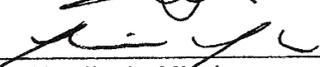
APROVADA por UNANIMIDADE  
 (aprovado(a)/reprovado(a)) (unanimidade/maioria)

Mogi das Cruzes, 14 de agosto de 2009.

Comissão Examinadora

  
 Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

  
 Prof. Dr. Vitor Fernandes Oliveira de Miranda

  
 Prof. Dr. Claudio de Oliveira

Julgamento

APROVADA  
 (aprovado(a)/reprovado(a))

  
 (aprovado(a)/reprovado(a))

APROVADA  
 (aprovado(a)/reprovado(a))

## DEDICATÓRIA

*Meus queridos pais, Francisco e Vera, a quem eu devo tudo o que sou. A vocês, que revestiram minha existência de amor, carinho e dedicação para que eu prosseguisse sem medo. A vocês, que me incentivaram quando tudo parecia impossível e inatingível. Com muito amor e carinho, dedico esta vitória a vocês!*

## AGRADECIMENTOS

*Finalmente, chegou o tão esperado momento de agradecer a todos que me ajudaram no decorrer dessa trajetória. E que trajetória hein, rs! Peço desculpas, desde já, se por ventura me esqueci de citar alguém.*

*Primeiramente, agradeço a Deus, pois sem ele nada disso seria possível!*

*Agradeço, em especial, ao meu orientador professor Dr. Alexandre Hilsdorf, exemplo de profissionalismo, pela confiança depositada e por ter me proporcionado a oportunidade, como ele mesmo diz de “fazer ciência”. A você, os mais sinceros agradecimentos, e muito obrigada por todo apoio dado ao longo desses quatro anos que trabalhamos juntos.*

*Aos professores do curso de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, em especial as professoras Dra. Maria Santana e Dra. Regina.*

*Ao professor Dr. Cláudio de Oliveira, da Unesp de Botucatu, por ceder gentilmente, às amostras de tabarana do rio Paranapanema e por aceitar o convite de participar da banca de defesa.*

*Às professoras Dra. Anete e Dra. Maria Zucchi e monitores do curso de verão do CBMEG, da Unicamp, pelos valiosos ensinamentos em bibliotecas enriquecidas em microssatélites.*

*Aos professores Dr. Vitor e Dr. Wellington pelas valiosas sugestões dadas durante a qualificação, em especial ao professor Vitor, por aceitar o convite de participar da banca de defesa.*

*Ao professor Dr. Cláudio Shida, pelo auxílio no programa de estatística.*

*À minha família e familiares por compreender e respeitar minhas ausências e momentos de angústia. Em especial meus pais (a quem os amo muito), não tenho palavras para agradecer tudo o que vocês fizeram por mim, não somente nesta fase da minha vida, mas em todas as outras, vocês sempre foram muito presentes. A minha querida irmã Má, que cuidou de mim naquela louca semana escrevendo para qualificação (se não fosse você eu não sairia daquele quarto) e ao meu anjinho Gigi, que esperava eufórica por um final de semana livre para passearmos juntas; a tia Dinha (minha segunda mãe) por todo o carinho e cuidado comigo.*

*Às minhas eternas amigas Fafá, Ju, Rô, e Lílica, por me entenderem quando eu sumia de uma hora para outra, em função de estar enrolada com o mestrado. Realmente alguns amores são mesmo eternos!*

*Às queridas amigas que tornaram minhas manhãs, tardes, noites e algumas madrugadas mais especiais. Assim chamadas por problemas de dictionário adquiridos no decorrer do mestrado: Calol (Carol), Colina (Corina), Vâni (Fabiana), Fefê (Fernanda), Karlita (Karla), Paolha (Paola), Sala "Cristina" (Sara), Tamachan (Tamara), Tacty (Tatiane). Meninas, sempre me lembrarei dos momentos maravilhosos que passamos juntas e porque não dizer dos medos e incertezas também. Muito obrigada por tudo, em especial a você Taty como você dizia "não éramos nada uma sem a outra"!*

*Aos amigos, eternos núbianos, Nê e Gú aqueles que posso chamar de "todinhos", rs...meus companheiros de aventuras e de Autobahn.*

*À amiga Angela, pessoa de caráter inquestionável, obrigada pela amizade e a paciência que você teve para me ensinar toda a parte prática em microssatélites.*

*Às amigas de república Paty e Carolzinha que mesmo não morando mais juntas, ainda assim, continuam sendo parte da minha família.*

*À Márcia e Luísa, por me acolherem gentilmente em sua casa. Não tenho palavras para agradecer o grande favor que me fizeram.*

*Aos colegas do LGM e do laboratório de virologia, companheiros núbianos presentes tanto nas horas boas como ruins dos experimentos Alex, César (agora CIIB), Robson, Cris (Alexandre), Cris (fungo), Maristela, Emy, Marília, Almir, Felipe, Flavinha, Aline e Fenandas (Agrônoma, Fê louira, Molécula e Storte).*

*À “mígaaaa” (Fabi) por me visitar no laboratório todas as terças e quartas sempre aguentando meus piores momentos de estresses, além é claro, de me engordar também rs, trazendo bolos e doces para me alegrar. Muito obrigada. Sua ajuda foi fundamental para me acalmar na qualificação.*

*Aos amigos que foram especiais na minha formação da graduação e não deixaram de ser participativos na minha formação como mestre, Alexei, Carina, Moisés, Tiago e Vanessa.*

*E por fim, aos meus peixinhos lindos que contribuíram para este estudo.*

*Muito obrigada!!!*

“Seja a mudança que você quer ver no mundo”

**Dalai Lama**

## RESUMO

Pertencente a família Characidae, a tabarana (*Salminus hilarii*) é uma espécie de piracema de grande importância ecológica que habita os rios das principais bacias hidrográficas brasileiras, entre elas, a do Alto Paraná. Atualmente, a espécie corre o risco de redução em suas populações em função de ações antrópicas, como o barramento dos rios e a poluição, resultando assim em perdas sobre a diversidade genética. Estudos utilizando marcadores genéticos e moleculares têm sido aplicados na identificação da diversidade e estrutura genética das espécies de peixes neotropicais. No presente estudo foram utilizados marcadores moleculares do tipo microssatélites para avaliar a diversidade e a estrutura genética de populações de *Salminus hilarii*, distribuídas em três rios que compõem a Bacia do Alto Paraná. Para isso, foram coletadas amostras de tecido muscular de 151 tabaranas, provenientes dos rios Tietê, Paranapanema e Rio Grande (nas regiões de Igarapava e Lavras). O DNA total foi extraído com o protocolo fenol/clorofórmio e amplificado utilizando cinco *primers* microssatélites (Sh01; Sh05; Sh10; Sh12 e Sh16) desenvolvidos para a espécie. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 9%, corado com nitrato de prata e fotodocumentado. Os alelos foram genotipados com o uso do programa Alpha Index 6.5 e as análises estatísticas conduzidas por meio dos programas Arlequin 3.01, FSTAT e GenePop. A estrutura genética das populações foi analisada por meio da AMOVA, baseada nas estimativas de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ . Os cinco *loci* estudados foram polimórficos para a espécie, apresentando heterozigosidade observada de 0,928 ( $\pm 0,07$ ) a 0,966 ( $\pm 0,03$ ) para as quatro populações analisadas. O número de alelos encontrados foi alto de 10 a 19 alelos por *loci* e a média da riqueza alélica variou de 10,98 ( $\pm 1,47$ ) a 12,63 ( $\pm 3,12$ ). A análise de AMOVA mostrou que a maior parte da variabilidade genética (98,08%) encontra-se dentro de cada local amostrado e apenas 1,92% entre elas. O valor de  $F_{ST} = 0,01921$  ( $p < 0,01$ ), altamente significativo, demonstra que há uma baixa estruturação entre as populações. Nas análises par a par os valores de  $F_{ST}$  mostraram que entre as localidades de Lavras e Tietê há maior diferenciação genética e menor entre as comparações de Lavras e Paranapanema. Apesar da separação geográfica e física, devido a diversas barragens construídas ao longo da Bacia do Alto Paraná, as populações analisadas apresentaram baixos valores significativos de  $F_{ST}$  entre populações. Isto sugere que os mecanismos de isolamento ainda não refletiram de forma acentuada em uma maior diferenciação destas populações.

**Palavras-chave:** Tabarana, *Salminus hilarii*, microssatélite, conservação genética.

## ABSTRACT

Tabarana (*Salminus hilarii*), a Characidae species, inhabits Rivers of the main Brazilian drainages, which includes the Upper Parana River basin. It is a migratory species and plays an important role on the food chain in the freshwater ecosystem. Populations of this species are currently jeopardized due to anthropic actions such as construction of dams and pollution of rivers. Such environmental modifications may result in genetic variability lost. Studies using molecular markers have been carried out to identify genetic diversity and population structure of neotropical fish species. In the present study microsatellite molecular markers were used to evaluate genetic diversity and structure of *Salminus hilarii* populations from three rivers in Upper Parana River basin. Fin clipping and muscle tissue samples of 151 tabaranas from the Tiete, Paranapanema and Rio Grande rivers (Igarapava and Lavras regions) were collected. Total DNA extraction was performed with phenol/ chloroform protocol and DNA amplification used five microsatellite primers (Sh01, Sh05, Sh10, Sh12 and Sh16) developed for *S. hilarii*. Amplification products were analyzed by electrophoresis in 9% polyacrylamide gels, detected by silver nitrate staining and then photodocumented. Alleles genotyping was performed using Alpha Index 6.5 software and statistical analysis were conducted using Arlequin 3.01, FSTAT and GenePop softwares. Population genetic structure was investigated using  $F_{ST}$ ,  $R_{ST}$  estimates as well as AMOVA. All five *loci* used in this study were polymorphic with observed heterozygosity ranging from 0,928 ( $\pm 0,07$ ) to 0,966 ( $\pm 0,03$ ) in the four population surveyed. The number of alleles per *locus* for the five *loci* used herein was high ranging from 10 to 19 alleles per *locus* and the allelic richness average was 10,98 ( $\pm 1,47$ ) to 12,63 ( $\pm 3,12$ ). AMOVA analysis showed that most of genetic diversity (98.08%) is within sampled location and only 1.92% genetic diversity is between them. High significant  $F_{ST}$  value (0.01921  $p < 0,01$ ) indicates a low genetic differentiation between populations.  $F_{ST}$  pairwise analysis values demonstrated the highest genetic differentiation is between Lavras and Tietê and lowest between Lavras and Paranapanema. Despite physical obstacles due to the various dams built throughout the Upper Parana River basin, the *S. hilarii* populations evaluated in the present study show low genetic differentiation, suggesting that the isolation mechanisms haven't significantly reflected on population structuring, yet.

**Keywords:** Tabarana, *Salminus hilarii*, microsatellite, genetic conservation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Tabarana ( <i>Salminus hilarii</i> ).....	20
<b>Figura 2.</b>	Mapa do Brasil evidenciando a distribuição geográfica da tabarana (modificado de Lima, 2006).....	23
<b>Figura 3.</b>	Mapa hidrográfico do Brasil, indicando os rios de coleta de tabarana.	31
<b>Figura 4.</b>	Pipetagem do meio 2YT-HMFM .....	38
<b>Figura 5.</b>	Seleção de colônias positivas.....	38
<b>Figura 6.</b>	Gel de agarose 0,8% com DNA genômico extraído do tecido muscular de <i>Salminus hilarii</i> corado com brometo de etídeo .....	46
<b>Figura 7.</b>	Imagem da eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA após digestão com enzima de restrição <i>Rsa I</i> .....	47
<b>Figura 8.</b>	Eletroferograma do clone 2 enfocando microssatélites TG .....	48
<b>Figura 9.</b>	Gel de poliacrilamida 9% para o <i>locus</i> Sh05 .....	51
<b>Figura 10.</b>	Gel de poliacrilamida 9% para o <i>locus</i> Sh10 .....	51
<b>Figura 11.</b>	Médias de riqueza alélica e heterozigosidade esperada de cada local amostrado .....	57
<b>Figura 12.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Sh01 .....	57
<b>Figura 13.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Sh05 .....	58
<b>Figura 14.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Sh10 .....	58
<b>Figura 15.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Sh12 .....	59
<b>Figura 16.</b>	Frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Sh16 .....	59
<b>Figura 17.</b>	Dendograma com os valores de <i>bootstrap</i> obtido a partir de dados de microssatélites, por meio do método UPGMA, com base nos valores de distância genética de Nei (1978) encontrados entre populações de <i>S. hilarii</i> da bacia do Alto Paraná .....	62
<b>Figura 18.</b>	Resultados do Structure mostrando os valores de LnP(D) em relação ao número de populações (k) testadas. ....	64

**Figura 19.** Resultados do Structure mostrando os valores de ( $\Delta K$ ) em relação ao número de populações (k) testadas .....65

**Figura 20.** Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam cada população .....65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Áreas de coleta e número de animais coletados de tabarana. ....	31
<b>Tabela 2.</b>	Condições de amplificação .....	41
<b>Tabela 3.</b>	Condições de amplificação <i>touchdown</i> .....	42
<b>Tabela 4.</b>	<i>Primers</i> para a espécie <i>Salminus hilarii</i> . ....	49
<b>Tabela 5.</b>	Condições de amplificação para os <i>loci</i> .....	50
<b>Tabela 6.</b>	Relação dos alelos encontrados no locus Sh01 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições .....	52
<b>Tabela 7.</b>	Relação dos alelos encontrados no locus Sh05 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições .....	53
<b>Tabela 8.</b>	Relação dos alelos encontrados no locus Sh10 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições .....	53
<b>Tabela 9.</b>	Relação dos alelos encontrados no locus Sh12 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições .....	54
<b>Tabela 10.</b>	Relação dos alelos encontrados no locus Sh16 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições .....	54
<b>Tabela 11.</b>	Resumo estatístico da diversidade genética de 5 loci microssatélites de <i>Salminus hilarii</i> em 4 locais amostrados: número de alelos (A), riqueza alélica ( $A_R$ ); heterozigosidade observada ( $H_O$ ) heterozigosidade esperada ( $H_E$ ); equilíbrio de Hardy Weinberg (PHW); coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).....	56
<b>Tabela 12.</b>	Diferenciação genética utilizando os índices $F_{ST}$ (diagonal inferior) e $R_{ST}$ (diagonal superior) entre pares de populações de <i>Salminus hilarii</i> para todos os <i>loci</i> estudados.....	61
<b>Tabela 13.</b>	Diferenciação genotípica estimada pelo teste exato de Fisher entre populações de <i>Salminus hilarii</i> .....	61

<b>Tabela 14.</b>	Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o $F_{ST}$ e considerando todas as populações de <i>Salminus hilarii</i> em um mesmo grupo .....	63
<b>Tabela 15.</b>	Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o $R_{ST}$ e considerando todas as populações de <i>Salminus hilarii</i> em um mesmo grupo .....	63

## LISTA DE ABREVIações

<b>AgNO<sub>3</sub></b>	Nitrato de Prata
<b>dNTP</b>	Desoxiribonucleotídeo (A, G, C, ou T)
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenoaminotetracético
<b>EHW</b>	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<b>Fis</b>	Coeficiente de Endogamia
<b>F<sub>ST</sub></b>	Índice de diferenciação entre grupos
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>IAM</b>	Modelo de Alelos Infinitos, do inglês Infinite Allele Model
<b>IPTG</b>	Isopropil tiogalactosídeo
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio
<b>mM</b>	Milimolar
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de Sódio
<b>ng</b>	Nanogramas
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PA</b>	Persulfato de Amônio
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase, do inglês Polymerase Chain Reaction
<b>RNAse</b>	Enzima que degrada o Ácido Ribonucléico
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês: Sodium Dodecyl Sulfate
<b>SMM</b>	Modelo de Mutação Passo-a-passo, do inglês Stepwise Mutation Model
<b>SSC</b>	Solução Padrão de Citrato Salino, do inglês Standard Saline Citrate
<b>SSR</b>	Repetições de Seqüências Simples, inglês Simple Sequences Repetition
<b>Taq</b>	Enzima termoestável derivada da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
<b>TBE</b>	Solução tampão constituída de Tris, Ácido Bórico e EDTA
<b>TEMED</b>	Tetrametiletilenodiamino
<b>UV</b>	luz ultravioleta
<b>W</b>	Oeste, do inglês West

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
1.1 BIODIVERSIDADE DE PEIXES NEOTROPICAIS, COM ÊNFASE NA BACIA DO ALTO PARANÁ .....	17
1.2 GÊNERO <i>SALMINUS</i> .....	19
1.2.1 Tabarana ( <i>Salminus hilarii</i> ).....	20
1.3 MARCADORES MOLECULARES.....	24
1.3.1 Marcadores microsatélites.....	25
1.3.2 Aplicação de marcadores moleculares em peixes neotropicais.....	28
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>30</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>3 MÉTODO</b> .....	<b>31</b>
3.1 LOCAIS DE COLETA.....	31
3.1.1 Bacia do Alto Rio Paraná.....	32
3.1.1.1 <i>Sub-bacia do Rio Grande</i> .....	32
3.1.1.2 <i>Sub-bacia do Rio Paranapanema</i> .....	32
3.1.1.3 <i>Sub-bacia do Rio Tietê</i> .....	32
3.2 COLETA DE TECIDOS.....	32
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	32
3.4 ISOLAMENTO DE REGIÕES DE MICROSSATÉLITE.....	34
3.4.1 Construção da biblioteca genômica enriquecida em microsatélite .....	35
3.5 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO PARA A ESCOLHA DOS <i>LOC</i> / MICROSSATÉLITE E ANÁLISE POPULACIONAL.....	40
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	43
3.6.1 Variabilidade genética .....	43
3.6.2 Estrutura genética .....	44
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL .....	46
4.2 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA.....	47

4.2.1 Testes de amplificação dos microssatélites .....	49
4.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL .....	52
4.3.1 Análise intrapopulacional .....	52
4.3.1.1 Alelos encontrados em cada <i>locus</i> microssatélite.....	52
4.3.1.2 Diversidade alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	55
4.3.1.3 Frequências alélicas .....	57
4.3.1.4 Efeito gargalo .....	60
4.3.2 Análise interpopulacional .....	60
4.3.2.1 Diferenciação genética.....	60
4.3.2.2 AMOVA (Análise de Variância Molecular).....	62
4.3.2.3 Estruturação populacional e fluxo gênico.....	64
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>66</b>
5.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	66
5.2 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA.....	66
5.3 TESTE DE AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES .....	67
5.4 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL .....	68
5.5 ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES .....	70
5.6 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO E MANEJO .....	74
<b>6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>77</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>94</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 BIODIVERSIDADE DE PEIXES NEOTROPICAIS, COM ÊNFASE NA BACIA DO ALTO PARANÁ

O termo peixe é designado a um grupo heterogêneo de cordados aquáticos composto por feiticeiras, lampréias, peixes cartilaginosos (tubarões, quimeras, raias) e peixes ósseos. Destes, o último grupo é o mais diversificado e bem representado na água doce, enquanto os outros são predominantemente marinhos (LÉVÊQUE *et al.*, 2008).

De acordo com Froese (2009) das 31.200 espécies de peixes descritas, aproximadamente 13.000 são exclusivas de ambientes de água doce. A maior parte dessa riqueza e diversidade encontra-se em águas tropicais (LOWE-MCCONNELL, 1999), particularmente nas águas doces neotropicais. Só na região Neotropical são cerca de 4.475 espécies efetivas, podendo chegar a mais de 6.000 incluindo as espécies conhecidas porém ainda não descritas pelos pesquisadores (REIS, *et al.*, 2003). Essa diversidade pode ser diretamente correlacionada à heterogeneidade estrutural, bem como com a história geológica dessa região (NAKATANI *et al.*, 2001).

Diferente de outras regiões zoogeográficas, onde predominam ciprinídeos (exceto Austrália), a maior parte dos peixes Neotropicais pertence a cinco grupos dominantes: Characiformes (aproximadamente de 1.500 a 2.000 espécies descritas), Siluriformes (pelo menos 1.400 espécies conhecidas), Gymnotiformes (em torno de 180 espécies), Cyprinodontiformes (cerca de 400 espécies) e ciclídeos (cerca de 450 espécies) (LÉVÊQUE *et al.*, 2008).

Apesar do predomínio de espécies de Characiformes e Siluriformes em todas as bacias sul-americanas, a maior parte dessa diversidade se concentra na bacia Amazônica e na bacia do Rio Paraná (LANGEANI *et al.*, 2007). Na bacia Amazônica, onde os levantamentos são ainda incompletos, já foram catalogadas mais de 1.300 espécies (AGOSTINHO *et al.*, 2007), os números totais estimados alcançam 5.000 (SANTOS; FERREIRA, 1999). Já a ictiofauna da bacia do Rio Paraná é estimada em 600 espécies (BONETTO, 1986), destas apenas o Pantanal deve apresentar 400 espécies. Agostinho e Thomaz (1995) ao revisarem os levantamentos efetuados por

Bonetto em 1986, listaram 221 espécies para 110 áreas amostradas apenas no Alto rio Paraná, enquanto, Bonetto obteve 130 espécies para o que ele denominou Província do Paraná Superior (Alto Paraná e Iguaçu).

A bacia hidrográfica do Alto Paraná drena uma vasta área, que em território brasileiro supera 802.150 Km<sup>2</sup>. Desde sua nascente na Serra da Mata da Corda (MG) até a desembocadura no rio da Prata, na altura da foz do rio Uruguai, ele percorre aproximadamente 3.809 Km. Recebe esse nome após a conjugação dos rios Grande e Paranaíba (AGOSTINHO *et al.*, 1999). Os principais rios da margem esquerda são mais largos, com comprimento variando entre 400 e 600 Km, e possuem nascentes em rochas cristalinas na Serra do Mar.

De acordo com Castro e Menezes (1998), o sistema do Alto Paraná inclui os maiores rios do estado de São Paulo e contém 22 famílias e aproximadamente 170 espécies de peixes descritas, distribuídas em 11 ordens e 38 famílias sendo cerca de 80% das espécies são registradas nas ordens Siluriformes e Characiformes (LANGEANI *et al.*, 2007).

Nessa bacia, os principais rios, como o Paranaíba, Grande, Tietê, Paranapanema e o Iguaçu tiveram seus cursos transformados em cascata de reservatórios, reduzindo drasticamente os trechos lóticos. O número crescente de barragens e os impactos que essas exercem sobre as características hidrológicas e, por consequência, nos atributos biológicos dos sistemas naturais, têm despertado interesse pelo seu manejo (AGOSTINHO, 1992).

O barramento de rios causa profundas modificações no ambiente aquático e nas comunidades presentes (SALE, 1985). Entre as comunidades aquáticas, destacam-se os impactos sobre os peixes de piracema. A espécie *Salminus hilarii*, comumente conhecida como tabarana, é um exemplo típico de peixe de piracema que vem sofrendo com a poluição e a construção de barragens.

Um dos pontos centrais para o planejamento de medidas de conservação da biodiversidade aquática é o entendimento da estrutura populacional da espécie para que se determine, tanto as respostas fisiológicas às variações ambientais como as estratégias de manejo das populações naturais (HILSDORF, 2002).

Nos últimos anos, a utilização de métodos moleculares em estudos de padrões de variação genética tem auxiliado os programas de conservação, não somente indicando quais espécies merecem maiores esforços de preservação, mas

também contribuindo no delineamento da viabilidade de uma população natural (JOHNSON *et al.*, 2001).

## 1.2 GÊNERO *SALMINUS*

Pertencente a família Characidae o gênero *Salminus* é caracterizado por peixes de médio a grande porte, cujo comprimento adulto padrão oscila entre 15 a 100 cm, e que habitam as águas doces de boa parte das bacias hidrográficas sul-americanas (LIMA, 2006). Os representantes desse gênero, os dourados e a tabarana, são peixes predadores, principalmente ictiófagos que realizam migrações reprodutivas procriando no leito dos rios durante o período de chuvas (MORAIS FILHO & SCHUBART, 1955; GODOY, 1975; ESTEVES & PINTO LOBO, 2001). Não apresentam cuidado parental, possuem alta fecundidade e seus ovos com pequeno diâmetro são livres, demersais e dependem da correnteza da água para se manterem na região pelágica e serem dispersos (AGOSTINHO E JÚLIO JR, 1999; SATO *et al.*, 1999).

Segundo Lima (2006) quatro espécies foram reconhecidas como efetivas para o gênero: *Salminus affinis* (Steindachner) com distribuição nas bacias transandinas dos rios Magdalena, Rancheria e Sinú; *Salminus brasiliensis* (Cuvier), do sistema dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, sistema do rio Jacuí e bacia do alto rio Madeira; *Salminus hilarii* (Valenciennes), das bacias dos rios São Francisco e alto Paraná, além do rio Jaguaribe, no nordeste brasileiro e *Salminus franciscanus* do São Francisco (Lima).

Apesar da popularidade e da importância que as espécies desse gênero possuem, o conhecimento taxonômico é bastante insatisfatório, sendo este considerado *incertae sedis* (LIMA, 2003). O primeiro trabalho a incluir *Salminus* ao empregar a metodologia cladística foi o de Ortí & Meyer (1997), que realizaram uma análise filogenética da ordem Characiformes utilizando sequências de DNA ribossomal dos genes 12S e 16S. Como resultado, esses autores encontraram uma relação corroborada de grupos-irmãos entre *Salminus* e *Brycon*. O primeiro estudo filogenético baseados em caracteres morfológicos que incluía representantes de *Salminus* foi realizado por Zanata (2000), que encontrou resultados diferentes de Ortí. Por sua vez, Calcagnotto *et al.* (2005) realizaram um estudo filogenético de

Characiformes baseados em dados moleculares e obtiveram resultado similar ao de Ortí & Meyer. Estudos recentes, compreendendo revisão taxonômica e uma análise das relações filogenéticas do gênero foi conduzida por Lima (2006), que propôs o estabelecendo o monofiletismo do gênero baseado em 15 sinapomorfias (5 delas exclusivas para o gênero).

### 1.2.1 Tabarana (*Salminus hilarii*)

*Salminus hilarii* (Valenciennes, 1849) vulgarmente conhecida como tabarana, tubarana ou dourado-branco (Figura 1) é uma espécie similar ao dourado (*Salminus brasiliensis*), entretanto, atinge menor porte. Dentre as espécies do gênero *Salminus*, ela é a que apresenta menor número de escamas na linha lateral e nas séries transversais (LIMA, 2006). De coloração branca-prateada, a tabarana possui a nadadeira caudal vermelha e as nadadeiras pélvicas, peitorais dorsal e anal levemente avermelhadas. Os machos apresentam-se mais esguios e menores do que as fêmeas (GODOY, 1975; SANTOS, 1987).

São peixes de água movimentada sendo possível observá-las na queda de cachoeiras, corredeiras e pequenos corpos d'água. Sua preferência por corpos d'água menores deixou essa espécie mais susceptível do que seu congênere (dourado), devido à extinção de locais ocasionados pela poluição e a construção de barragens. É um peixe de importância ecológica, pois além de ser de topo de cadeia, pode ser utilizada como uma boa indicadora ambiental devido ao seu grau de seletividade ambiental (CETRA, 2003; LIMA-JUNIOR, 2003).



**Figura 1.** Tabarana (*Salminus hilarii*). Fonte: Hilsdorf, (2009).

Quando adulta é piscívora (GODOY, 1975), mas na fase juvenil se alimenta de insetos e crustáceos. Seu tempo mínimo de duplicação da população é de 1,4 a 4,4 anos, sendo uma espécie de baixa fecundidade (LIMA, 2006). Os ovos são de coloração verde escuro a marrom, não são adesivos e não possuem capa envoltória (córion) gelatinosa (SATO, 1999). Apresentam tamanho da primeira maturação variando de 21 cm do comprimento total para machos e 23 cm para fêmeas. Como dimorfismo sexual secundário, os machos de *Salminus hilarii* possuem espículas na nadadeira anal. Este, que por ser um caráter temporal, ocorre ao longo de todo estágio de maturação gonadal em diferentes graus de intensidade. Seu período reprodutivo varia, ocorre durante a estação chuvosa, entre os meses de outubro a fevereiro (ANDRADE *et al.*, 1988; ANDRADE *et al.*, 2004).

Estudos envolvendo a reprodução da espécie foram realizados na bacia do Rio Mogi-Guaçu por Godoy (1975), na bacia do rio São Francisco por Andrade *et al.* (1988) e Sato *et al.* (2003), na região do rio Sorocaba por Takahashi (2006) e na bacia Alto Tietê por Honji (2006). Tempos atrás, a produção científica a respeito da reprodução de *S. hilarii*, se reduzia a trabalhos envolvendo aspectos gerais da biologia da reprodução, tendo como enfoque apenas o ciclo reprodutivo da espécie. A partir de 2005, a tabarana passou a ser objeto de estudo em trabalhos de fisiologia da reprodução, na região da bacia do Alto Tietê. Desde então, novos conhecimentos desta espécie foram adquiridos. Amaral *et al.* (2005) estudou o perfil dos esteróides gonadais na espécie e os efeitos do bloqueio migratório no eixo-hipófise - gônadas; o perfil metabólico foi estudado por Rodrigues *et al.* (2006) e Camargo (2007), e a identificação de células produtoras de prolactina durante o ciclo reprodutivo da tabarana foram realizadas por Honji *et al.* (2006).

*Salminus hilarii* é considerada um reofílico de grandes distâncias segundo Agostinho *et al.* (2007), entretanto, Godoy (1975) e Carolsfeld *et al.* (2003) caracterizam a espécie como sendo um migrador de curtas distâncias, migrando menos do que 100 Km, isso foi observado por Godoy durante a piracema, em que, três tabaranas marcadas nos meses de outubro/novembro na Cachoeira de Emas (Rio Mogi Guaçu) foram recapturadas em distâncias de 51, 87 e 115 km a montante desse ponto.

Em 1914 uma grande piracema de tabaranas foi reportada por Von Ihering (1929, p. 75) no rio Tamanduateí na cidade de São Paulo, ele relatou: “Após vários

dias de chuvas prolongadas, as várzeas do rio Tamanduatehy, entre as estações de Ypiranga e São Caetano estavam alagadas; certa noite, alguns moradores da região, que anualmente aproveitavam a piracema, cercaram os peixes, que haviam saído do rio para campos alagados. Esbarrando contra as redes e tapumes, não podiam as tabaranas voltar ao leito do rio e assim, a pescaria rendeu algumas centenas de kilos de peixes. Seja dito de passagem que, ainda mezes depois, pudemos comer dessas tabaranas [...]”. Magalhães (1931) relata uma observação similar para a bacia do rio Paraná, em uma área não específica.

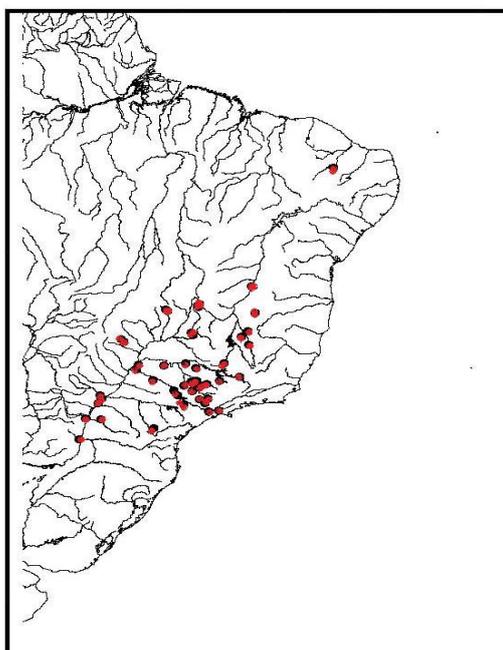
Quanto a sua distribuição (figura 2), a tabarana é uma espécie conhecida da Bacia do rio Paraná no Brasil (estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul e Paraná), bem como no Paraguai (rios Monday e Acaray) e na Bacia do alto São Francisco (Minas Gerais e Distrito Federal), sendo que na Bacia rio Paraná a ocorrência da tabarana é quase circunscrita ao trecho conhecido como “Alto Paraná”, que compreende a região da bacia acima do Salto de Sete Quedas, atualmente coberto pelo reservatório de Itaipu (BONETTO *et al.*, 1968). Presumia-se que a tabarana apresentava ampla uma distribuição ao norte da América do Sul cisandina e também na bacia do Rio Orinoco, sistema do alto Amazonas e rio Tocantins (STEWART *et al.*, 1987; SANTOS *et al.*, 1984; GÉRY & LAUZANNE, 1990), porém Lima (2006), em seus estudos constatou que as populações dessas áreas apresentam diferenças morfológicas em relação aquelas das bacias dos rios São Francisco e Alto Paraná, sugerindo que as espécies que ali ocorrem seja um outro *Salminus*, provavelmente *Salminus iquitensis*.

Para a bacia do Alto Paraná somente no Estado de São Paulo, estudos recentes relataram a ocorrência de *Salminus hilarii* nos seguintes rios: Rio Sorocaba (SMITH, 1999; SMITH *et al.*, 2003), Mogi-Guaçu (OLIVEIRA e GARRAVELO, 2003), Paranapanema (VARELLA *et al.*, 2007), Rio Tibagi (SHIBATTA *et al.*, 2007), Rio Corumbataí (CETRA & PETRERE, 2006), e rios Rio Ribeirão do Pântano (PEREZ-JUNIOR & GARAVELLO, 2007) e Rio Quilombo (APONE *et al.*, 2008), afluentes do rio Mogi-Guaçu, Rio Guiraí (SÚAREZ *et al.*, 2009) entre outros.

Como relatado, a tabarana já foi encontrada em abundância nos Rios Tietê e Pinheiros e em seus tributários em trechos da capital (VON IHERING, 1929). No entanto, atualmente se reduz a poucos cardumes confinados em alguns quilômetros desses rios e seus tributários. Por se tratar de peixe reofílico, precisa durante um

determinado período do ciclo reprodutivo migrar rio acima para se reproduzir, e em razão disto, corre grande risco de redução na sua população natural em função de ações antrópicas, como o barramento dos rios, poluição e a pesca predatória (GODOY, 1975; ABILHOA, 2004). Dessa forma, o conhecimento sobre a estrutura genética das populações se faz necessário para uma estratégia efetiva da conservação e manejo da espécie (EIZIRIK *et al.*, 2001).

Com relação aos estudos genéticos em *Salminus hilarii*, a produção científica brasileira, só apresenta trabalhos na área de citogenética. Estes foram realizados por Marco (1986) que estudou os cromossomos desta espécie de ocorrência do rio Mogi Guaçu comparando-os com os da população de São Francisco; Carvalho *et al.* (1998), no qual analisa o conteúdo de DNA nuclear de 30 espécies de peixes neotropicais entres eles, a tabarana; Margarido & Galetti Jr. (1999) que analisaram os cromossomos de *Salminus hilarii* ( $2n=50$ ) baseado no padrão de distribuição da heterocromatina, e com isso inferiram a relação cariotípica entre Bryconinae e Salmininae. Souza *et al.* (2007) que realizaram estudos citogenéticos baseados na hibridização dos genes 5S e 18S. Na área de genética populacional, apenas um trabalho têm sido realizado envolvendo análise da variação genética da tabarana na região de transposição do rio Piumhi (MG), utilizando o gene mitocondrial citocromo b como marcador (LEITE & GALETTI, 2008).



**Figura 2.** Mapa do Brasil evidenciando a distribuição geográfica da tabarana (modificado de Lima), (2006).

### 1.3 MARCADORES MOLECULARES

Marcadores genéticos são características qualitativas com herança Mendeliana, facilmente reconhecidas e cuja expressão não sofrem influência ambiental (ROBINSON,1998), podendo ser morfológicos, bioquímicos ou moleculares.

Avanços tecnológicos em bioquímica e biologia molecular levaram ao desenvolvimento de uma grande variedade de marcadores moleculares (FERGUSON; DANZMANN, 1998). Com o desenvolvimento da técnica da PCR (Polymerase Chain Reaction) (SAIKI *et al.*, 1988), tornaram-se possíveis estudos genético-moleculares envolvendo grande número de indivíduos. Ela se baseia na síntese *in vitro* de milhões de cópias de um segmento específico de DNA que permite a quantificação e análise da variabilidade genética dentro e entre populações de qualquer organismo. Segundo Matioli e Passos-Bueno (2001), a variabilidade genética é um importante instrumento de investigação para verificar afinidades e limites entre as espécies e estimar níveis de migração e dispersão das populações.

Estudos genéticos em populações de peixes têm sido realizados utilizando-se marcadores bioquímicos e moleculares tais como: aloenzimas/isoenzimas, RAPD (“Randomly Amplified Polymorphic DNA”) (WILLIAMS *et al.* 1990), RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”), AFLP (“Amplified Fragment Length Polymorphism”), VNTR (“Variable Number of Tandem Repeats”) e STR (“Short Tandem Repeats”) (MARQUES, 2002), sendo a maioria dos estudos realizados aplicam esses marcadores no genoma nuclear, sendo o RFLP o marcador mais utilizado em estudos com o DNA mitocondrial.

Dentre as abordagens mais importantes da aplicação dos marcadores de moleculares em espécies aquáticas, temos: a identificação de populações, verificação de relações filogenéticas entre as espécies, segregação reprodutiva entre populações isoladas, caracterização de estoques nos programas de melhoramento genético, além de estimar inúmeros parâmetros de interesse ecológico como tamanho populacional, efeito gargalo, relação de parentesco e outros (SALKOE & TOONEN, 2006).

Polimorfismo de proteínas foi inicialmente utilizado para investigar estrutura genética de peixes neotropicais. Revaldaves *et al.* (1997) analisaram a variabilidade genética das subpopulações de curimatá, *Prochilodus lineatus*, coletadas em três localidades da bacia do Rio Paraná por meio de isoenzimas. Peres *et al.* (2002) também utilizaram sistemas enzimáticos para investigação da variabilidade genética em *Hoplias malabaricus* de duas localidades da planície de inundação no Rio Paraná, e encontraram diferenças significativas entre as duas localidades.

O marcador RAPD também foi uma ferramenta utilizada por Almeida *et al.* (2003) para averiguar a variabilidade genética de espécimes de mandi amarelo (*Pimelodus maculatus*) nos rios Tietê e Paranapanema. Leuzzi *et al.* (2004) também utilizaram o marcador RAPD para análise da estrutura populacional de *Astyanax altiparanae* (lambari) em três localidades do Rio Paranapanema (baixo, médio e alto). Os autores verificaram que a população do baixo Paranapanema é geneticamente diferente das outras duas.

Apesar de diversos marcadores moleculares como o RAPD terem sido utilizados satisfatoriamente em estudos de genética populacional de peixes (SAITOH, 1998), desde o início dos anos 90 os *loci* microssatélite vem sendo a classe mais polimórfica de marcadores disponível (QUELLER *et al.*, 1993). Isso porque possuem potencial para fornecer estimativas de migrações contemporâneas, distinguirem elevadas taxas de migração de panmixia e estimar o parentesco dos indivíduos (SELKOE & TOONEN, 2006).

### **1.3.1 Marcadores Microssatélites**

Os marcadores moleculares microssatélites, também conhecidos como SSR (simple sequence repeat) ou STR (short tandem repeats), consistem de seqüências curtas de DNA de um a seis nucleotídeos (repetidos em *tandem*) e dispersas pelo genoma nuclear de organismos procariotos e eucariotos (HAMADA *et al.*, 1982; TAUTZ & RENZ, 1984; LITT & LUTY, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Podem estar presentes tanto em regiões codificadoras como não codificadoras (ZANE *et al.*, 2002).

Correspondem a marcadores de herança mendeliana e são codominantes, sendo assim, indivíduos homocigotos e heterocigotos para um determinado *locus* podem ser distinguidos (ZANE *et al.*, 2002).

A análise de *loci* microssatélites, é realizada por meio da técnica de PCR (POWELL *et al.*, 1996), utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares de (18 a 30 bases) às regiões que os flanqueiam (HOSHINO *et al.*, 2002). As seqüências de DNA que flanqueiam os microssatélites são geralmente conservadas dentro de uma mesma espécie, permitindo a seleção de *primers* específicos (MORGANTE & OLIVIERI, 1993).

Os microssatélites mais comuns são os dinucleotídeos (repetições de duas bases), seguidos pelos mononucleotídeos e tetranucleotídeos, sendo menos abundantes os trinucleotídeos (ELLEGREN, 2004). Para os vertebrados a repetição dinucleotídica (CA)<sub>n</sub> é uma das mais abundantes (STALLINGS, 1995) e em peixes as repetições dinucleotídicas (GT/AC)<sub>n</sub> ou (CT/GA)<sub>n</sub> são predominantes (GOFF *et al.*, 1992).

Quanto a sua estrutura os microssatélites podem ser: perfeitos ou puros - quando não apresentam nenhuma interrupção em sua seqüência de repetição; interrompidos - quando possuem um par de bases ou uma pequena seqüência interrompendo a série de repetição e compostos - quando apresentam duas seqüências de repetições distintas lado a lado (ZANE *et al.*, 2002).

Estes marcadores apresentam uma alta taxa de mutação, variando de 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-2</sup> por geração, sendo que a maioria das mutações é ocasionada por alterações no número das unidades de repetição (EISEN, 1999). Acredita-se que esta instabilidade surge através de um mecanismo específico de mutação chamado deslizamento (slippage) da DNA polimerase, que ocorre durante a replicação do DNA e conduz ao aumento ou à diminuição do número de repetições (TAUTZ & SCHLOTTERER, 1994). Outro motivo pelo qual a taxa de mutação é alta nos microssatélites é devido ao fenômeno de *crossing-over* desigual, causado pelo pareamento errôneo destas seqüências durante os quiasmas (EISEN, 1999).

Dois modelos mutacionais são adotados quando se analisam *loci* microssatélites em estudos populacionais. Esses modelos são principalmente o modelo dos alelos infinitos (IAM - Infinite Allele Model) e o modelo de mutação escalonada (SMM - Stepwise Mutation Model) (MOYSÉS, 2005). No modelo IAM,

cada mutação cria um novo alelo a uma dada taxa ( $\mu$ ), não permitindo homoplasia. Alelos idênticos compartilham o mesmo ancestral e são idênticos por descendência. O modelo SMM é o mais utilizado para explicar as características evolutivas dos microssatélites. Este modelo considera que cada mutação cria um novo alelo através do ganho ou perda de uma repetição com probabilidade igual a  $\mu/2$  em ambas as direções. Assim, os alelos de tamanhos muito diferentes são considerados menos relacionados que aqueles de tamanhos similares, caracterizando uma memória em relação ao tamanho do alelo, ao contrário do IAM (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002).

Apesar das dúvidas a cerca da origem e evolução dos microssatélites, esses marcadores microssatélites possuem características que os tornam excelentes marcadores, pois além de ser abundantes no genoma são altamente polimórficos (OLIVEIRA *et al.*, 2006). A consistência dos padrões de polimorfismo de microssatélites e a possibilidade de identificação de heterozigotos fez com que sejam reconhecidos como marcadores eficientes em avaliações da estrutura genética e fluxo gênico entre populações de peixes (ADAMS *et al.*, 1992; EDWARDS *et al.*, 1992).

Dentre as vantagens do uso de microssatélites na análise de variabilidade genética há a detecção de *loci* únicos, utilizando-se condições altamente estridentes (temperaturas de anelamento altas: 55° C a 60° C). Temperaturas de anelamento mais altas possibilitam a análise de um *locus* específico (HOSHINO *et al.*, 2002).

Outra característica muito interessante dos microssatélites é sua grande reprodutibilidade, dado que é possível obter os mesmos resultados em qualquer laboratório do mundo (CENIS, 2000). Sendo assim, a comparação de dados é facilitada pelo fato de que os resultados de microssatélites se expressam numericamente, mediante o tamanho dos pares de nucleotídeos dos alelos de cada *locus* (CENIS, 2000).

Devido à alta homologia encontrada nas sequências flanqueadoras, os *primers* desenvolvidos para uma espécie também podem ser amplificados em espécies relacionadas (MOORE *et al.*, 1991). Embora não haja necessidade de que essas espécies sejam intimamente relacionadas, a porcentagem de *loci* amplificados

decrece à medida que o tempo que separa as espécies aumentar (FITZSIMMONS *et al.*, 1995).

A dificuldade de se trabalhar com marcadores microssatélites é a falta de marcadores espécie-específicos para a maioria das espécies (ABILA *et al.*, 2004). Segundo Zane (2002) a necessidade de se construir esses marcadores específicos, entre outros fatores, se deve a ao fato de os microssatélites serem normalmente encontrados em regiões não codificadoras, nas quais a taxa de substituição dos nucleotídeos é maior que em regiões codificadoras, o que interfere na estratégia de se desenhar *primers* universais.

Apesar das dificuldades, o desenvolvimento de microssatélites tem-se tornado cada vez mais acessível, principalmente devido às novas técnicas de enriquecimento de bibliotecas genômicas e a técnicas rápidas de seqüenciamento automático baseadas em fluorescências (RAFALKI *et al.*, 1996).

### **1.3.2 Aplicação de marcadores moleculares em peixes neotropicais**

Os estudos utilizando marcadores moleculares em peixes neotropicais estão apenas começando, mas tendem a aumentar com a ampla atenção que vem sendo dada a aplicação de marcadores moleculares visando minimizar problemas relacionados ao risco de extinção (WASKO *et al.*, 2004).

Os primeiros trabalhos com a utilização de marcadores de DNA em peixes neotropicais de água doce foram publicados na década de 90 (OLIVEIRA, 2009). Desde então, inúmeros trabalhos empregando diferentes marcadores moleculares visando o entendimento dos padrões genéticos das populações, resolução de problemas taxonômicos, de filogenia, conservação e introdução de peixes de cativeiro em populações selvagens têm sido realizados (DERGAM *et al.*, 1998; CHIARI & SODRÉ, 1999; RENESTO *et al.*, 2000; MOYSES & ALMEIDA-TOLEDO, 2002).

Marcadores moleculares microssatélites são de longe os mais utilizados atualmente em estudos genéticos de peixes (WASKO e GALETTI, 2002). Sua aplicação é ampla como se pode observar em alguns relatos como no trabalho de López (2006) que utilizou seis *loci* microssatélites de pacu (*Piaractus*

*mesopotamicus*) para estudo análise da variabilidade genética de populações de *Brycon sinuensis*. Morelli *et al.* (2007) verificaram por meio de marcadores microsatélites e DNA mitocondrial, que populações de *Prochilodus lineatus* apresentaram leve estruturação entre os animais residentes e migrantes, do rio Mogi-Guaçu. Apesar do grande potencial desses marcadores, a utilização dos mesmos em peixes neotropicais ainda é pouco expressiva.

Alguns microsatélites já foram desenvolvidos para algumas espécies de peixes neotropicais, como por exemplo: *Piaractus mesopotamicus* (CALCAGNOTTO *et al.*, 2001), *Arapaima gigas* (FARIA *et al.*, 2006), *Brycon opalinus* (BARROSO *et al.*, 2003), *Eingenmannia* spp. (MOYSÉS *et al.*, 2005), *Pseudoplatystoma corruscan* (REVALDAVES *et al.*, 2005), *Prochilodus* (HATANAKA *et al.*, 2002) e *Leoporinus macrocephalus* (MORELLI *et al.*, 2007). No entanto, nenhum microsatélite foi descrito especificamente para *Salminus hilarii*. Para se iniciar os estudos com esta espécie houve a necessidade de isolar e caracterizar um conjunto de *loci* microsatélites para, então, utilizá-los na caracterização genética populacional da espécie, já que não há nada descrito na literatura. Com tais *loci* devidamente caracterizados, as populações amostradas puderam ser devidamente avaliadas e comparadas geneticamente permitindo assim um melhor planejamento conservacionista para espécie.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a hipótese de estruturação genética das amostragens de *Salminus hilarii*, provenientes de três rios da bacia do Alto Paraná, por meio de marcadores moleculares microssatélites.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Desenvolver marcadores microssatélites para a espécie *Salminus hilarii*, por meio da construção de um banco enriquecido de microssatélites;
- b) Seqüenciar, identificar e desenhar os *primers* SSR;
- c) Descrever o nível de diferenciação genética inter e intra-populacional da espécie;

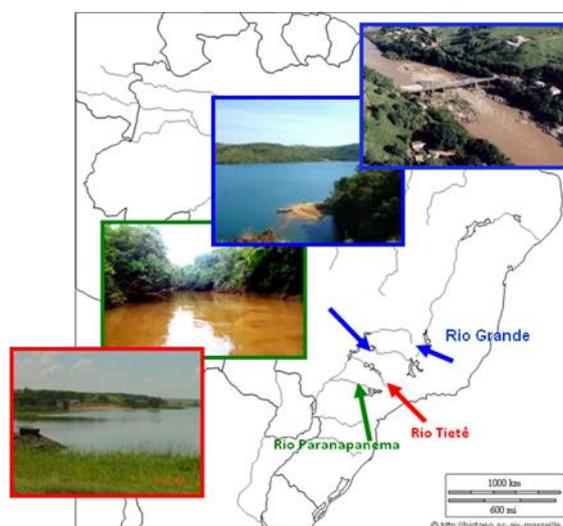
## 3 MÉTODO

### 3.1 LOCAIS DE COLETA

Os exemplares de *Salminus hilarii* utilizados no presente trabalho foram coletados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, em quatro localidades pertencentes à Bacia do Alto Rio Paraná, os quais são sumarizados na Tabela 1 e Figura 3. Esses exemplares foram capturados utilizando-se a pesca artesanal (vara e isca viva), rede de espera e alguns o elevador de transposição para peixes.

**Tabela 1.** Pontos de coleta e número de animais coletados de *Salminus hilarii*.

Bacia Hidrográfica	Local de coleta	Número de Animais Coletados	Coordenadas
Bacia do Alto Paraná	Rio Grande (Igarapava)	39	S 19° 59' 36" W 47°45' 32"
	Rio Tietê	56	S 23° 32'45,3" W 46° 08' 03,2"
	Rio Grande (Lavras)	37	S 21°07'57 79" W 45°01'04 85"
	Rio Paranapanema	19	S 23° 20'36 35" W 48°34'17 44"
<b>Total</b>		<b>151</b>	



**Figura 3.** Mapa hidrográfico do Brasil, indicando os rios de coleta de tabarana. Fonte: Mapa modificado de geoprofessora (2008).

### **3.1.1 Bacia do Alto Rio Paraná**

#### *3.1.1.1 Sub-bacia do Rio Grande*

Com cerca de 145.000 km<sup>2</sup> de área de drenagem, a bacia do rio Grande (sub-bacia da bacia do Rio Paraná) está localizada entre os estados de Minas Gerais e São Paulo.

O rio Grande nasce na serra da Mantiqueira (MG), e percorre 1.306 km até o rio Paranaíba, formando o rio Paraná.

A coleta de tecido de nadadeira caudal foi realizada em dois locais do rio Grande, no reservatório de Igarapava e na porção do rio Grande localizada na região de Lavras. Na região de Igarapava foram coletados 39 animais no ano de 1999, dos quais 18 se localizavam no reservatório (S 19° 59' 36" W 47°45' 32") e 21 à sua montante. Já na região de Lavras (S 21°07'57 79" W 45°01'04 85") foram coletadas 37 amostras de tecido, durante o ano de 2005.

#### *3.1.1.2 Sub-bacia do Rio Tietê*

O rio Tietê nasce em Salesópolis (SP), aproximadamente a 95 km da capital e cruza o Estado no sentido Sudeste-Noroeste até desaguar no rio Paraná, na divisa com Mato Grosso do Sul. É o maior rio do Estado de São Paulo com 1.100 km de extensão. É composto por seis sub-bacias: Alto Tietê, onde está inserida a Região Metropolitana de São Paulo; Piracicaba; Sorocaba/Médio Tietê; Tietê/Jacaré; Tietê/Batalha e Baixo Tietê.

As 56 amostras de tecido (nadadeira e músculo) obtidas dessa sub-bacia foram coletadas na região das cabeceiras do Alto Tietê em dois locais: na calha principal do Rio Tietê, entre as cidades de Mogi das Cruzes e Biritiba Mirim/ SP (S 23°32'45,3" W 46°08'03,2") e à jusante da Barragem de ponte Nova (Salesópolis/SP) (S 23°34'36,5" W45°54'23,9"), durante os anos de 2003 e 2004.

mistura 3,0 µl de RNase A (USB) a 10 mg/ mL e novamente o material foi agitado e incubado a 37° C por mais 1 hora.

### 3.1.1.3 Sub-bacia do Rio Paranapanema

O rio Paranapanema nasce na serra de Paranapiacaba (leste do estado de São Paulo) e desemboca no Rio Paraná, sendo considerado um dos principais afluentes do alto Paraná, cobrindo uma área de aproximadamente 100.800 km<sup>2</sup>. O rio Paranapanema possui uma série de reservatórios em “cascata” ao longo do seu percurso, sendo o reservatório de Jurumirim o primeiro da série.

O Reservatório de Jurumirim (S 23°20'36 35” W 48°34'17 44”) apresenta uma área de 425 Km<sup>2</sup>. Neste local, a coleta foi realizada durante o mês de junho de 2008, totalizando 19 amostras.

## 3.2 COLETA DE TECIDOS

As amostras de tecido de muscular e de nadadeira caudal (aproximadamente 200 mg) foram coletadas, armazenadas em etanol 95% e levadas para o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA), do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes, onde foram armazenadas em *freezer* a -20°C até o momento de sua manipulação.

## 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA total foi extraído dos tecidos (nadadeira e músculo) de acordo com o protocolo descrito por Taggart *et al.* (1992), com algumas modificações.

Os tecidos previamente conservados em etanol foram cortados e em seguida hidratados com tampão TE (10 mM de Tris-HCl, 1,0 mM de EDTA, pH 7,5) durante 1h. Passado este tempo, todo o TE foi retirado e adicionou-se a amostra 500 µL de tampão STE (Tris- HCl 0,05 M, EDTA 0,01M e NaCl 0,1M, pH 8,0), 30 µL de SDS (Dodecil Sulfato de Sódio) a 10% e 10 µL de proteinase K (Invitrogen Life Technologies) a 20 mg/mL. Agitou-se vigorosamente por 10 minutos e incubou em banho-maria a 62° C por 60 minutos. A cada 15 minutos as amostras eram agitadas levemente para homogeneização do material. Após os 60 minutos, acrescentou-se à

mistura 3,0 µL de RNase A (USB) a 10 mg/ mL e novamente o material foi agitado e incubado a 37° C por mais 1 hora.

Após a incubação, foram adicionados 400 µL de fenol equilibrado e 200 uL de clorofórmio/ álcool isoamílico (24:1), centrifugou-se por 10 min a 14.000 rpm. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para novos microtubos de 1,5 mL e a eles adicionou-se a mesma quantidade (do sobrenadante) de clorofórmio/ álcool isoamílico. Centrifugou-se novamente, por mais 10 minutos a 14.000 rpm. O sobrenadante (cerca de 500 uL) foi transferido para novos microtubos de 1,5 mL e, então, o DNA foi precipitado com 30 uL acetato de sódio a 3,0 M (pH5,2) e 500 µL de etanol 100% (gelado).

As amostras foram armazenadas a -20°C por 18 horas e, então, centrifugadas a 4°C por 30 minutos, a 14000 rpm para obtenção do DNA precipitado. A fase líquida foi desprezada e, as amostras, lavadas com 500 µL etanol 70% foram centrifugadas por um minuto. Novamente o líquido foi descartado e o precipitado, após sua secagem total, foi ressuscitado em 70 µL de tampão TE e armazenados a 4°C por 48 horas para completa ressuspensão. O volume do TE dependeu da quantidade de DNA existente.

A qualidade do DNA extraído foi checada em eletroforese em gel de agarose 0,8%, e avaliada por comparação com o marcador  $\lambda$  *HindIII* – Invitrogen. Já a quantificação do material extraído foi verificada no espectrofotômetro Nanodrop® ND-1000 (*Thermo Fisher Scientific*).

### **3.4 ISOLAMENTO DE REGIÕES DE MICROSSATÉLITE**

Para esta etapa, foi necessária a construção de uma biblioteca genômica enriquecida em regiões microssatélites. Para isso, foi necessária apenas uma única amostra de DNA já extraída de *Salminus hilarii*. De acordo com a qualidade e quantidade do DNA, a amostra A22 (rio Grande) foi escolhida para construção da biblioteca.

A biblioteca foi construída no Laboratório de Análise Genética e Molecular, do Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética (CBMEG) da UNICAMP, de acordo com o protocolo de (BILLOTE *et al.*, 1999).

### 3.4.1 Construção da biblioteca genômica enriquecida em microssatélite

#### *Digestão do DNA genômico*

O DNA genômico (180ng) extraído do tecido muscular da tabarana, foi digerido por meio da enzima de restrição de corte freqüente, *Rsa I* (10 U/ $\mu$ g), de forma que fossem obtidos fragmentos entre 300 e 600 pb. A reação de digestão foi feita, de acordo com a instrução do fabricante, modificada apenas pelo acréscimo de espermidina (40 mM para uma reação de 25  $\mu$ L). Essa reação foi incubada a 37° C por 12h. Os produtos gerados pela digestão do DNA foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% por 2 horas a 60 V.

#### *Seleção dos fragmentos*

Adaptadores com seqüências conhecidas de 21 e 25 pb Rsa21 (5'CTCTTGCTTACGCGTGGACTA3') e Rsa25 (5'TAGTCCACGCGTAAGCAA GAGCACA3') foram ligados, com o auxílio da enzima T4 ligase (Amershan Pharmacia Biotech), aos fragmentos com extremidades abruptas, gerados pela digestão do DNA.

A reação de ligação foi realizada com: 6  $\mu$ L de DNA digerido, 10  $\mu$ L de tampão 5X [Amershan Pharmacia Biotech – (150 mM Tris-HCL (pH 7,8), 50 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 mM de DTT e 5 mM de ATP)], 2  $\mu$ L de adaptador (10  $\mu$ M), 4 unidades de T4 DNA ligase e água para completar 50  $\mu$ L. Essa reação foi incubada a 20° C por 2h.

#### *Pré-amplificação*

Para enriquecer o produto da ligação e evitar a seleção e exclusão casual de alguns fragmentos, o produto da reação de ligação foi amplificado utilizando apenas um *primer Blunt*, neste caso o oligonucleotídeo Rsa21. A reação de amplificação consistiu em: 5  $\mu$ L do produto da ligação; 2,0  $\mu$ L do *primer Rsa21* (10  $\mu$ M); 5,0  $\mu$ L de tampão 10 X (50 mM KCl; 10 mM de Tris-HCl, pH 8,9); 2,0  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (50 mM);

4 $\mu$ L de dNTP (2,5 mM), 1,0  $\mu$ L de *Taq* polimerase (5 U) e água deionizada autoclavada para completar o volume final de 50  $\mu$ L. O produto da amplificação da ligação foi purificado com o kit (*Quiaquick PCR Purification Kit*, Qiagen).

### *Seleção dos fragmentos contendo microssatélites*

O material purificado da pré-amplificação foi então, submetido ao passo de enriquecimento da biblioteca de regiões contendo as repetições desejadas. Os fragmentos contendo sequências ricas em GA a CA foram selecionados por meio da hibridização com oligonucleotídeos biotinizados  $\text{biotina-III(CT)}_8$  e  $\text{biotina-III(GT)}_8$  que se ligam a estreptavidina contida nas partículas magnéticas (*Streptavidin MagneSphere Paramagnetic Particles*, Promega).

Como as contas magnéticas marcadas com estreptavidina precisam de uma preparação prévia, estas partículas foram lavadas. Para isso 600 $\mu$ L da solução contendo estas partículas, que veio do fabricante, foram homogeneizados e colocados em um microtubo. Com o auxílio de uma rack (Magna Separator Magnetic Particle - Promega) as partículas foram aderidas à parede do tubo e após cerca de 30 s foi removido o sobrenadante. O tubo foi removido da rack e 300  $\mu$ L de SSC 0,5 x foram adicionados e misturados às partículas. Este passo foi repetido por três vezes. Após o sobrenadante ser removido pela última vez, as partículas foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de SSC 0,5x.

Para o preparo do DNA, juntou-se 400 $\mu$ L de água a 100 $\mu$ L de DNA purificado. Essa solução foi incubada a 95° C por 15 minutos. Em seguida, adicionaram-se 13 $\mu$ L de SSC 20x e 3  $\mu$ L de cada sonda de microssatélite biotinizado -  $\text{biotina-III(CT)}_8$  e  $\text{biotina-III(GT)}_8$ , sendo hibridizados à temperatura de 60° C por 20 minutos, com agitação suave a cada 2 minutos. Em seguida, misturaram-se as esferas magnéticas pré-lavadas à mistura de hibridização. Após incubar à temperatura ambiente, magnetizar e ressuspender obteve-se o sobrenadante contendo os fragmentos selecionados.

### *Amplificação dos fragmentos selecionados*

Os fragmentos selecionados foram reamplificados usando o oligonucleotídeo Rsa21. A reação de amplificação continha, 20  $\mu$ L de fragmentos selecionados pelas

contas magnéticas, 4 µL de Rsa21 (10 µM), 10µL de tampão 10x (Fermentas) , 6 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 8µL de dNTP (2,5mM), 1 unidade de Taq DNA polimerase (Fermentas) e água deionizada para completar o volume de 100 µL. A amplificação realizada apresentou as seguintes condições: 96°C por 5 min; 40 ciclos de 96°C por 45 s, 62°C por 1 min e 72°C por 2 min; alongamento final a 72°C por 2 min. O produto foi aplicado em gel de agarose 1%. A corrida eletroforética foi realizada a 120 V por 1h e 40 min.

### *Clonagem*

Após a etapa de amplificação pela Reação da Polimerase em Cadeia, os fragmentos selecionados foram ligados ao plasmídeo (*pGEM-T Vector System*, Promega). Este plasmídeo possui o gene AMP<sup>r</sup>, que confere resistência ao antibiótico ampicilina, as bactérias que possuem este plasmídeo são capazes de sobreviver em um meio de cultura contendo ampicilina.

### *Transformação de bactérias*

Para a transformação, foram utilizadas bactérias *Escherichia coli* linhagem XL-Blue, modificadas pelo método de HANAHAN *et al.* (1991), no qual se utiliza o choque térmico, processo pelo qual a parede celular das bactérias competentes é desestabilizada temporariamente, permitindo a entrada de DNAs exógenos.

### *Plaqueamento das bactérias transformadas*

Uma vez transformadas, as bactérias competentes foram plaqueadas em meio LB-ágar com ampicilina e X-Gal e incubadas em estufa a 37° C por 20h. A seleção das colônias foi realizada, de forma a escolher, as colônias que apresentaram coloração branca, as chamadas colônias positivas. Após a seleção das colônias positivas, estas foram repicadas em meio 2YT-HMFM (Figuras 4 e 5)

contendo ampicilina e incubadas a 37°C por 20h. Logo após, foram deixadas em freezer a -20°C por 30 min., e finalmente, armazenadas em freezer à -80°C.



**Figura 4.** Pipetagem do meio 2YT-HMFM



**Figura 5.** Seleção de colônias positivas

### *Amplificação dos insertos clonados*

Com o objetivo de identificar os clones contendo microssatélites e verificar a eficiência do procedimento de enriquecimento e clonagem, foi realizada uma reação de amplificação dos insertos diretamente das colônias obtidas na etapa anterior, utilizando o *primer Rsa21*. Colônias individuais foram transferidas com um palito estéril para o tubo de PCR contendo 30,5  $\mu\text{L}$  de água deionizada (milli Q estéril). Esta suspensão de células foi utilizada em uma reação com volume final de 45,0  $\mu\text{L}$  contendo as seguintes concentrações dos reagentes: 5,0  $\mu\text{L}$  de tampão 10X (50 mM KCl; 10mM de Tris-HCl, pH 8,9), 4,0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (2,5 mM), 4,0  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mM), 2,5  $\mu\text{L}$  de *Rsa21* (10 mM), 1,0  $\mu\text{L}$  de *Taq* DNA polimerase (5 U/ $\mu\text{L}$ ). Esta reação foi submetida a um passo inicial de desnaturação a 95°C por 4 minutos, seguido de 30 ciclos (94°C por 30segundos, 52°C por 45segundos, 72°C por 1 minuto e 30 segundos) e um passo final de extensão a 72°C por 8 minutos. Para controle, 10  $\mu\text{L}$  do volume da reação foram utilizados na eletroforese em gel de agarose 1,5%.

## *Miniprep*

Após o crescimento das bactérias foi realizado o processo de Miniprep, no qual, a extração de DNA plasmidial de seis clones se baseou no protocolo descrito por AEG (<http://aeg.lbi.ic.unicamp.br>).

Outros 32 clones foram extraídos com o kit para mini-prep da GE Healthcare (Illustra tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit), no Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura (LAGOAA).

## *Seqüenciamento e análise das seqüências*

Após a construção do banco com fragmentos enriquecidos em microssatélites foi realizada a etapa de seqüenciamento dos clones positivos com o *primer* T7 (*primer* direto). A reação consistia em: 1 µL de água Milli Q, 2 L de tampão Save Money, 1 µL de *primer* (5pmol), 4 µL de DNA do plasmídeo e 2 µL de Big Dye (vs.3.1), com um volume final de 10 µL. Foi amplificada em termociclador nas seguintes condições: 96°C, seguido de 35 ciclos (96° C por 45s, 50° C por 30s e 60° C por 4 min). As seis amostras seqüenciadas no CBMEG foram realizadas no seqüenciador automático ABI PRISM 377 (Applied Biosystems). Os outros clones foram seqüenciados com os *primers* (T7) e (SP6), no Laboratório de Genômica do Núcleo Integrado de Biotecnologia da Universidade de Mogi das Cruzes utilizando o seqüenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems).

As seqüências foram visualizadas no programa Chromas 2.33 (Technelysium Pty Ltd, 2008). Nesse mesmo programa, a sequencia do adaptador foi identificada e removida. Em seguida, as seqüência foram inseridas no programa WEBTROLL (CASTELO *et al.*, 2002) para a localização de microssatélites.

Após a seleção das seqüências que contêm microssatélites, estas foram alinhadas pelo método Clustal W, por meio do programa BioEdit (HALL *et al.*; 1999), que também foi utilizado para avaliar o nível de redundância entre as seqüências.

### *Desenho dos primers*

Os *primers* direto e reverso de cada SSR foram desenhados com o auxílio do programa WEBTROLL (CASTELO *et al.*, 2002), de acordo com os seguintes critérios: não conter bases redundantes; estar a uma distância adequada dos SSRs (entre 20 a 60 pb); ser constituídos por 17 a 23 nucleotídeos sem seqüências repetitivas; conter uma porcentagem de bases G e C entre 50 a 55 %; começar em 5' e terminar em 3' com duas bases G, ou C, ou G e C, se possível; e ter temperatura de anelamento entre 45 e 60 °C, com diferença máxima de 2 °C entre as temperaturas dos *primers* direto e reverso, de modo que possam ser usados na mesma reação e não sofram auto-hibridização.

### **3.5 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO PARA A ESCOLHA DOS *LOCI* MICROSSATÉLITE E ANÁLISE POPULACIONAL**

Os *primers* microssatélites selecionados e confeccionados foram diluídos em água deionizada (autoclavada) a uma concentração final de 10 pmol. Foram realizados teste de gradiente de concentração de MgCl<sub>2</sub> (entre 1,5 mM e 3,0 mM) e temperatura (entre 50°C e 60°C) para a otimização da amplificação dos *loci* microssatélites. Ambos os testes foram realizados com duas amostras para cada *locus*.

Após a otimização das reações, foram realizadas as amplificações para a análise populacional. As reações de amplificação para os *loci* selecionados continham tampão de reação 10x (sem MgCl<sub>2</sub>), 2,5 mM de dNTPs, 10pmol de cada *primer* (direto e reverso), 5U de Taq DNA Polimerase (Fermentas), aproximadamente 80 ng de DNA e MgCl<sub>2</sub> e água deionizada suficiente para completar o volume final de 10µL.

As condições de amplificação, descritas na Tabela 2, e a técnica da “PCR *Touchdown*”, utilizada para alguns *loci*, (Tabela 3) foram realizadas nos termocicladores PTC-100 e PTC-200 (MJ Research e Bio Rad).

Os produtos de amplificação (3µL) foram aplicados para análise por eletroforese em gel de agarose a 1%. Os géis foram corados com brometo de etídio

e observados e fotografados sob a luz ultravioleta com o fotodocumentador (ImageQuant 300 GE Healthcare Life Sciences).

**Tabela 2.** Condições de amplificação

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1- Desnaturação inicial	94°C	3 minutos
2- Desnaturação	94°C	40 segundos
3- Anelamento	Variável	30 segundos
4- Extensão	72°C	1 minuto e 30 segundos
5- Repetir a etapa 2	-	34 vezes
6- Extensão final	72°C	8 minutos

Os produtos amplificados foram visualizados por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida não desnaturante a 9%, (21 mL de H<sub>2</sub>O Milliq; 9 mL de poliacrilamida 30% [Acrilamida e Metilenobisacrilamida 29:1]; 1,5 ml de TBE 10 X, pH 8,3; 300 µL de Persulfato de Amônio a 10% e 30 µL de TEMED) e o tempo de corrida variou de acordo com o tamanho de cada *locus*. Os géis foram corados com nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>) a 2g/L e revelado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) (a 12g/L com 800µL de formaldeído).

O tamanho dos alelos, em pares de bases (bp) foi determinado pelo uso do programa “Alpha Index 6.5” (Alphamager<sup>TM</sup>: Alpha Inotech Corporation) que estimou o peso molecular das bandas no gel de poliacrilamida por comparação com o marcador 10 pb (Invitrogen) e o marcador 100 pb (Fermentas).

**Tabela 3.** Condições de amplificação *touchdown*

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
1- Desnaturação inicial	95°C	5 minutos
2- Desnaturação	95°C	45 segundos
3- Anelamento	63°C	45 segundos
4- Extensão	72°C	45 segundos
5- Repetir a etapa 2	-	1 vez
6- Desnaturação	95°C	45 segundos
7- Anelamento	61°C	45 segundos
8- Extensão	72°C	45 segundos
9- Repetir a etapa 6	-	1 vez
10- Desnaturação	95°C	45 segundos
11- Anelamento	59°C	45 segundos
12- Extensão	72°C	45 segundos
13- Repetir a etapa 10	-	1 vez
14- Desnaturação	95°C	45 segundos
15- Anelamento	57°C	45 segundos
16- Extensão	72°C	45 segundos
17- Repetir a etapa 14	-	1 vez
18- Desnaturação	95°C	45 segundos
19- Anelamento	55°C	45 segundos
20- Extensão	72°C	45 segundos
21- Repetir a etapa 18	-	25 vezes
22- Extensão final	72°C	10 minutos

Para evitar possíveis erros de genotipagem, todas as amostras para cada *locus* foram genotipadas duas vezes, por duas pessoas diferentes. Um controle positivo também foi utilizado. Além disso, após a confirmação da amplificação dos *loci* em gel de acrilamida, foram realizados testes para 12 amostras (por local amostrado) para cada *primer*, utilizando o sequenciador automático Alf Express II (GE Healthcare), a fim de confirmar a genotipagem manual.

Para a genotipagem automática, os *primers* diretos dos *loci* microssatélites foram construídos de acordo com o método econômico descrito por Schuelke (2000), que acrescenta na sequência do *primer* específico da região microssatélite (*primer* direto) uma seqüência de 18 nucleotídeos chamada de cauda M13. Além desses, foi construído também, um *primer* universal M-13 marcado com fluorescência Cy5 que permite a leitura dos fragmentos pelo sequenciador automático Alf Express II (GE Healthcare) utilizado.

De acordo com Schuelke (2000), os *primers* diretos foram diluídos a 0,04 pmol/ $\mu$ L, e os *primers* reverso e universal a 0,16 pmol/ $\mu$ L para uma reação com o volume final de 3  $\mu$ L. As amplificações dos microssatélites foram conduzidas no termociclador PTC-200 (MJ Research) e as condições da PCR foram as seguintes: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento dos *primers* variando entre 51°C a 58°C (dependendo do *primer*) por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, repetidas por 30 vezes, seguidas por outro ciclo para anelamento dos *primers* M13 com as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento do *primer* M13 a 53°C por 45 segundos, e extensão a 72°C por 45 segundos, repetidas por 8 vezes, com extensão final de 10 minutos a 72°C. As amostras foram corridas um corante próprio para sequenciadores automáticos (formamida 2:1 dextran blue) e também com o marcador interno 300 pb a 5 fmol/ $\mu$ L. O tamanho dos fragmentos em pares de base foi estimado pelo programa AlleleLocator v.1.03 (Amersham Pharmacia Biotech), por comparação com o marcador externo de 50-500 pb (5 fmol/ $\mu$ L).

## 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

### 3.6.1 Variabilidade Genética

A diversidade genética intrapopulacional foi caracterizada pelo número de alelos por *locus* ( $A$ ), riqueza alélica ( $A_r$ ), freqüências alélicas, déficit de heterozigidade intrapopulacional ( $F_{IS}$ ), heterozigidade observada ( $H_o$ ),

diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $H_e$ ), estimativas obtidas pelo uso dos programas ARLEQUIN v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2006), FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2002) e GENEPOP SOFTWARE (RAYMOND & ROUSSET, 1995).

A diferenciação genotípica, que consiste na distribuição de genótipos nas populações, foi estimada pelo teste exato de Fisher por meio do Genepop (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Para esta análise, a hipótese nula testada leva em consideração que a distribuição genotípica é idêntica em toda a população.

Para detectar a recente redução no tamanho efetivo da população foi utilizado o programa Bottleneck 1.2.02 (CORNUET & LUIKART, 1996) que avalia cada população de acordo com diferenças no excesso ou deficiência de heterozigosidade e às diferenças no número de alelos em uma dada população. A heterozigosidade foi medida sob os dois modelos mutação (TPM, com 70% e 30% SMM, com 5000 interações). O teste de Wilcoxon foi a opção escolhida para avaliar o nível de significância de excesso ou deficiência heterozigosidade. Este ensaio dispõe de alto poder estatístico e pode ser aplicado a alguns *loci* com baixo tamanho amostral.

### 3.6.2 Estrutura Genética

A distribuição da variabilidade genética entre e dentro das populações foi caracterizada pelas estatísticas  $*F$  de WRIGHT (COCKERHAM & WEIR, 1993), segundo a metodologia de NEI (1977). Esta estatística admite que todos os desvios de panmixia sejam exclusivamente devido aos efeitos da deriva genética e do sistema reprodutivo.

A estrutura genética de populações foi investigada pela Análise de Variância Molecular (AMOVA - *Analysis of Molecular VAriance*) (EXCOFFIER *et al.*, 1992), que leva em consideração a variância das frequências gênicas entre as diferentes localidades amostradas (WRIGHT, 1978). Portanto, o  $F_{ST}$  corresponde ao grau de subdivisão genética intraespecífica (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

A Análise de Variância Molecular e, as estimativas dos valores de  $\Phi_{ST}$  (WRIGHT, 1965, segundo a metodologia de NEI, 1977), baseados no número de diferentes alelos entre pares de populações (WEIR e COCKERHAM, 1984; MICHALAKIS e EXCOFFIER, 1996) foram calculados pelo programa ARLEQUIN "A Software for Population Genetics Data Analysis", versão 3.01 (EXCOFFIER *et al.*,

2006). Este mesmo programa foi utilizado para calcular uma estimativa análoga ao  $F_{ST}$ , o  $R_{ST}$  (SLATKIN, 1995). Enquanto que os valores de  $F_{ST}$  derivam da variância das frequências alélicas, os valores de  $R_{ST}$  levam em consideração a variância dos tamanhos dos alelos (BALLOUX e LUGON-MOULIN, 2002).

O programa estatístico Structure v.2.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000) foi utilizado para verificar a estrutura populacional. Este implementa um método bayesiano de agrupamento para inferir a estruturação populacional usando somente os dados genotípicos das amostras. Um modelo com um número K de populações (onde o K pode ser desconhecido) é assumido e cada uma das populações é caracterizada por um conjunto de frequências alélicas de cada *locus*. Então indivíduos da amostragem são designados probabilisticamente às populações, ou mutuamente para duas ou mais populações se seus genótipos indicarem que eles estão misturados. Para a determinação do número de populações (k) existentes utilizou-se o modelo de ancestralidade misturada (admixture), com os alelos correlacionados, que permite a resolução máxima na separação das populações com K variando de 2 a 8. Dez corridas independentes com 500.000 simulações em cadeias de Monte Carlo Markov e 100.000 gerações “burn in” foram usadas para cada valor de K.

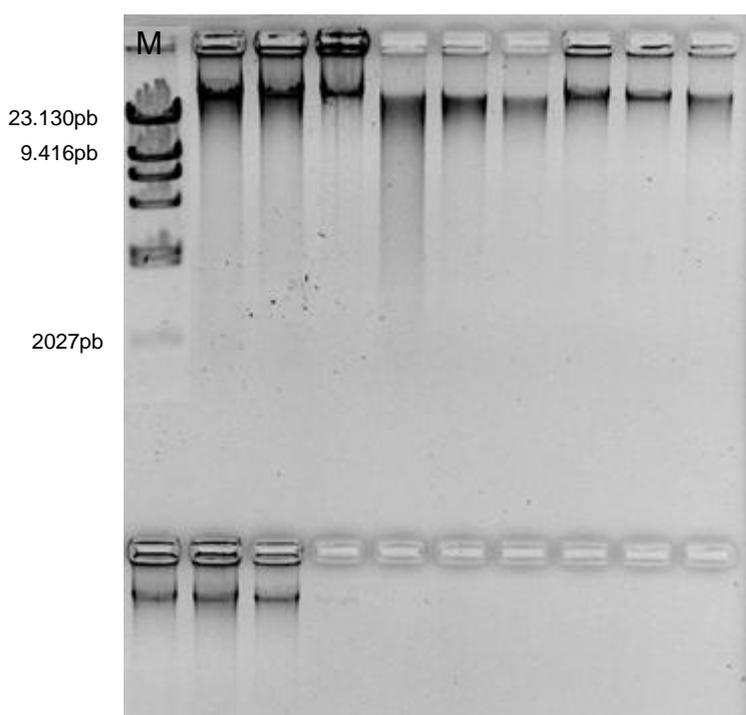
O dendograma foi gerado baseado nos valores da distância de Nei (1972), os quais foram agrupados pelo algoritmo UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) implementado no programa TFPGA “Tools for Population Genetic Analyses”, version 1.3 (Miller, 1997).

O  $Nm$  (número de migrantes) foi calculado pelo programa GENEPOP SOFTWARE (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Também foi verificada a presença ou ausência de alelos nulos, com o programa ML-Nullfreq (KALINOWSKI; TAPER, 2006).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

As extrações de DNA total foram realizadas com sucesso. O DNA extraído apresentou pouca degradação (caracterizado pela presença de arraste no gel) quando observadas em gel de agarose 0,8% (Figura 6), e forneceram material suficiente para o desenvolvimento deste trabalho.



**Figura 6.** Gel de agarose a 0,8% com DNA genômico extraído do tecido muscular de *Salminus hilarii* corado com brometo de etídeo. Nota: M= Marcador  $\lambda$ -Hind

No geral, os resultados obtidos das amostras de DNA extraídas do tecido muscular foram melhores para todos os locais amostrados, tanto em relação à quantidade de DNA quanto à qualidade, em comparação ao DNA extraído da nadadeira caudal.

As concentrações de DNA obtidas variaram de 23,2 a 957 ng/ $\mu$ L, para as amostras extraídas da nadadeira caudal e de 108 a 2452,5 ng/ $\mu$ L, para as provenientes de tecido muscular. Ambas com bons níveis de pureza, mostrados pelas razões entre os comprimentos de onda de 260/280 próximos a 2.0.

## 4.2 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA

A digestão com a enzima *Rsa* I resultou em um arraste do DNA genômico ou “smear”, indicando que o DNA extraído da amostra A22 (denominada T1) estava com boa qualidade (Figura 7). O DNA genômico foi digerido, não gerando nenhum tamanho preferencial de fragmentos, produzindo assim, o perfil adequado para a construção da biblioteca. Como a enzima corta no sítio GT↓AC de forma abrupta, a ligação dos adaptadores foi importante para garantir que cada fragmento tivesse uma terminação comum e conhecida.



**Figura 7** Imagem da eletroforese em gel de agarose de amostras de DNA após digestão com enzima de restrição *Rsa* I. O círculo vermelho indica a amostra T1, e a seta indica a banda de 500pb do marcador.

Dos 96 clones gerados, apenas 40 foram seqüenciados (6 no CBMEG e 34 no Laboratório de Genômica) destes 28 apresentaram repetições do tipo microssatélites, o que corresponde a uma eficiência de enriquecimento de 70% .

Ao analisar as 28 seqüências, apenas 15 delas possibilitaram o desenho de *primers*. Isso ocorreu porque nem todas as seqüências apresentaram boas regiões flanqueadoras, principalmente para o desenho do *primer* reverso. Por isso, a eficiência de construção da biblioteca reduziu para 53,57%. Das 15 seqüências obtidas, que continham regiões ricas em microssatélites, foram desenhados 7 pares de *primers* (Tabela 4), todos flanqueando microssatélites dinucleotídeos perfeitos.



Tabela 4. *Primers* para a espécie *Salminus hilarii*

<i>Loci</i>	Seqüência dos <i>Primers</i>	Motivo	Tamanho total (pb)	Tipo
Sh01	F - 5' TGG TTC TAA GTC TGG ATA AAG G- 3' R - 5' ACA CAC ACA CAA ACT CAC AAA G- 3'	(GT) <sub>26</sub>	191	Perfeito
Sh05	F - 5' CTA TCT GAT ACG CCC CGG TC- 3' R - 5' CTC GTC CAG GGT CAT CTC CTT A- 3'	(TG) <sub>15</sub>	182	Perfeito
Sh07	F - 5' GTA CAA CAA ACG TGT CCT CCA C- 3' R - 5' CGT ATA GAG CTC TGG GCT ATT G- 3'	(AC) <sub>13</sub>	282	Perfeito
Sh08	F - 5' AGA AGC GGG AAC ACA CAC AC- 3' R - 5' CCT CAG ACG TGA TCT GAT AAG G- 3'	(AC) <sub>12</sub>	184	Perfeito
Sh10	F - 5' CGG CTC CAT GCC TTA GAA TG- 3' R - 5' GGG GTG TGT TTC CAG AAC AA- 3'	(GT) <sub>24</sub>	132	Perfeito
Sh12	F - 5' GTT ATA CTG TGG GGT TAA CAT G - 3' R - 5' GAT GCT ACC AAG GGT TCT CAG T- 3'	(CA) <sub>13</sub>	235	Perfeito
Sh16	F - 5' CCT CAG ACG TGA TCT GAT AAG G 3' R - 5' GCG TCG GAG CAG TAG TTA TA 3'	(TG) <sub>10</sub>	200	Perfeito

#### 4.2.1 Testes de amplificação dos microssatélites

Dos 7 pares de *primers* desenhados e confeccionados, um não amplificou (Sh08), mesmo com diversas modificações como: quantidade e concentração dos reagentes, bem como, nas alterações das condições de amplificação da PCR. Os testes de amplificação variaram de *locus* para *locus*. Como a PCR é bastante sensível a uma série de fatores, principalmente, em relação aos reagentes utilizados na reação (concentração de magnésio, tampão e dNTP) e à temperatura de anelamento dos *primers*, diferentes programas de amplificação foram utilizados.

O par de *primers* Sh07 amplificou, mas ainda necessita de ajustes na reação para ser avaliado, portanto foi excluído das análises posteriores, restando apenas os *primers* Sh01, Sh05, Sh10, Sh12 e Sh16 para as análises populacionais (Apêndice A). As temperaturas de anelamento mais adequadas para cada par de *primers* variaram de 51°C a 58°C e a concentração de MgCl<sub>2</sub> variou de 1,5mM a 2,5mM (Tabela 5).

**Tabela 5.** Condições de amplificação para os *loci*

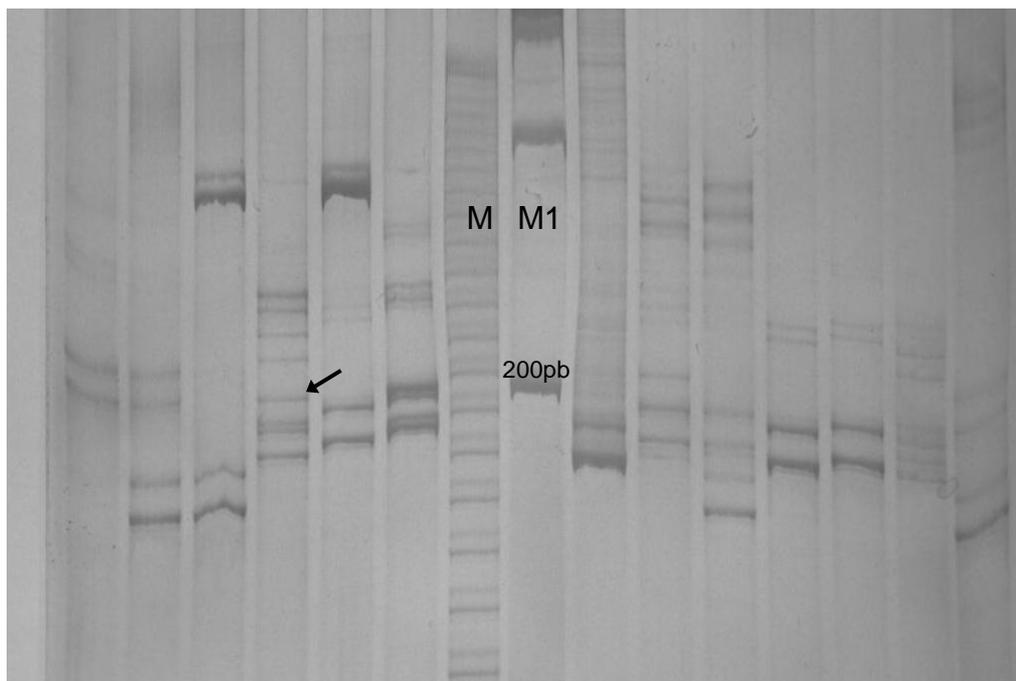
<i>Loc</i>	Temperatura de anelamento	Concentração de MgCl <sub>2</sub>
Sh01	58°C	1,5mM
Sh05	51°C	2,0mM
Sh10	55°C	2,5mM
Sh12	54° C	1,5mM
Sh16	58° C	1,5mM

Para os *loci* Sh05 e Sh10, depois de tentativas mal sucedidas da amplificação, foi utilizada a estratégias de PCR *touchdown* (na qual a temperatura de anelamento diminui com o avanço nos ciclos de amplificação da PCR) sendo possível, somente assim, amplificar esses *loci*.

A partir da relevação dos géis de poliacrilamida 9% foram observadas para os *loci* amplificações inespecíficas (bandas *stutters*). Os *loci* Sh01 e Sh05 (figura 9) apresentaram excesso destas bandas. Já os outros *loci* Sh10 (figura 10) Sh12 e Sh16 apesar de também apresentarem bandas *stutters*, essas não atrapalharam na identificação dos alelos microssatélites.

Por esse motivo, todas as amostras para os cinco *loci* foram reavaliadas para a confirmação dos resultados em géis de poliacrilamida 9%.

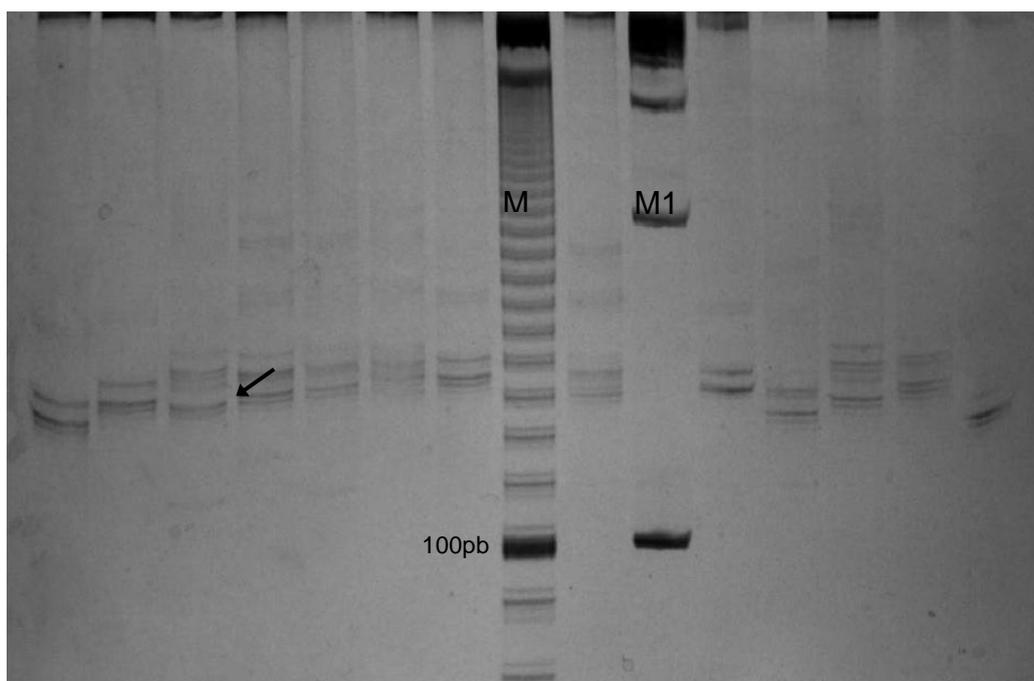
Desta forma, antes de iniciar a genotipagem manual, a análise de todos os *loci* no sequenciador automático fez-se necessária para evitar possíveis erros de genotipagem.



**Figura 9.** Gel de poliacrilamida 9% para o *locus* Sh05

Nota: a) M e M1 representam, respectivamente, o marcador 10 pb e 100 pb.

b) a seta indica banda *stutter*.



**Figura 10.** Gel de poliacrilamida 9% para o *locus* Sh10

Nota: a) M e M1 representam, respectivamente, o marcador 10 pb e 100 pb.

b) a seta indica o alelo de 130 pb.

### 4.3 ANÁLISE DA DIVERSIDADE GENÉTICA POPULACIONAL

Os cinco *loci* microssatélites utilizados para os 151 animais estudados nas quatro populações de *Salminus hilarii* foram polimórficos, sendo encontrados no total 81 alelos. No apêndice B estão representados os todos os genótipos amostrados.

#### 4.3.1 Análise Intrapopulacional

##### 4.3.1.1 Alelos encontrados em cada locus microssatélite

A partir da revelação dos géis de poliacrilamida a 9%, foram encontrados 16 alelos para o *locus* Sh01 (tabela 6), 20 alelos para o *locus* Sh05 (tabela 7), 12 alelos para o *locus* Sh10 (tabela 8), 18 alelos para o *locus* Sh12 (tabela 9) e 15 alelos para o *locus* Sh16 (tabela 10).

O tamanho alélico máximo encontrado entre todos os *loci* analisados foi de 257 pb no *locus* Sh12 (tabela 9) e o tamanho mínimo encontrado foi de 122 pb para o *locus* Sh10 (tabela 8).

**Tabela 06.** Relação dos alelos encontrados no *locus* Sh01 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições

Alelos	Tamanho total (pb)	Nº de repetições
01	173	(GT) <sub>17</sub>
02	177	(GT) <sub>19</sub>
03	179	(GT) <sub>20</sub>
04	181	(GT) <sub>21</sub>
05	183	(GT) <sub>22</sub>
06	185	(GT) <sub>23</sub>
07	187	(GT) <sub>24</sub>
08	189	(GT) <sub>25</sub>
09	191	(GT) <sub>26</sub>
10	195	(GT) <sub>28</sub>
11	197	(GT) <sub>29</sub>
12	199	(GT) <sub>30</sub>
13	201	(GT) <sub>31</sub>
14	203	(GT) <sub>32</sub>
15	205	(GT) <sub>33</sub>
16	211	(GT) <sub>36</sub>

**Tabela 07.** Relação dos alelos encontrados no *locus* Sh05 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições

<b>Alelos</b>	<b>Tamanho total (pb)</b>	<b>N° de repetições</b>
01	168	(TG) <sub>08</sub>
02	170	(TG) <sub>09</sub>
03	172	(TG) <sub>10</sub>
04	174	(TG) <sub>11</sub>
05	176	(TG) <sub>12</sub>
06	178	(TG) <sub>13</sub>
07	180	(TG) <sub>14</sub>
08	182	(TG) <sub>15</sub>
09	184	(TG) <sub>16</sub>
10	186	(TG) <sub>17</sub>
11	188	(TG) <sub>18</sub>
12	190	(TG) <sub>19</sub>
13	192	(TG) <sub>20</sub>
14	194	(TG) <sub>21</sub>
15	196	(TG) <sub>22</sub>
16	198	(TG) <sub>23</sub>
17	200	(TG) <sub>24</sub>
18	202	(TG) <sub>25</sub>
19	204	(TG) <sub>26</sub>
20	206	(TG) <sub>27</sub>

**Tabela 08.** Relação dos alelos encontrados no *locus* Sh10 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições

<b>Alelos</b>	<b>Tamanho total (pb)</b>	<b>N° de repetições</b>
01	122	(GT) <sub>19</sub>
02	124	(GT) <sub>20</sub>
03	126	(GT) <sub>21</sub>
04	128	(GT) <sub>22</sub>
05	130	(GT) <sub>23</sub>
06	132	(GT) <sub>24</sub>
07	134	(GT) <sub>25</sub>
08	136	(GT) <sub>26</sub>
09	138	(GT) <sub>27</sub>
10	140	(GT) <sub>28</sub>
11	142	(GT) <sub>29</sub>
12	148	(GT) <sub>32</sub>

**Tabela 09.** Relação dos alelos encontrados no *locus* Sh12 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições

<b>Alelos</b>	<b>Tamanho total (pb)</b>	<b>N° de repetições</b>
01	221	(CA) <sub>06</sub>
02	223	(CA) <sub>07</sub>
03	225	(CA) <sub>08</sub>
04	227	(CA) <sub>09</sub>
05	229	(CA) <sub>10</sub>
06	231	(CA) <sub>11</sub>
07	233	(CA) <sub>12</sub>
08	235	(CA) <sub>13</sub>
09	237	(CA) <sub>14</sub>
10	239	(CA) <sub>15</sub>
11	241	(CA) <sub>16</sub>
12	243	(CA) <sub>17</sub>
13	245	(CA) <sub>18</sub>
14	247	(CA) <sub>19</sub>
15	249	(CA) <sub>20</sub>
16	251	(CA) <sub>21</sub>
17	253	(CA) <sub>22</sub>
18	257	(CA) <sub>24</sub>

**Tabela 10.** Relação dos alelos encontrados no *locus* Sh16 classificados quanto ao tamanho total em pares de base (pb) e número de repetições

<b>Alelos</b>	<b>Tamanho total (pb)</b>	<b>N° de repetições</b>
01	188	(TG) <sub>04</sub>
02	192	(TG) <sub>06</sub>
03	194	(TG) <sub>07</sub>
04	196	(TG) <sub>08</sub>
05	198	(TG) <sub>09</sub>
06	200	(TG) <sub>10</sub>
07	202	(TG) <sub>11</sub>
08	204	(TG) <sub>12</sub>
09	206	(TG) <sub>13</sub>
10	208	(TG) <sub>14</sub>
11	210	(TG) <sub>15</sub>
12	212	(TG) <sub>16</sub>
13	214	(TG) <sub>17</sub>
14	216	(TG) <sub>18</sub>
15	218	(TG) <sub>19</sub>

#### 4.3.1.2 Diversidade alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg

De acordo com o número de alelos totais para cada local amostrado (tabela 11), o Rio Grande (Igarapava) foi à região que apresentou maior número de alelos, 73 no total. E o rio Paranapanema e o Rio Grande (Lavras) apresentaram ambos, o menor número de alelos (66). Levando em consideração que para o rio Paranapanema foram amostrados somente 19 animais. A riqueza alélica (número de alelos ajustados para o menor tamanho amostral) variou de 9,21 para o *locus* Sh10 (amostragem do Tietê) a 14,69 para *locus* Sh01 (amostra do Paranapanema), tabela e figura 11.

A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) por *locus* variou de 0,80 para Sh12 a 1 para Sh05, Sh10 e Sh12 (tabela 11). A menor heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foi de 0,86 para as amostras de Rio Grande (Lavras) e a população correspondente ao rio Paranapanema foi a que apresentou maior valor desta estimativa ( $H_e = 0,939$ ) tanto para o *locus* Sh01 como para o Sh12.

A maior diversidade alélica foi encontrada para a amostragem de RG Igarapava (14,6) enquanto que a menos foi 13,2 para Paranapanema e RG Lavras.

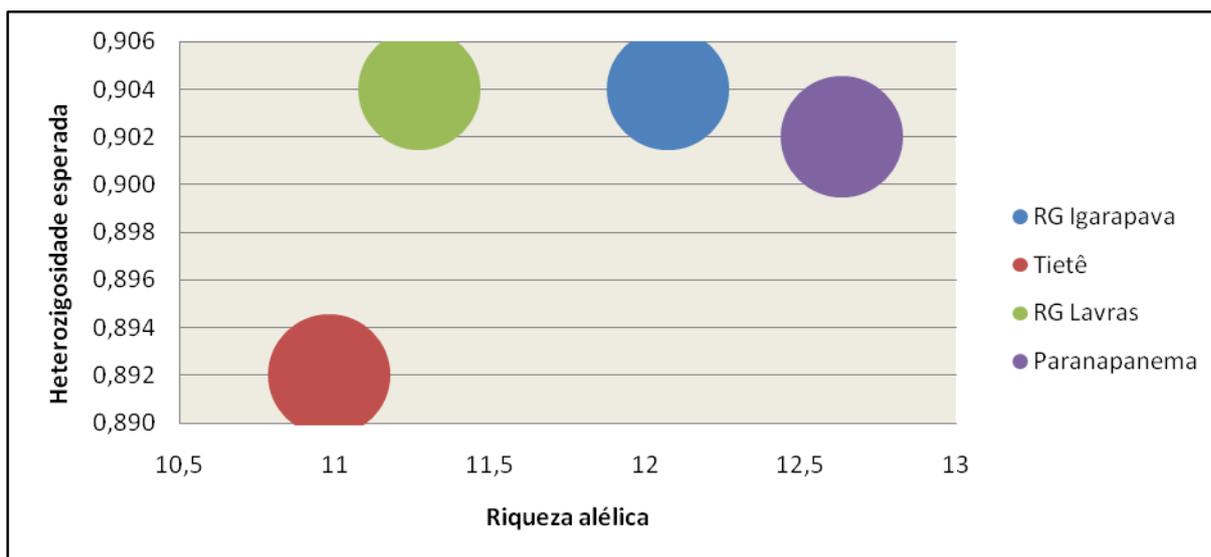
De acordo com o teste exato de Guo-Thompson e a cadeia de Markov verificou-se que todas as populações, com exceção de Igarapava (*locus* Sh05) e Paranapanema (*locus* Sh10 e Sh16) apresentaram desvios significativos das proporções esperadas pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg. Esses desvios são provavelmente atribuídos a um excesso de heterozigotos verificado por meio dos valores de  $F_{is}$  (coeficiente de endogamia) negativos. Esses valores variaram de -0,163 (Sh10- RG Lavras) a 0,136 (Sh12- RG Igarapava).

Nos dados de desequilíbrio de ligação (Apêndice H) observou-se que não houve associações significativas nas análises par a par realizadas para os *loci*.

**Tabela 11.** Resumo estatístico da diversidade genética de 5 *loci* microssatélites de *Salminus hilarii* em 4 locais amostrados: número de alelos (A), riqueza alélica ( $A_R$ ); heterozigosidade observada ( $H_o$ ) heterozigosidade esperada ( $H_e$ ); equilíbrio de Hardy Weinberg ( $P_{HW}$ ); coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ).

Local	Locus	A	$A_R$	$H_o$	$H_e$	$P_{HW}$	$F_{IS}$
RG Igarapava	Sh01	14	11,57	0,943	0,902	*	-0,054
	Sh05	19	14,68	0,972	0,931	**	-0,044
	Sh10	12	10,78	1,000	0,886	*	-0,131
	Sh12	15	12,64	0,800	0,924	*	0,136
	Sh16	13	10,70	0,923	0,876	*	-0,055
	Média	14,6	12,07	0,928	0,904		
	DP	(2,70)	(1,65)	(0,07)	(0,02)		
Tietê	Sh01	14	11,71	0,944	0,916	*	-0,035
	Sh05	19	13,08	0,959	0,914	*	-0,050
	Sh10	10	9,21	1,000	0,879	*	-0,139
	Sh12	13	10,54	0,944	0,876	*	-0,076
	Sh16	13	10,36	0,893	0,874	*	-0,022
	Média	13,8	10,98	0,948	0,892		
	DP	(3,27)	(1,47)	(0,04)	(0,02)		
RG Lavras	Sh01	14	10,96	0,892	0,900	*	0,009
	Sh05	13	11,26	1,000	0,915	*	-0,095
	Sh10	10	9,22	1,000	0,865	*	-0,163
	Sh12	16	13,65	0,944	0,930	*	-0,016
	Sh16	13	11,27	0,838	0,912	*	0,083
	Média	13,2	11,27	0,935	0,904		
	DP	(2,17)	(1,58)	(0,07)	(0,02)		
Paranapanema	Sh01	16	14,69	0,947	0,939	*	-0,016
	Sh05	13	13,00	1,000	0,887	*	-0,132
	Sh10	10	10,00	0,938	0,879	NS	-0,069
	Sh12	16	14,96	1,000	0,939	*	-0,067
	Sh16	11	10,50	0,947	0,902	NS	-0,052
	Média	13,2	12,63	0,966	0,902		
	DP	(3,60)	(3,12)	(0,03)	(0,03)		

\* $p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,05$ ; NS= não significativo;

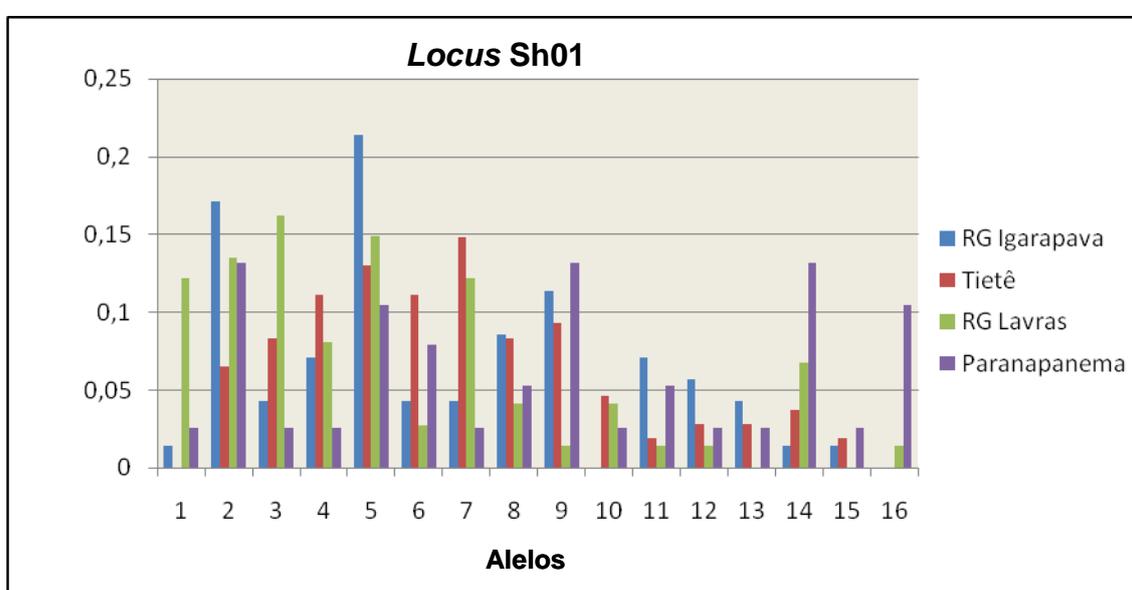


**Figura 11.** Médias de riqueza alélica e heterozigosidade esperada de cada local amostrado.

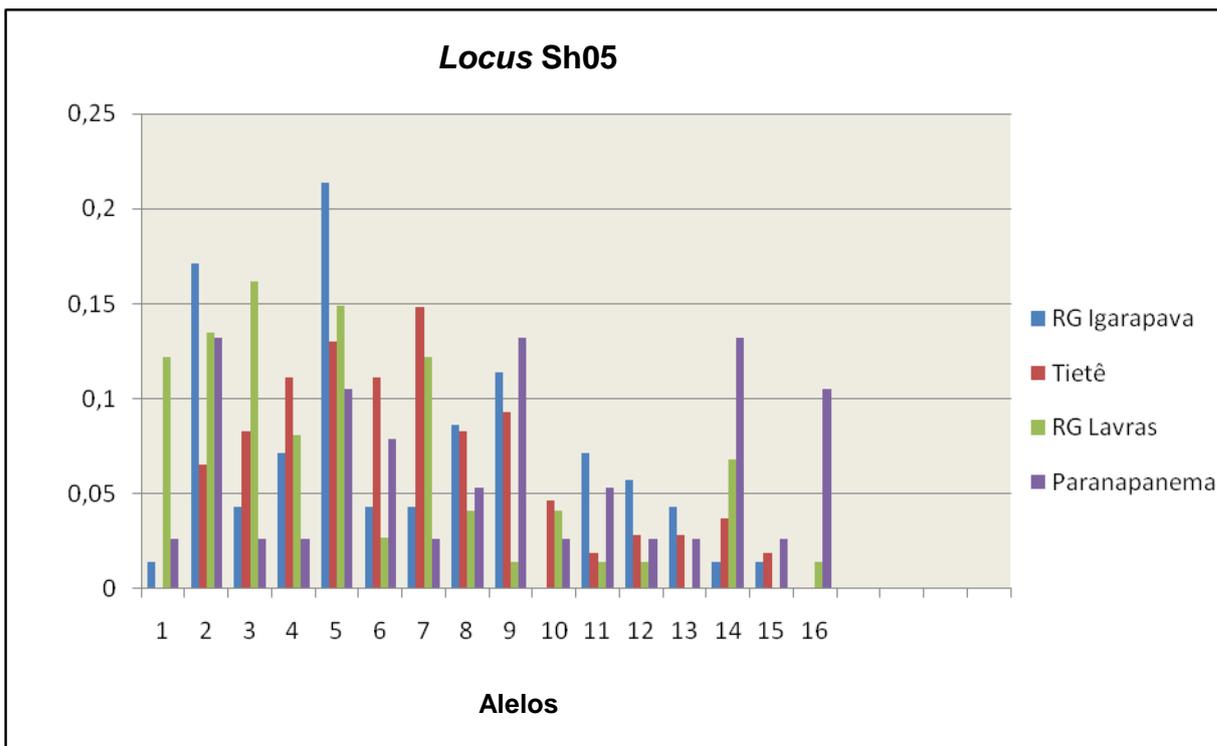
#### 4.3.1.3 Frequências alélicas

Os padrões das freqüências alélicas (Apêndices C a G e figuras 12 a 16) apresentaram variação entre as amostragens, especialmente para as amostras capturadas no Rio Grande (Igarapava) que apresentaram 2 alelos exclusivos, um para o *locus* Sh10 e o outro para o *locus* Sh16.

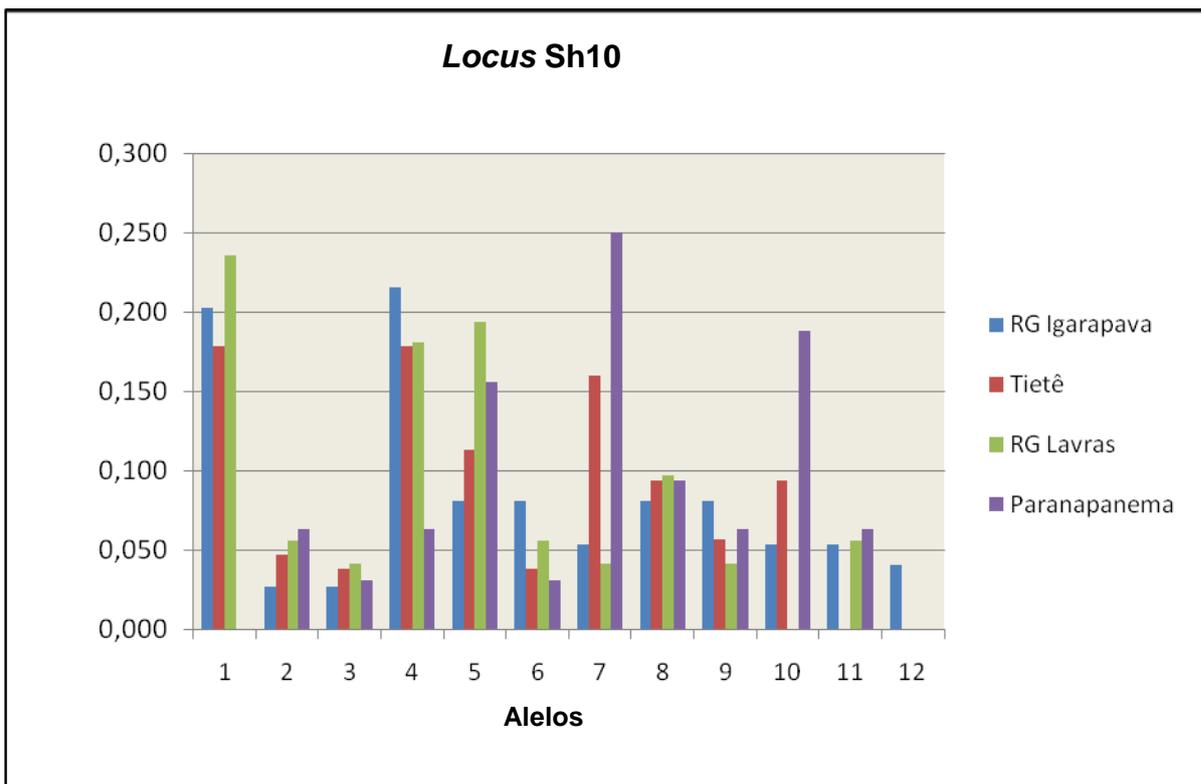
A maior freqüência alélica encontrada foi 0,256 para o alelo 8 *locus* Sh16 (figura 16), proveniente também da região de Igarapava.



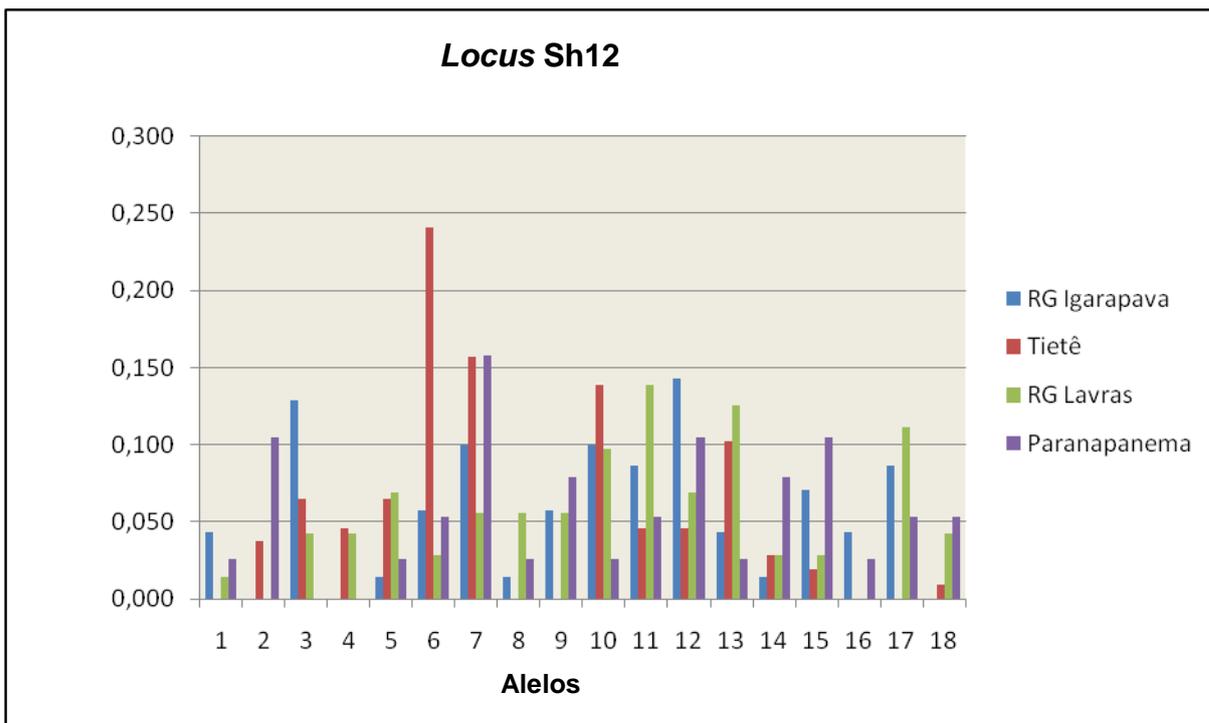
**Figura 12.** Frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh01.



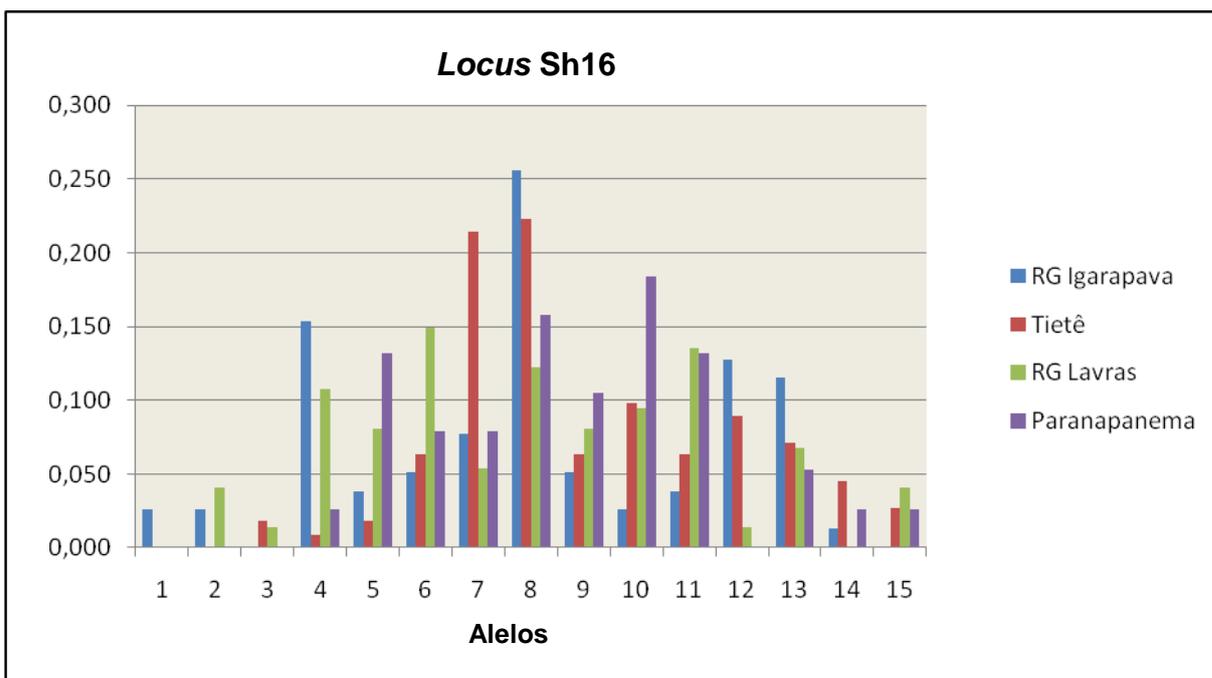
**Figura 13.** Frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh05



**Figura 14.** Frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh10



**Figura 15.** Frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh12.



**Figura 16.** Frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh16

#### 4.3.1.4 Efeito gargalo

A análise no programa Bottleneck indicou a ocorrência de uma redução populacional recente na amostragem proveniente do Rio Grande – Lavras. A partir das análises sob os dois modelos evolutivos de microssatélites TPM e SMM, (determinadas com o teste de Wilcoxon), foram encontrados valores significativos ( $p < 0,05$ ) para o excesso de heteroziguidade. Valores significativos também foram observados nas populações de Rio Grande - Igarapava e Tietê. Apesar das populações de Rio Grande (Igarapava) e Tietê ter demonstrado um excesso de heteroziguidade significativa sob o modelo mutacional TPM (modelo bifásico), essas populações não demonstraram uma probabilidade significativa sob o rigoroso modelo mutacional SMM (modelo de mutação aos passos) para o excesso de heterozigose. Portanto, não é certo que as populações de Igarapava e Tietê passaram por um efeito gargalo. Já para a população do Paranapanema, não foram encontrados valores significativos para o excesso da heterozigose.

### 4.3.2 ANÁLISE INTERPOPULACIONAL

#### 4.3.2.1 Diferenciação genética

A tabela 12 apresenta os valores de diversidade genética obtidos pelo índice  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  das análises par a par entre as populações.

O índice  $F_{ST}$  apresentou valores significativos ( $p < 0,05$ ) entre todas as populações. A maior diferenciação genética ocorreu entre a população do Rio Grande (Lavras) e a população do Tietê, com  $F_{ST}$  de 0,02605. Na comparação entre Rio Grande (Lavras) e Paranapanema foi encontrado o menor valor de  $F_{ST}$  (0,00979).

Para o  $R_{ST}$ , calculado a partir da média dos componentes de variância, os valores significativos variam de 0,05137 entre as populações do Tietê e Igarapava a 0,11584 entre as populações de Rio Grande (Lavras) e Paranapanema. Valores não significativos foram encontrados das comparações entre (RG Igarapava x RG Lavras) e (RG Igarapava x Paranapanema).

**Tabela 12.** Diferenciação genética utilizando os índices  $F_{ST}$  (diagonal inferior) e  $R_{ST}$  (diagonal superior) entre pares de populações de *Salminus hilarii* para todos os loci estudados.

	RG Igarapava	Tietê	RG Lavras	Paranapanema
RG Igarapava	-	0,05137*	0,00857 <sup>NS</sup>	0,02000 <sup>NS</sup>
Tietê	0,02063*	-	0,11135*	0,08505**
RG Lavras	0,01366*	0,02605*	-	0,11584*
Paranapanema	0,01276*	0,02148*	0,00979**	-

Baseado em 1000 permutações. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,05$ ; NS= não significativo.

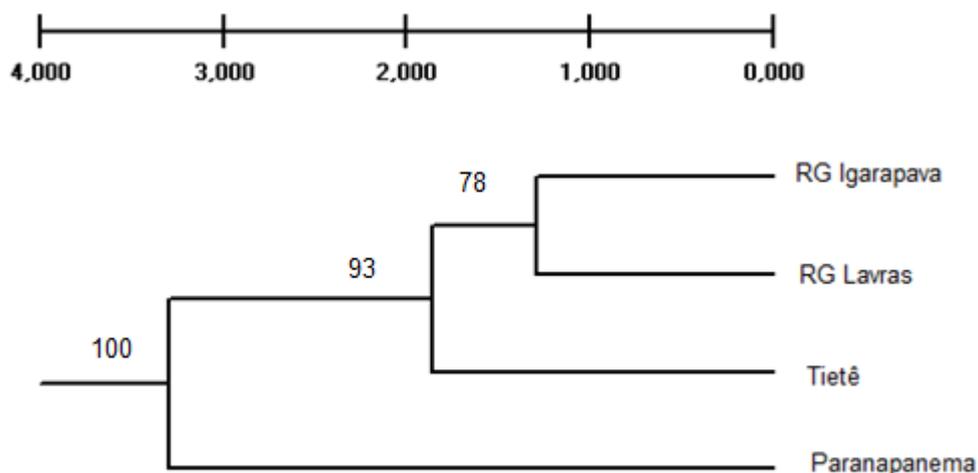
No teste exato de Fischer, que avalia a heterogeneidade na distribuição das frequências genóticas (tabela 13), houve diferenças significativas para todas as comparações entre as populações, sendo que, os valores altamente significativos de  $p$ -value foram encontrados nas comparações envolvendo a população do Tietê.

**Tabela 13.** Diferenciação genotípica estimada pelo teste exato de Fisher entre populações de *Salminus hilarii*.

Pares de populações	$p$ -value
RG Igarapava e Tietê	altamente significativo
RG Lavras e RG Igarapava	$p < 0,01$
RG Lavras e Tietê	altamente significativo
Paranapanema e RG Igarapava	$p < 0,01$
Paranapanema e RG Lavras	$p < 0,01$

A partir do cálculo da distância de Nei (1978) pelo programa TFPGA “Tools for population Genetic Analyses”, versão 1.3 (MILLER, 1997), foi obtido um dendograma do tipo UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*) para as populações de tabarana (Figura 17).

O dendograma mostrou claramente que a menor distância genética se encontra entre as amostras pertencentes ao Rio Grande (Lavras e Igarapava), enquanto a amostragem de Paranapanema é a que apresenta maior distância genética em comparação aos outros locais amostrados.



**Figura 17.** Dendrograma com os valores de *bootstrap* obtido a partir de dados de microssatélites, por meio do método UPGMA, com base nos valores de distância genética de Nei (1978) encontrados entre populações de *S. hilarii* da bacia do Alto Paraná.

#### 4.3.2.2 AMOVA (Análise de Variância Molecular)

Os resultados da Análise de Variância Molecular (AMOVA - *Analysis of Molecular Variance*) utilizando os índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  estão descritos nas tabelas 14 e 15. Para esta análise foram considerados três níveis de hierarquização: o primeiro considerando todas as populações como um único grupo, o segundo separando as populações em dois grupos (grupo I = Rio Grande - Lavras e Igarapava; grupo II = Tietê e Paranapanema) e por último 3 grupos (grupo I = Rio Grande - Lavras e Igarapava; grupo II = Tietê; grupo III = Paranapanema). Mas, somente o resultado da primeira hierarquização foi apresentado neste trabalho, uma vez que os resultados obtidos não diferiram de modo significativo.

**Tabela 14.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o  $F_{ST}$  e considerando todas as populações de *Salminus hilarii* em um mesmo grupo.

<b>Causas da variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Componentes de Variância</b>	<b>Porcentagem de Variância</b>
Entre populações	3	9,278	0,02504	1,92
Dentro das populações	298	380,907	1,27821	98,08
Total	301	390,185	1,30325	

$$\Phi_{st} = 0,01921^*$$

\*significa  $p < 0,0001$ . Baseado em 1023 permutações

**Tabela 15.** Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o  $R_{ST}$  e considerando todas as populações de *Salminus hilarii* em um mesmo grupo.

<b>Causas da variação</b>	<b>Graus de Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Componentes de Variância</b>	<b>Porcentagem de Variância</b>
Entre populações	3	757,773	2,90997	6,52
Dentro das populações	298	12430,001	41,71141	93,48
Total	301	13187,775	44,62138	

$$R_{ST} = 0,06521^*$$

\*significa  $p < 0,0001$ . Baseado em 1023 permutações

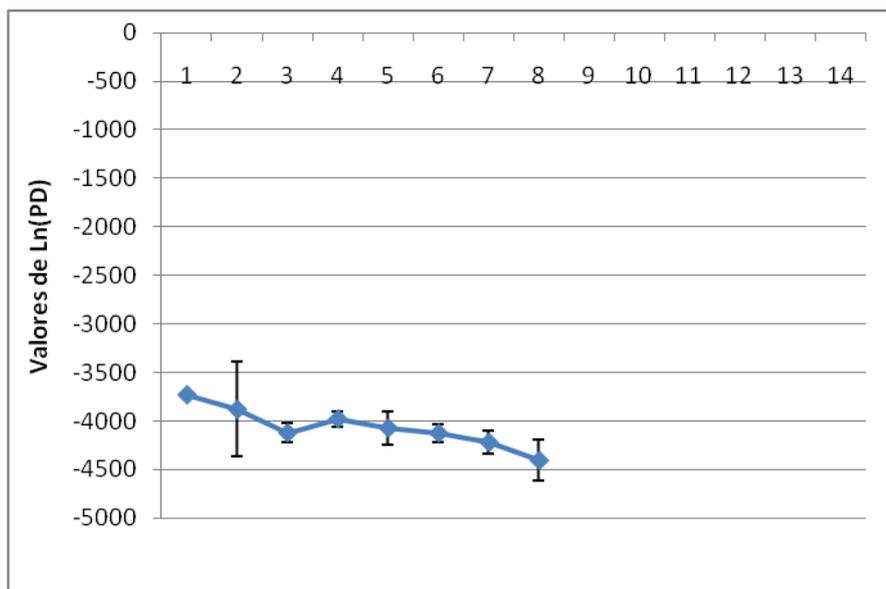
De acordo com os resultados de AMOVA, verificou-se que 1,92% da variabilidade genética estão representados entre as populações, de modo que 98,08% concentram-se dentro das mesmas. Embora o valor de  $F_{ST}$  seja significativo, ele é baixo o que demonstrou baixa estruturação genética.

Da mesma forma, que o  $F_{ST}$  a análise da AMOVA obtida por meio do  $R_{ST}$ , resultou em uma variabilidade maior dentro das populações (93,48%).

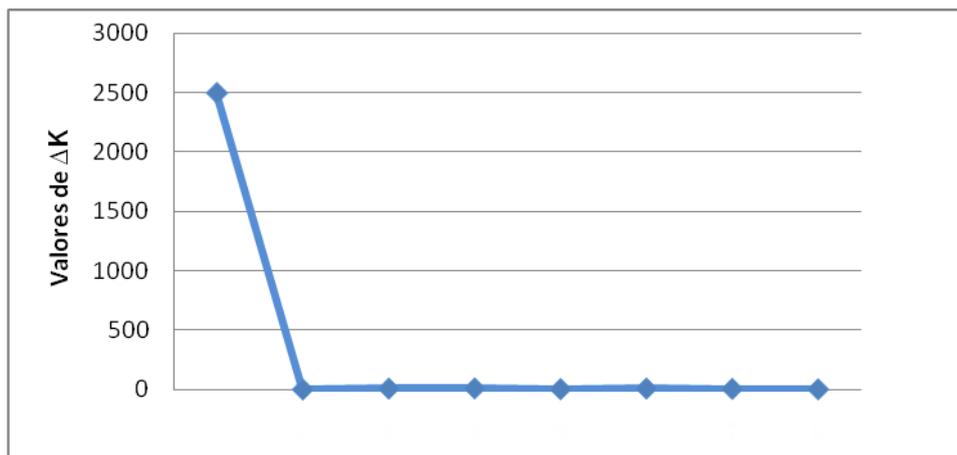
#### 4.3.2.2 Estruturação populacional e fluxo gênico

A análise Bayesiana gerada pelo programa Sstructure 2.2 (Pritchard, 2000) foi realizada para avaliar a distinção do número de populações (K).

Na análise *admixture* foram testadas as possibilidades de 1 a 8 populações que gerou os valores de Ln(PD). O gráfico (Figura 18) mostra os valores de Ln(PD) em relação ao número de populações testadas. É considerado o número mais provável de populações (K) aquele que possui o maior valor de Ln(PD). Quando o gráfico atinge um platô, escolhe-se o K de acordo com aquele que apresentar menor desvio padrão. Os resultados obtidos mostraram que K=1 seria o número mais provável de população existente para tabarana. Evanno *et al.* (2005) verificaram que em muitos casos os valores de Ln(PD) não oferecem uma estimativa acurada dos valores de K. Sendo assim, os autores delinearam uma metodologia para a determinação do K mais provável que utiliza o delta K ( $\Delta K$ ) dos valores de Ln(PD). Utilizando esse método obteve-se, também k=1 (figura 19) como sendo o número de população encontrada dos dados analisados nesse trabalho.

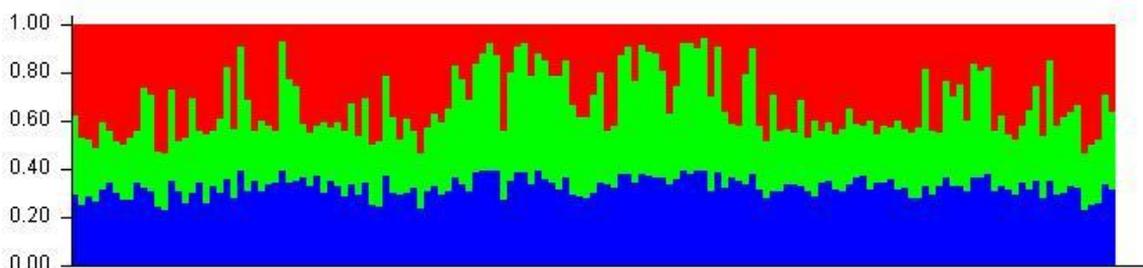


**Figura 18.** Valores de Ln(PD) em relação ao número de populações (K) testadas.



**Figura 19.** Valores de ( $\Delta K$ ) em relação ao número de populações (K) testadas.

A figura 20 é a representação gráfica da estrutura populacional resultante da análise bayesiana nas populações de tabarana (*Salminus hilarii*) da bacia do Alto Paraná. Não houve a divisão das populações, ilustrado pela ausência da divisão vertical de cores, que representam os *clusters* (k).



**Figura 20.** Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam cada população.

Os valores de número de migrantes ( $Nm$ ) entre as populações, calculados com base na estimativa de alelos privados encontrados nos *loci* amostrados, apresentou um valor de  $Nm= 3,775$ , indicando alto fluxo gênico.

O teste de Mantel revelou uma correlação não significativa ( $P= 0,88$ ) entre a distância geográfica e a distância gênica (valores de  $F_{ST}$  par a par).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

Para garantir o sucesso da construção da biblioteca enriquecida em microssatélites, além da concentração do DNA estar entre 150 a 250ng/  $\mu\text{L}$ , a etapa inicial e principal era a obtenção do DNA de boa qualidade. A boa qualidade do DNA é essencial para se obter bons resultados em experimentos, especialmente na reação da polimerase em cadeia (PCR), na qual excessos de estruturas celulares e proteínas podem inibir o processo de amplificação (SAIKI, 1988 apud MARENGONI *et al.*, 2006).

Apesar das altas concentrações de DNA obtidas por meio do protocolo de extração utilizado no presente estudo, os melhores resultados das amplificações dos *loci* microssatélites ocorreram em quantidades inferiores a 85 ng/ $\mu\text{L}$ . No geral, as amostras apresentaram bons níveis de pureza, mostrados pelas razões entre os comprimentos de onda de 260/280 próximos a 2. Uma amostra de DNA considerada pura apresenta razão entre 1,8 a 2,0, se essa razão for menor possivelmente há contaminação (LEHNINGER *et al.*, 2004).

### 5.2 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA

O protocolo de construção da biblioteca genômica enriquecida com microssatélites envolve uma série de etapas, que necessitam de um cuidado especial durante a execução desses procedimentos, de forma que os erros nas etapas anteriores, só são vistos nas etapas finais, como no seqüenciamento dos clones positivos.

De acordo com ZANE *et al.* (2002) dentre os vários protocolos de isolamento de microssatélites disponíveis na literatura, a metodologia na qual se utiliza hibridização seletiva com partículas magnéticas para o isolamento de marcadores microssatélites (utilizada neste estudo), resulta em uma eficiência que pode variar de 20% a 90% na identificação de clones positivos. Enquanto o método tradicional de isolamento de microssatélites (hibridização com sondas) resulta uma taxa média de clones positivos para peixes de 3,1%, sendo o mínimo de 0,066 e o máximo de

8,92%. A construção da biblioteca enriquecida em microssatélites para a tabarana correspondeu a 70% de eficiência na identificação de clones positivos (28 clones contendo microssatélites dos 40 clones seqüenciados).

O motivo GT e AC foi o que apresentou maior freqüência, corroborando com Goff (1992) que reportou que os microssatélites predominantes em peixes compreendiam repetições de duas bases, usualmente  $(GT/AC)_n$  ou  $(CT/GA)_n$ . Sanches (2006) também encontrou em seu trabalho os motivos GT e AC como sendo os mais comuns para a *Brycon hilarii*, porém utilizando uma técnica diferente da realizada neste estudo.

Apesar da biblioteca genômica enriquecida em microssatélite utilizar sondas biotiniladas que carregavam motivos dinucleotídeos, foi encontrado outros tipos de repetições microssatélites como tri e tetra. Relatos assim são comuns de serem encontrados na literatura (BUTCHER *et al.*, 2000; ASHKENAZI *et al.*, 2001).

Um dos maiores problemas encontrados após o sequenciamento dos clones foi à falta de seqüências flanqueadoras apropriadas para a confecção dos *primers*, principalmente para o desenho do *primer* reverso, já que na maioria dos casos a região sequenciada de boa qualidade não compreendia a região flanqueadora reverso. É importante obter regiões flanqueadoras de boa qualidade, uma vez que o polimorfismo nestas regiões pode afetar os sítios de anelamento dos *primers*, promovendo o aparecimento de alelos nulos (RALLO, DOURADO e MARTÌN, 2000).

Para o desenho dos *primers*, deu-se preferência então, a microssatélites com motivos dinucleotídicos perfeitos, haja vista que microssatélites perfeitos são tidos, em média, como mais polimórficos do que aqueles com interrupções dentro dos motivos (WEBER, 1990).

### 5.3 TESTES DE AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES

Dos sete marcadores microssatélites desenvolvidos na dissertação, apenas cinco foram considerados ideais para a continuidade das análises populacionais. Isso porque além de apresentarem alto grau de polimorfismo observou-se uma característica bastante comum, a presença de ampliações inespecíficas (bandas *stutter*) presentes em menor quantidade quando comparadas ao *locus* Sh07 (excluído das análises por apresentar excesso de *stutter*) (NAISH e SKIBINSK,

1998). O aparecimento de tais bandas ocorre, principalmente, em repetições de dinucleotídeos (CREGAN *et al.*, 1994). De acordo com Ashworth *et al.* (2004), *loci* que revelam muitas bandas residem em regiões duplicadas no genoma ou resultam de desenho inadequado dos *primers*. No caso do *primer* Sh07, possivelmente, a grande ocorrência de bandas *stutter* pode ter sido ocasionada por um dos dois fatores: um deles é o fato do par de *primers* ter sido confeccionado sem a sequência consenso das fitas direto e reverse. Embora estas tenham sido seqüenciadas, os *primers* acabaram sendo confeccionados somente por meio da sequência consenso das fitas de sentido direto. O outro fator se refere ao tamanho do motivo. De acordo com (EDWARD *et al.*, 1991), as bandas (*stutter*) tendem a diminuir com o aumento do tamanho do motivo, e no caso do *primer* Sh07 era o que apresentava motivo de menor tamanho (AC)<sub>13</sub>, em comparação com os outros *primers* confeccionados.

Como as condições para PCR precisavam ser otimizadas, haja vista, que alguns *locus* apresentaram problemas de amplificação, a estratégia utilizada para este propósito foi à chamada PCR *touchdown*. Segundo Senior *et al.* (1996), o uso dessa estratégia oferece bons resultados quando muitas reações precisam ser otimizadas. Excluindo o *primer* que não amplificou (Sh08) dois dos cinco *primers* utilizados para tabarana foram otimizados com esta metodologia.

## 5.4 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

A diversidade genética encontrada nas populações de *Salminus hilarii* analisadas no presente estudo foi elevada. Segundo Frankham *et al.* (2008), a diversidade genética pode ser descrita utilizando o número de alelos, a frequência de alelos e a heterozigosidade média.

A avaliação dos cinco *loci* microssatélites permitiu a identificação de 81 alelos diferentes, apresentando de 10 (Sh10) a 19 (Sh05) alelos por *locus*, sendo 13,7 a média do número de alelos encontrados em todas as populações. Esse valor encontra-se acima do observado para peixes de água doce (DEWOODY & AVISE, 2000). Valores superiores a média de alelos observados em peixes de água doce também foram encontrados por Benites (2008) e Pereira *et al.* (2008), respectivamente, 17 alelos e 15,3, ambos para *Pseudoplatystoma corruscans*.

Alelos únicos também foram encontrados neste estudo. Esses alelos reforçam a característica de dispersão restrita em espécies de água doce (SALGUEIRO *et al.*, 2003), entretanto, a ocorrência foram raras, sendo que, somente a amostragem do Rio Grande - Igarapava que apresentou alelos únicos, 2 alelos no total.

As heterozigosidades observadas variaram de 0,8 a 1, enquanto as esperadas variaram de 0,86 a 0,939, sendo que, somente para o Rio Paranapanema estes altos valores de  $H_e$  ocorreram para dois dos cinco *loci* analisados. Em geral, as heterozigosidades esperadas são empregadas para a obtenção da heterozigosidade média, pois são menos sensíveis ao tamanho amostral do que a heterozigosidade observada (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos relativos à variabilidade genética nas populações de *S. hilarii* corroboram com dados obtidos na literatura para outras espécies. Vrijenhoek (1996) analisando populações naturais de duas espécies de truta *Oncorhynchus clarki lewisi* e *Oncorhynchus mykiss*, encontrou  $H_o$  de 0,676 e  $H_e$  0,850. Barroso *et al.* (2005) estudaram a estrutura genética de *Brycon opalinus*, espécie endêmica da Bacia do Paraíba do Sul e encontraram a maior heterozigosidade esperada de 0,892. Ferreira & Casatti (2006) detectaram  $H_e$  e  $H_o$  de 0,952 e 1,0 para *loci* microsatélites em populações de curimatá coletadas nas escadas de transposição das usinas hidrelétricas de canoas I e II, situadas no rio Paranapanema.

Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados para a maioria das populações, com exceção do rio Paranapanema, que apresentou 3 *loci* em equilíbrio de EHW. Levando em consideração que esse local era o que possuía menor número de tabaranas amostradas, amostragens pequenas podem não mostrar toda a variabilidade alélica presente na população natural (BEAUMONT & HOARE, 1988; FERGUSON & DANZMANN, 1998; HILSDORF *et al.*, 2006) considerando que os microsatélites são uma classe de marcadores moleculares com alta taxa de mutação (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002) amostragens maiores possivelmente revelariam a variação de alelos que realmente correspondem àquela presente na população.

Entre as possíveis causas para os desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg geralmente estão o número inadequado de indivíduos analisados, a presença de alelos nulos e o excesso de heterozigotos (SELKOE & TOONEN, 2006).

A existência de alelos nulos parece ser um problema comum em *loci* microssatélites (CALLEN *et al.*, 1993; O'Connell & Wright, 1997). Benites (2008) encontrou desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg em todas as 11 populações de *Pseudoplatystoma corruscans* analisadas com marcadores microssatélites. O autor verificou a existência de alelos nulos para a maioria dos casos. Morelli (2008) verificou desvios em várias populações de *Prochilodus lineatus* em *loci* específicos relacionados aos déficits de heterozigotos, também ocasionados pela presença de alelos nulos, o que não foi o caso deste estudo, uma vez que, todos os desvios de Hardy-Weinberg observados foram relacionados ao excesso de heterozigotos, o que pode ser visualizado pelos valores do índice de fixação ( $F_{is}$ ) negativos. Excesso de heterozigotos também foram encontrados por Moreira *et al.* (2007) em plantéis de tilápia nilótica.

Segundo Murray (1996) um dos motivos principais pelos quais o excesso de heterozigotos ocorre é devido à predominância de cruzamentos exogâmicos.

Os dados encontrados sobre heterozigosidade são de extrema importância, pois, elevados níveis de variabilidade genética possibilitam a ocorrência de um grande número de novas combinações genotípicas, aumentando o potencial evolutivo das espécies, pela maior capacidade de adaptação às possíveis mudanças ambientais (SEBBENN *et al.*, 2000).

A presença do excesso de heterozigotos nos *loci* sugere uma possível redução populacional, principalmente na amostragem de Lavras, como mostra a figura 11 e as figuras de 12 a 16 (frequência alélica) que por meio delas, fica nítido que neste local, em comparação aos outros, as frequências alélicas foram menores. Assim, segundo Luikart *et al.* (1998), populações que passaram por um processo recente de gargalo genético apresentam um excesso temporário de heterozigosidade e baixa frequência alélica, isso porque a heterozigosidade pode não ser perdida tão rápida quanto a diversidade alélica (HARD & CLARK, 1997).

## 5.5 ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DAS POPULAÇÕES

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o parâmetro  $F_{ST}$  aponta que a maior parte da variabilidade genética encontra-se dentro das populações (98,08%) enquanto que apenas 1,92 % entre elas, sendo o valor de  $\Phi_{st} = 0,01921$ . A

mesma análise, utilizando o parâmetro  $R_{ST}$  também obteve que a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das populações, com uma porcentagem de 93,06%, enquanto que 6,94% ocorrem entre elas, porém com o valor de  $R_{ST}=0,06521$ . Resultado semelhante foi obtido por Lopes *et al.* (2007), que após analisarem *Salminus brasiliensis* capturados das escadas para transposição de peixes das usinas hidrelétricas de Canoas I e Canoas II no Rio Paranapanema, também encontraram maior variância molecular dentro de cada grupo (98,22%) do que entre os grupos (1,78%), e um  $\Phi_{ST} = 0,018$ .

De acordo com Wright (1978), valores de  $F_{ST}$  entre 0 e 0,05 configuram uma baixa estruturação genética, entre 0,05 a 0,15 estruturação moderada, entre 0,15 a 0,25 alta e acima de 0,25 indicam uma forte estruturação genética. Sendo assim, a análise  $\Phi_{st}$  sugere que as populações apresentam baixa estruturação genética. Já o valor de  $R_{ST}$  obtido, indica uma moderada estruturação genética. Essa diferença encontrada nos resultados dos índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  se ocorre devido aos diferentes modelos mutacionais pelo qual se baseiam esses índices. Enquanto o índice  $F_{ST}$  baseia-se no Modelo de Alelos Infinitos (IAM), o índice  $R_{ST}$  baseia-se no modelo passo a passo SMM (Stepwise Mutation Model). Dessa forma, espera-se que os valores de  $R_{ST}$  sob um estrito SMM, sejam maiores que os valores de  $F_{ST}$  (SLATIKIN, 1995).

Muitas pesquisas descrevem diferenciações genéticas significativas entre as populações de peixes, porém com baixos valores de  $F_{ST}$  (WIRTH & BERNATCHEZ, 2001; HATANAKA *et al.*, 2006), o que ocorreu neste estudo. Na análise par a par todos os valores de  $F_{ST}$  foram significativos, apresentando valores entre 0,00979 e 0,02605 todos indicando baixa estruturação. Já as análises de  $R_{ST}$  par a par obtiveram valores entre 0,00857 a 0,11584, entre eles valores não significativos indicando de baixa a moderada estruturação. Os dados obtidos nessas análises corroboram com o teste exato de Fisher, para diferenciação e o dendograma construído a partir das distâncias de Nei (1978).

O dendograma evidência a existência de grupos amostrais dentro dos quais as amostras são mais relacionadas geneticamente. Esse dado permite realizar a subdivisão em 3 grupos amostrais: Rio Grande (Igarapava e Lavras) constituindo uma única amostragem, Paranapanema mais uma e Tietê uma outra. As separações dos grupos concordam a distribuição geográfica dos rios na bacia do Alto Paraná,

embora os resultados obtidos para a análise bayesiana gerada pelo programa Structure 2.2 (PRITCHARD, 2000) demonstrem a existência de apenas um grupo populacional tanto para os valores de  $K$  como de  $\Delta K$ . Isso talvez possa ter ocorrido devido aos baixos valores de  $F_{ST}$ , que não foram suficientes para separar essas amostragens em mais de uma população. De acordo com Evanno *et al.*, (2005) e Yang *et al.*, (2005), as análises realizadas pelo programa Structure 2.2 podem ser imprecisas quando o número populacional e de *loci* analisados é pequeno, ou quando alelos nulos estão presentes (PRITCHARD *et al.*, 2005).

A estrutura populacional é grandemente influenciada pelo fluxo gênico, que determina até que ponto uma população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (SLATKIN, 1993). Espécies com altas taxas de dispersão ou que ocupam habitats livres de barreiras geográficas tendem a exibir baixos níveis de estruturação populacional, enquanto aquelas que possuem pequena capacidade de dispersão ou estão submetidas à separação imposta por barreiras físicas e comportamentais acentuadas apresentam um alto grau de divergência intrapopulacional (GRAVES, 1998). Entre os mecanismos que promovem o isolamento das populações o comportamento de homing (tendência de voltar ao local de nascimento para a reprodução). Godoy (1975) notou que a frequência de retorno de alguns peixes reofílicos aos sítios de reprodução obedece a um ritmo e que, alguns exemplares, passam anos seguidos pelo mesmo percurso. O fato da frequência de visitação aos locais de desova não ser aleatória, leva-nos à hipótese de que a dispersão, se ocorrer, não se faz tão facilmente em *Salminus hilarii*. Vari (1988) ressalta que a maioria de peixes neotropicais limita-se em transpor a maioria das barreiras e com isso, tendem a isolar as populações de peixes em suas drenagens de origem.

Embora seja uma espécie de piracema, as tabaranas utilizadas para este estudo foram amostradas em locais onde se encontram barreiras geográficas (reservatórios) e poluição, o que impedem o fluxo gênico desta espécie. Entretanto, os resultados aqui obtidos sugerem uma baixa estruturação genética. Um das possíveis causas para explicar essa baixa estruturação genética pode ser devido a distribuição da tabarana. Há tempos atrás, a tabarana era uma espécie que apresentava uma ampla distribuição ao longo dos rios que compõem a Bacia do Alto Paraná, como descrito na introdução, sendo assim, essa espécie compunha um

gradiente sazonal de distribuição onde populações subestruturadas realizavam fluxo gênico entre si. Com as ações antrópicas, como a poluição e as construções das barreiras (meados do século 70) as populações ficaram isoladas em pequenos trechos, como é o caso da população do Alto Tietê, e com isso o tempo de isolamento entre elas não foi suficiente para refletir maior estruturação genética. Em conclusão, pode-se dizer que as alterações ambientais provocadas pelas barragens localizadas ao longo dos rios amostrados no presente trabalho, embora impeçam o fluxo migratório, não geraram a curto prazo diferenças significativas entre as amostras estudadas, o que explica assim, os baixos valores gerados pelos índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ .

Paiva *et al.* (2007) relataram a ocorrência de peixes de piracema nos reservatórios do Rio Grande, apesar da impossibilidade de migrações a montante no curso principal do rio, devido à presença de barragens. No caso do local amostrado para este estudo, somente no Rio Grande, da região da região de Igarapava até Lavras são encontrados 3 reservatórios, o que dificultaria o fluxo entre eles as tabaranas desses dois locais. Levando em consideração o fato de a tabarana ser um peixe reofílico, acredita-se que esta não desova em ambientes de águas lânticas como, por exemplo, em águas de reservatórios. Neste caso, a tabarana poderia ser capaz de abandonar a represa poucas horas antes do ato reprodutivo, o que pode então representar que esta espécie necessita distância migratória relativamente pequena, quando comparada às informações disponíveis para os dourados e curimatás, para completar o seu processo de maturação gonadal (ANDRADE *et al.*, 2004). Sendo assim, uma das maiores preocupações é que, estas tabaranas permaneçam confinadas em seus locais atuais, o que poderia causar a longo prazo perdas na variabilidade genética.

De acordo com Artoni e Matiello (2003) a manutenção de uma grande variabilidade genética em espécies migradoras de peixes é atribuída a um suposto fluxo gênico intenso entre populações distintas. O valor que indica a existência de fluxo gênico, que é equivalente ao número de migrantes por geração, pode ser considerado alto ( $Nm = 3,775$ ). Segundo Strickberger (1985) valores de  $Nm$  acima de 1 indicam que o fluxo gênico é um fator atuante contra a diferenciação genética entre as populações. Valores de  $Nm$  superiores já foram encontrados para a Bacia do Alto Paraná. Povh *et al.* (2008) encontrou um alto número de migrantes por

geração (Nm de 5,33) entre pacus do estoque de reprodutores e do rio Paranapanema. Já Leuzzi *et al.* (2004) constataram um Nm alto (2,54) entre as populações de *Astyanax altiparanae* dos reservatórios de Capivara e Jurumirim, no Rio Paranapanema.

## 5.6 IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO E MANEJO

Na bacia do Rio Paraná os principais rios, como o Paranaíba, o Grande, Tietê, Paranapanema e Iguaçu tiveram seus cursos transformados em cascatas de reservatórios, reduzindo drasticamente os trechos lóticos (AGOSTINHO *et al.*, 2007). Um dos problemas que isso pode ocasionar em populações naturais de peixes, com falta de manejo sustentado, é a diminuição do tamanho populacional, que pode acarretar em um processo de deriva genética, consequente endogamia e perda de heterozigose (AVISE, 1994).

Apesar da tabarana não constar no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (MONTEIRO *et al.* 2008), a presente condição da espécie, isolada por barreiras físicas e químicas, pode acarretar em uma possível redução populacional e perdas significativas em sua diversidade genética.

Os resultados obtidos mostraram que, embora as populações de *Salminus hilarii* apresentem baixa estruturação, elas são geneticamente diferentes umas das outras. Para fins conservacionistas, a menor quantidade de variação genética intra e inter populacional deve ser levada em consideração, garantindo assim que as pequenas variações sejam mantidas, possibilitando assim a sobrevivência e aptidão da espécie em suportar as alterações ambientais.

Considerando a importância ecológica de *Salminus hilarii*, e a falta de estudos genéticos populacionais para esta espécie, os dados apresentados neste trabalho são particularmente importantes para serem levados em consideração na implantação de programas de gestão e conservação desta espécie.

O estabelecimento das chamadas MU (*management units*) proposta por Moritz (1994) nas quais populações que apresentem significativa diferenciação populacional devem ser manejadas a curto prazo como unidades demográficas independente. No caso da tabarana, a população presente nas cabeceiras da bacia

do Alto Tietê está hoje confinada em um trecho de aproximadamente 24 km entre a barragem de Ponte Nova e o trecho anterior a entrada do Tietê na cidade de Mogi das Cruzes que devido a sua poluição não suporta populações de tabarana. Assim, levando-se em consideração que esta população está isolada e apresentar de baixo a moderado nível de diferenciação genética, sua sustentabilidade depende de ações de preservação que incluem conservação do entorno do rio e de outras espécies (lambaris, por exemplo) que são a base alimentar da tabarana.

Esta situação pode ser extrapolada para outras populações de tabarana que também estejam isoladas em outras sub-bacias. O presente estudo é o primeiro a investigar a presente situação genética populacional da tabarana. Outros estudos devem ser conduzidos para se verificar os resultados achados aqui em outras populações de ocorrência em outras sub-bacias do Alto Paraná bem como das tabaranas da bacia do Alto São Francisco. Marcadores como DNA mitocondrial devem ser incorporados nestes estudos visto as características evolutivas deste marcador.

É importante salientar que os estudos de genética populacional são fundamentais para o manejo futuro de peixes neotropicais, pois permitirão avaliar e monitorar as futuras modificações genéticas que as espécies deste grupo apresentem.

## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

O estudo das amostragens naturais de *Salminus hilarii*, por meio de marcadores microssatélites, possibilitou chegar às seguintes conclusões:

- ❖ Os marcadores microssatélites mostraram-se ferramentas eficientes para as análises de diversidade genética em populações naturais de *Salminus hilarii*. Entretanto para melhor compreensão da estruturação populacional, é sugerido que seja realizado um estudo com marcadores mitocondriais.
- ❖ A amostragem do Rio Grande (Igarapava) possui maior variabilidade genética em comparação aos outros locais amostrados, e a única que apresentou alelos exclusivos.
- ❖ A grande maioria das amostragens não se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg, possivelmente, devido ao excesso de heterozigotos indicado pelo índice de fixação.
- ❖ A amostragem de Lavras indicou a ocorrência de uma redução populacional recente (efeito gargalo).
- ❖ Não foi encontrada uma relação direta entre distância genética e distância geográfica.
- ❖ Valores de  $R_{ST}$  e  $F_{ST}$  indicaram de baixa a moderada estruturação genética, sugerindo assim, que os mecanismos de isolamento ainda não refletiram de forma acentuada em uma maior diferenciação entre estas populações.
- ❖ Apesar da maior parte da variação genética estar contida dentro das amostragens, existe uma parcela de variação referente às diferenças entre amostragens de tabarana aqui estudadas, que devem ser levadas em consideração para fins conservacionistas.
- ❖ Embora os marcadores moleculares permitam a identificação de amostragens chaves para a conservação das espécies de peixes, a recuperação e a proteção do habitat são as formas mais efetivas da manutenção da variabilidade e dos processos evolutivos.

## REFERÊNCIAS

ABILA, R.; BARLUENGA, M.; ENGELKEN, J.; MEYER, A.; SALZBURGER, W. Population structure and genetic diversity in a haplochromine cichlid of a satellite lake of Lake Victoria. **Molecular Ecology**, v. 13, p. 2589- 2602, 2004.

ABILHOA, V.; L. F. DUBOC. Peixes, p, 581-677 In: MIKICH, S,B, & R,S, BÉRNILS (eds), **Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2007. 763 p.

ADAMS, W. T.; GRIFFIN, A. R.; MORAN, G. F. Using paternity analysis to measure effective pollen dispersal in plant populations. **American Natural**, v. 140, p. 762-780, 1992.

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

AGOSTINHO, A.A. Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. In: AGOSTINHO, A.A.; BENEDITO-CECÍLIO, E. (Eds.) **Situação Atual e Perspectivas da Ictiologia no Brasil**. (Documentos do IX Encontro Brasileiro de Ictiologia), 1992. 127p.

AGOSTINHO, A.A.; MIRANDA, L.E.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; THOMAZ, S.M.; SUZUKI, H.I. Patterns of colonization in neotropical reservoirs, and prognosis on aging. In: TUNDISI, J.G.; STRASKRABA, M. (eds.), **Theoretical Reservoir Ecology and its applications**. São Carlos, IIE., 1999. 227-265 p.

AGOSTINHO, A.A.; VAZZOLER & THOMAZ, S.M. The high river Paraná basin: limnological and ichthyological aspects, p. 61-103p. In: TUNDISI, J.G.; TUNDISI, T.M. **Limnology in Brazil**. Rio de Janeiro: ABC/SBL, 1995. 376 p.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil**. Maringá: UEM, 2007. 501 p.

**Agronomical & Environmental Genomes**. Disponível em: < <http://aeg.lbi.ic.unicamp.br> >. Acesso em 21 junho 2008.

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

AMARAL, J. S.; HONJI, R.M. & MOREIRA, R. G. Perfil dos esteróides gonadais durante o ciclo reprodutivo da tabarana (*Salminus hilarii*) no ambiente natural: correlação com as variáveis ambientais. **Relatório entregue ao Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC)**. Universidade de Mogi das Cruzes, 2005. 15 p.

ANDRADE, D. R.; GODINHO, A. L.; GODINHO H. P. Novos dados sobre o ciclo reprodutivo do dourado branco *Salminus hialrii*, Valenciennes, 1849, na represa de Três Marias, MG, *In: Encontro da Associação Mineira de Aquicultura (AMA) 1982-1987*. Brasília, Resumos, Brasília: CODEVASF, 1988. 75p.

ANDRADE, D. R.; GODINHO, A. L.; GODINHO, H. P. Biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* (Osteichthyes, Characidae) na represa de Três Marias. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 11, n. 3, p. 123-128, 2004.

APONE, F.; OLIVEIRA, A. K.; GARAVELLO, J. C. Ichthyofaunistic composition of the Quilombo river, tributary of the Mogi-Guaçu river, upper Paraná river basin, southeastern Brazil. **Biota Neotrop.**, vol. 8, n. 1, Jan./Mar. 2008.

ARTONI,R.F.; MARTIELLO,M.C.A. Genética de Peixes Neotropicais.I. Aspectos da Conservação Genética dos Peixes no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná,Brasil. **Publicário UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, Ponta Grossa, v.9, n.2, p.7-15, 2003.

ASHKENAZI, V.; CHANI, E.; LAVI, U.; LEVY, D.; HILLEL, J.; VEILLEUX, R. E. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analysis. **Genome**, v. 44 p. 50-62, 2001.

ASHWORTH, V. M.;KOBAYASHI, M. C.; DE LA CRUZ, M.; CLEGG, M. T. Microsatellite markers in avocado (*Persea americana* Mill.): development of dinucleotide and trinucleotide markers. **The American Society for Horticultural Science**, v. 101, p 255–267, 2004.

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

BALLOUX, F.; MOULIN, N. L. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v. 1, p. 155-165, 2002.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. A.; GUIMARÃES, S. E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus*. **Molecular Ecology**, n. 3, p. 297-298, 2003.

BARROSO, R.M.; HILSDORF, A.W.S.; MOREIRA, H.L.M.; MELLO, A.A.; GUIMARÃES, S.E.F.; CABELLO, P.H.; TRAUB-CSEKO, Y.M. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture**, v. 247, p. 51-65, 2005.

BEAUMONT, A. R.; HOARE, K. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture**, Oxford: Blackwell Science, 2003. 47-72 p.

BENITES, C. **Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae), da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microssatélite**. Tese de doutorado. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 74 p. 2008.

BILLOTTE, N.; LAGODA, P.J.R.; RISTERUCCI, A.M.; BAURENS, F.C. Microsatellite enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. **Fruits**, v. 54, p. 277-288, 1999.

BONETTO, A. A. The Paraná river system, In: DAVIES, B.R. e WALKER, K.F. (Ed.). **The Ecology of River Systems**, Dordrecht: The Netherlands/Dr. W. Junk Publishers, 1986. 541-555 p.

BONETTO, A.A.; CORDIVIOLA, E.A. Composicion y dinamica de las poblaciones de peces del Paraná médio. **Investigaciones Zoológicas Chilenas**, v.13, p. 101-108, 1968.

BUTCHER, P.A.; DECROOCQ, S.; GRAY, Y.; MORAN, G.F. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 101, p. 1282-1290, 2000.

CALCAGNOTTO, C. Taxas de evolução e o relógio molecular, In: **Biologia Molecular e Evolução** (Matioli, S. R. ed.), São Paulo, 2001. 51-63 p.

CALLEN, D.F.; THOMPSON, A.D.; SHEN, Y.; PHILLIPS, H.A.; RICHARDS, H.I.; MULLEY, J.C.; SUTHERLAND, G.R. Incidence and origin of “null alleles” in the “AC” microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, v. 52, p.922-927, 1993.

CAMARGO, C. Efeitos do **bloqueio da migração reprodutiva nas reservas metabólitas da tabarana *Salminus hilarii* (Characiformes: Characidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Mogi das Cruzes, Mogi das Cruzes, 56 p. 2007.

CAROLSFELD, J.; HARVEY B.; C. Ross & A. Baer (Eds.). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Canadá: World Fisheries Trust, 2003. 380 p.

CARVALHO, M. L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Nuclear DNA content of thirty species of Neotropical fishes. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.21, n.1, março 1998.

CASTELO, A.T.; MARTINS, W.; GAO, G.R. TROLL–tandem repeat occurrence locator. **Bioinformatics**, v. 18, p. 634-636, 2002.

CASTRO, R.M.C; MENEZES, N.A. Estudo diagnóstico da diversidade de peixes do Estado de São Paulo. *In*: JOLY, C.A.; BICUDO, C.E.M. **Biodiversidade do Estado de São Paulo, Brasil: Síntese do conhecimento ao final do século XX-6: vertebrados**. São Paulo: WinnerGraph, 1998. 1-13p.

CENIS, J. L. Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas. **Revista Terralia**, v. 12, p. 40 - 43, 2000.

CETRA, M. **Caracterização da assembléia de peixes da Bacia do rio Corumbataí (SP)**. Dissertação de Doutorado, USP, São Carlos, SP, 90 p., 2003.

CETRA, M.; PETRERE Jr., M. Fish assemblage structure of the Corumbataí River Basin, São Paulo State, Brazil: characterization and anthropogenic disturbances. **Braz. J. Biol.** V. 66, n.2, p. 431-439, 2006.

CHIARI, L.; SODRÉ, L. M. K. Genetic variability in five species of Anostomidae (Ostariophysi – Characiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 22, p.517-523, 1999.

COCHERHAM, C. C.; WEIR, B. S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, n. 47, p. 855-863, 1993.

CORNUET, J.M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, n. 4, p. 2001-2014, 1996.

CREGAN, P. B.; BHAGWAT, A. A.; AKKAYA, M. S.; RONGWEN, J. Microsatellite fingerprinting and mapping of soybean. **Methods in Molecular and Cellular Biology**, v. 5, p. 49-61, 1994.

DERGAM, J. A.; HARUM I, I. S.; SHIBATTA, O. A.; DUBOC, L.F.; JÚLIO JR.;H. F.; GIULIANOCAETANO, L.; BLACK IV, W. C. Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae – Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná Rivers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 21, p. 493-496, 1998.

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

EDWARD, A.; CIVITELLO, A.; HAMMOND, H.A., CASKEY, C.T. DNA typing genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Genetics**, v.49, p.746-756, 1991.

EDWARDS, A.; HAMMOND, H. A.; JIN. L.; CASKEY, C. T.; CHAKRABORTY, R.Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. **Genomics**, v.12, p. 241-253, 1992.

EISEN, J. A. Mechanistic basis for microsatellite instability, In: GOLDSTEIN, D. B. et al, (Ed,) **Microsatellites - evolution and applications**, Oxford: Oxford University Press, 1999. 34-48p.

EIZIRIK, E.; KIM, J. H.; MENOTTI-RAYMOND, M.; CRAWSHAW, P. G.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W.E. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology**, v.10, p. 65-79, 2001.

ELLEGREN, H. Microsatellites: simple sequences with complex evolution. **Nature Genetics**, v. 5, p. 435-445, 2004.

ESTEVEES, K. E.; PINTO LÔBO, A. V. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (PISCES, CHARACIDAE) at Cachoeira das Emas, Mogi-Guaçu river (São Paulo state, southeast Brazil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, n. 2, p. 267-276, 2001.

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

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN version 3.01. **An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis**. 2006.

FARIA, P. J., MIYAKI, C. Y. Molecular markers for population genetic analyses in the family Psittacidae. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 231-240, 2006.

FERGUSON, M.M.; DANZMANN, R.G. Role of genetics markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?. **Can. J. Fish Aquat. Sci**, v.55, 1998.

FERREIRA, C. P.; CASATTI, L. Integridade biótica de um córrego na bacia do Alto Rio Paraná avaliada por meio da comunidade de peixes. **Biota Neotropica**, v.6, n. 3, setembro 2006.

FITZSIMMONS, N.N.; MORITZ, C.; MOORE, S.S. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 12, p. 432-440, 1995.

FROESE; R.; PAULY, D. FishBase. **List of Common Names with tabarana**. Disponível em: <<http://www.fishbase.org/>>. Acesso em 18 junho de 2009.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D. & BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética de Conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 262p.

GÉRY, J.; LAUZANNE, L. Les types des espèces du genre *Salminus* Agassiz 1829 (Ostariophysi, Characidae) du Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris. **Cybium**, v.12, n.2, p.113-124, 1990.

GODOY, M. P. Peixes do Brasil: Subordem Characoidei: Bacia do Mogi Guassu. **Franciscana**, Piracicaba, v. 2, p.398, 1975.

GOFF, D. J.; FALVIN, K.; KATZ, H.; WESTERFIELD, M.; LANDER, E. S.; TABIN, C. J. Identification of polymorphic simple sequence repeats in the genome of the zebrafish. **Genomics**, v. 14, p. 200-202, 1992.

GOUDET, J. **FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2)**. Lausanne: University of Lausanne, Department of Ecology & Evolution, 2002.

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

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HAMADA, H.; PETRINO, M.G.; KAKUNAGA, T. A novel repeated element with Z-DNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v. 79, p.6465-6469, 1982.

HANAHAN, D.; JESSEE, J.; BLOOM, F.R. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 63-113, 1991.

HARD, D.L.; CLARK, A.G. **Principles of Population Genetics**. Sunderland : Sinauer Associates, 1997.

HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALLETI-JR, P.M. A polymorphic, telomeric-like sequence microsatellite in the Neotropical fish *Prochilodus*. **Cytogenetics and Genome Research**, v. 98, p. 308-310, 2002.

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

HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A.M.L.; KRIEGER, M.H.; KRIEGER, J. E. Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus*

(Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. **Aquaculture**, v. 214, p.81-91, 2002.

HILSDORF, A.W.S.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas**. Corumbá: EMBRAPA, 2006.

HONJI, R. M.; FRANCISCHETI, M A.; MOREIRA, R. G.; ROMAGOSA, E. Aspectos preliminares da biologia reprodutiva da tabarana *Salminus hilarii* Valenciennes 1850 da bacia do alto Tietê, São Paulo, SP. In: **Encontro de Biólogo do CRBIO-1**, 17, 2006, Santos. Resumos. Santos: Conselho Regional de Biologia – 1º região, 2006, p. 122.

HOSHINO, A.A.; PALMIERI, D.A.; BRAVO, J.P.; PEREIRA, T.E.B.; LOPES, C.R.; GIMENES, M.A. Marcador Microsatélite na Conservação de Germoplasma Vegetal. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p.146-150, 2002.

IHERING, V.R. **Da vida dos peixes**. Ensaios e scenas de pescarias. São Paulo: Companhia Melhoramentos, 1929, 150 p.

JOHNSON, T.C.; BARRY, S.L.; CHAN, Y.; WILKINSON, P. Decadal record of climate variability spanning the past 700 years in the Southern Tropics of East Africa. **Geology**, n. 29, p. 83-86, 2001.

KALINOWSKI, S.T.; TAPER, M.L. Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. **Conservation Biology**, v. 7, p. 991-995, 2006.

LANGEANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI, C.S & CASATTI, L. Diversidade da ictiofauna do alto rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. **Biota Neotropica**, Maringá, v.7, n.3, 2007.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.L.; COX, M.M. **Principles of biochemistry**. 4 ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2005, 1.100 p.

LEITE, S. B. Paulino; GALETTI JR., P. M. Variação genética na tabarana (*Salminus hilarii*, Characiformes) da região de influência da transposição do rio Piumhi (MG). In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2008, São Carlos. **Anais de Eventos da UFScar**, v.4, 2008.p.90.

LEUZZI, M.S.P.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; SODRÉ, M.L.K. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs of

the River Paranapanema. **Genetics and Molecular Biology**, v. 27, p. 355-362, 2004.

LEVEQUE, C.; OBERDORFF, T.; PAUGY, D.; STIASSNY, M.L.J. & TEDESCO, P.A. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p.545-567, 2008.

LIMA, F. C. T. **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003.

LIMA, F. C. T. **Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes: Characidae)**. Tese de Doutorado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 253p. 2006.

LIMA-JUNIOR, S. E. **A Ictiofauna e a qualidade da água em trechos do rio Corumbataí - SP**. Dissertação de Doutorado, UNESP, Rio Claro, SP, 235 p., 2003.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic**, v. 44, p. 398-401, 1989.

LOPES, C.M.; ALMEIDA, F.S.; ORSI, M.L.; BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; SODRÉ, L.M.K. Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). **Neotropical Ichthyology**, v.5, p.131-138, 2007.

LÓPEZ, L. Genetic variability and population structure of dorada (*Brycon moorei sinuensis* Dahl) in the Sinú River, Córdoba, Colombia. **Lakes & Reservoirs: Research and Management**, v. 11, p. 1-7, 2006.

LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: Edusp, 1999. 535 p.

LUIKART, G.; ALLENDORF, F.W.; CORNUET, J.M.; SHERWIN, W.B. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. **Journal of Heredity**, v. 89, p. 238-247, 1998.

MAGALHÃES, A.C. **Monographia brasileira de peixes fluviaes**. São Paulo: Graphicars, 1931. 260 p.

MARCO, D. A. **Estudos cromossômicos em peixes da subfamília Salmininae (Pisces Characidae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 100 p., 1986.

MARENGONI, N. G.; MACHADO, M. R. F.; GASPARINO, E. Extração de DNA genômico em tecidos sólidos de peixes teleósteos. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 27, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2006.

MARGARIDO, V. P.; GALETTI-JUNIOR, P. M. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera Brycon and Salminus (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.22, n. 3, p. 357-361, 1999.

MARQUES, D.K.S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: EMBRAPA – Pantanal, 2002. 22 p.

MATIOLI, S. R.; PASSOS-BUENO, M. R. S. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucleicos. In: **Matioli, Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001.

MICHALAKIS, Y.; EXCOFFIER, L. A generic estimation of population subdivision using distances between alleles with special reference for microsatellite *loci*. **Genetics**, v. 142, p. 1061-1064, 1996.

MOORE, S. S.; SARGEANT, L. L.; KING, T. J.; MATICK, J. S.; GEORGES, M.; HETZEL, D. J. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genome**, v. 10, p. 654-660, 1991.

MORAES-FILHO, M. B.; SCHUBART, O. **Contribuição ao estudo do Dourado (*Salminus maxillosus*) do Rio Mogi Guassu (Pisces, Characidae)**, Ministério da Agricultura – Divisão de Caça e pesca: São Paulo, 1995. 131 p.

MOREIRA, A. A.; HILSDORF, A. W. S.; SILVA, J. V.; Souza, V. R. Variabilidade genética de duas variedades de tilápia nilótica por meio de marcadores microsatélites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, p. 521-526, 2007.

MORELLI, K.A.; OLIVEIRA, F.; PORTO-FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. Population structure of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu river identified by molecular analysis. In: Pompeu PSH, Santos HA, Alves CBM (eds) **Proceedings of the international symposium on fish passages in south America**. Lavras: UFLA, 2007. 7–10 p.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal*, v.3, n.1, p.175-182, 1993.

MOYSÉS, C. B.; L. F. ALMEIDA-TOLEDO. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax* (Pisces, Characidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 25, n.4, p. 401-407, 2002.

MOYSÉS, C.B. Diversidade genética, estrutura populacional e análise filogenética no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo. **Tese (Doutorado)**. Universidade de São Paulo, 2005.

MURRAY, B. W. **The Estimation of Genetic Distance and population substructure from Microsatellite Allele Frequency Data**. 1996. Disponível em: <<http://helix.biology.mcmaster.ca/brent/node1.html>> Acesso em 22 de março de 2009.

NAISH, K. A.; SKIBINSKI, D. O. F. Tetranucleotide microsatellite *loci* for Indian major carp. **Journal of Fish Biology**, v.53, p.886-889, 1998.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A. A.; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P. V. **Os e larvas de peixes de água doce: desenvolvimento e manual de identificação**. Maringá: EDUEM, 2001. 378 p.

NEI, M. DNA polymorphism within and between populations. *In*: Molecular Evolutionary Genetics, Columbia University Press, 254-286p, 1987. NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 4<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons Inc, 600p, 2006.

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

OLIVEIRA, A. F.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOVSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294 - 307, 2006.

OLIVEIRA, A. K. de; GARAVELLO, J. C. Fish assemblage composition in a tributary of the Mogi Guaçu river basin, southeastern Brazil. **Iheringia, Série Zoologia**, Porto Alegre, v. 93, n. 2, p. 127-138, 2003.

OLIVEIRA, C.; FORESTI, F.; HILSDORF, A.W.S. Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. **Fish Physiol Biochem**, v.35, n.81, p.100, 2009.

ORTÍ, G.; MEYER, A. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences, *Systematic Biology*, v. 46, n. 1, p. 75-100, 1997. In: Padrões reprodutivos de peixes da bacia do São Francisco, In: GODINHO, H. P. & GODINHO, A. L. **Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais**. Belo Horizonte: PUCMinas, 458 p, 2003.

PAIVA, M. P. **Peixes e pescas de águas interiores do Brasil**. Brasília: Editerra, 1985. 158p.

PAIVA, M.P.; ANDRADE-TUBINO, M.F.; GODOY, M.P. **As represas e os peixes nativos do Rio Grande – Bacia do Paraná**. Brasil, 2002. 56-57 p.

PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, Journal compilation, p.1-11, 2008.

PERES, M. D.; RENESTO, E.; LAPENTA, A. S.; ZAWADZKI, C. H. Genetic variability in *Hoplias malabaricus* (Osteichthyes: Erythrinidae) in fluvial and lacustrine environments in the Upper Paraná river floodplain (Paraná State, Brazil). **Biochemical Genetics**, v.40, p.209-223, 2002.

PEREZ Jr, O. ; GARAVELLO, J. C. Estudo da Ictiofauna do Ribeirão do Pântano. **Iheringia, Sér. Zool**, Porto Alegre, v.97, n.3, p.328-335, 30 de setembro de 2007.

POVH, J. A.; LOPERA BARRERO, N. M.; RIBEIRO, R. P.; LUPCHINSKI JR, E.; GOMES, P. C.; LOPES, T. S. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciência e Investigación Agrária**, Santiago, v. 35, n. 1, p. 25-35, 2008.

POWELL, W.; MACHRAY, G.; PROVAN, J. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. **Trends Plant Sci.**, v. 1, p. 215-222, 1996.

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

QUELLER DC, S. J.; SOLÍS, C.R.; HUGHES, C.R.; DELOACH, D.M. A selfish strategy of social insect workers that promotes social cohesion. **Nature**, v. 365, p.639–641, 1993.

RAFALSKI, D. J. A.; VOGEL, J. M.; MORGANTE, M.; POWELL, W.; ANDRE, C.; TINGEY, S. V. Generating and using DNA markers in plants. In: BIRREN, B.; LAI, E. **Nonmammalian genomic analysis: a practical guide**. New York: Elsevier, 1996. p. 75-134.

RALLO, DOURADO e MARTÍN, A. Development of simple sequence repeats (SSRs) in olive tree (*Olea europaea* L.). **Theoretical and Applied Genetics**, v.101, p.984-989, 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. Genepop (Version 12): Population genetics software for exact tests and ecumenism. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 2003. 729 p.

RENESTO, E.; ZAWADZKI, C. H.; REVALDAVES, E. Genetic evidence for two species of the genus *Pimelodus* Lacépède, 1803 (Siluriformes: Pimelodidae) in the iguaçu River (Brazil). **Genetics and Molecular Biology**, v. 23, n. 4, p. 809-813, 2000.

REVALDAVES, E. **Variabilidade genética de *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae) em um trecho da bacia do alto da bacia do alto rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 38 p.

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

ROBINSON, L. P. Aloenzimas na genética de populações de plantas. In: ALFENAS, A. C. **Eletroforese de isoenzimas e proteínas em plantas e microorganismos**. Viçosa: UFV, 1998. 329-380 p.

RODRIGUES, P. G. C.; CAMARGO, C.; MOREIRA, R.G. Protein and lipids storage strategy of *Salminus hilarii* in the different sites of the upper Tiête River. In: 41<sup>ST</sup>

**Congress of the Brazilian Physiological Society.** Ribeirão Preto-SP, Brasil. p.206, 2006.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. 1ed. *In*: MACHADO, A. B.M., DRUMMOND, A. M., PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas, 2008. 1420 p.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 238, p. 487-491, 1988.

SAITOH, K. 1998. Genetic variation and local differentiation in the Pacific cod *Gadus macrocephalus* around Japan revealed by mtDNA and RAPD markers. **Fish Sci**, v. 64, p.673-679.

SALE, M.J. Aquatic ecosystem response to flow modification: an overview of the issues. **Proceedings of the Symposium on small hydropower and fisheries.** Bethesda: American Fisheries Society, 1985. 497 p.

SALGUEIRO, P.; CARVALHO, G.; PEREIRA, M.J.C.; COELHO, M.M. Microsatellite analysis of population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal: implications for conservation Biological Conservation. **Biological Conservation**, v.109, p. 47-56, 2003.

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

SANTOS, E. **Peixes da Água doce.** Belo Horizonte: Itatiaia, 1987. 263 p.

SANTOS, G.M., JÉGU, M.; MERONA, B. **Catálogo de peixes comerciais do baixo rio Tocantins.** Manaus: Eletronorte,CNPq,INPA, 1984. 84 p.

SANTOS, G.M.; FERREIRA, E.J.G. Peixes da bacia Amazônica, p.345-373. *In*: LOWE-MCCONNELL, R.H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais,** Edusp: São Paulo, 1999. 584p.

SATO, Y. **Reprodução de peixes da Bacia do Rio São Francisco: indução e caracterização de padrões.** Dissertação de Doutorado (UFSCAR), São Carlos, SP, 179 p., 1999.

SATO, Y.; GODINHO, H. Migratory fishes of the São Francisco River. *In*: CAROSFELD J., HARVEY, B., ROSS, C.; BAER, A. (eds.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. Canadá: World Fisheries Trust, 2003. 380p.

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

SEBBENN, A.M.; KAGEYAMA, P.Y.; SIQUEIRA, A.C.M.F.; ZANATTO, C.E. Taxa de cruzamento em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze.: implicações para a conservação e o melhoramento genético. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v.58, p.25-40, 2000.

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

SENIOR, M.L.; CHIN, E.C.L.; LEE, M.; SMITH, J.S.C.; STUBER, C.W. Simple sequence repeat markers developed from maize sequences found in the GenBank database: map construction. **Crop Science**, v.36, p.1676-1683, 1996.

SHIBATTA, O. A.; GEALH, A. M.; BENNEMANN, S. T. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi. **Biota Neotrop.**,Paraná, vol.7, n.2, 2007.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, p. 457-462, 1995.

SMITH, W. S. **A estrutura da comunidade de peixes da bacia do rio Sorocaba em diferentes situações ambientais**. Dissertação Mestrado. Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 1999.

SMITH, W. S; PETRERE, M.; BARRELA, W. The fish fauna in tropical rivers: The case of the Sorocaba river basin, SP, Brasil. **Revista de Biologia Tropical**, v. 5, n. 13, p. 769-782, 2003.

SOUZA, I.L.; SILVA, L.K.S.; VENERE, P.C.; FILHO, O.M. Molecular cytogenetics of Salminus fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. **Micron**, v.1, p. 1036–1041, 25 março 2007.

STEWART, D.; BARRIGA, R.; IBARRA, M. Ictiofauna de la cuenca del Rio Napo, Ecuador Oriental: lista anotada de especies. Politécnica, **Biologia**, v.12, n.4, p. 9-63, 1987.

STRICKBERGER, M. W. **Genetics**. New York: Macmillan, 1985. 842 p.

SÚAREZ, Y.R.; LIMA-JÚNIOR, S.E. Spatial and temporal variation in stream fish assemblages of Guiraí River Basin, Upper Paraná Basin. **Biota Neotrop.**, v.9, n.1, 2009.

TAGGART, J. B.; HYNES, R. A.; PRODOHL, P. A. & FERGUSON, A. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. **Journal of Fish Biology**, n. 40, p. 963-965, 1992.

TAKAHASHI, E. L. H. **Ciclo Reprodutivo da Tabarana, Salminus hilarii (Valenciennes, 1849)(Characidae, Salmininae) na região do baixo Sorocaba**. Dissertação de Mestrado (UNESP), Jaboticabal, SP, 58p., 2006.

TAUTZ, D.; RENZ, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 12, p. 4127-4138, 1984.

TAUTZ, D.; SCHLOTTERER, C. Simple sequences. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 4, p. 832 - 837, 1994.

VARELLA, H.R.; CESÁRIO, V.V.; OLIVEIRA, A.K.; F. APONE; X.M.; LOPES; A.F.; SABBAG, J.C. Composição da ictiofauna do médio rio Paranapanema no trecho entre reservatórios de Salto Grande e Jurumirim. *In*: **Congresso de Ecologia do Brasil. Caxambu**. Anais do VIII, 23 a 28 de Setembro de 2007.

VARI, R.P.; MALABARBA, L.R. Neotropical ichthyology: an overview. *In*: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.C.; LUCENA, A.S. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. EDIPUCRS: Porto Alegre, 1998. 1-11 p.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinhã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p. 48-52, 2004.

WASKO, A. P.; MARTINS, C.; OLIVEIRA, C.; SENHORINI, J. A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinchã (*Brycon cephalus*) using RAPD markers: insights into supportive breeding and conservation programmes. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 20, p. 48-52, 2004.

WEBER, J. L. Informativeness of human (dC-dA)<sub>n</sub> (dG-dT) in polymorphisms. **Genomics**, v.7, p.524-530, 1990.

WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. DNA Polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucl. Acids Res.**, vol. 18, n. 22, p. 6531-6535,1990.

WIRTH, T.; BERNATCHEZ, L. Genetic evidence against panmixia in the European eel. **Nature**, n. 409, p. 1037-1040, 2001.

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

YANG, B.Z.; ZHAO, H.; KRANZLER, H.; GELERNTER, J. Practical population group assignment with selected informative markers: characteristics and properties of Bayesian clustering via STRUCTURE. **Genetic Epidemiology**, n. 28, p. 302-312, 2005.

ZANATA, A. M. **Estudo das relações filogenéticas do gênero *Brycon* Müller & Troschel, 1844 (Characidae; Characiformes)**. Tese de Doutorado, (USP), São Paulo, 358 p, 2000.

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

**Apêndice A** - Tabela com as características dos cinco *loci* microssatélites isolados para *Salminus hilarii*, em que,  $n$ = número de amostras;  $T_a$ = temperatura de anelamento para cada *locus*;  $H_o$ = heterozigosidade observada;  $H_e$ = heterozigosidade esperada;

<i>Loci</i>	Motivo	Seqüência dos <i>Primers</i>	Tipo	<i>n</i>	Tamanho total (pb)	T <sub>a</sub> (°C)	Nº de alelos	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>
Sh01	(GT) <sub>26</sub>	F - 5' TGG TTC TAA GTC TGG ATA AAG G- 3' R - 5' ACA CAC ACA CAA ACT CAC AAA G- 3'	Perfeito	145	191	58	16	0,932	0,910
Sh05	(TG) <sub>15</sub>	F- 5' CTA TCT GAT ACG CCC CGG TC- 3' R - 5' CTC GTC CAG GGT CAT CTC CTT A- 3'	Perfeito	135	182	51	20	0,983	0,911
Sh10	(GT) <sub>24</sub>	F - 5' CGG CTC CAT GCC TTA GAA TG- 3' R - 5' GGG GTG TGT TTC CAG AAC AA- 3'	Perfeito	142	132	55	12	0,984	0,875
Sh12	(CA) <sub>13</sub>	F- 5' GTT ATA CTG TGG GGT TAA CAT G - 3' R- 5' GAT GCT ACC AAG GGT TCT CAG T- 3'	Perfeito	145	235	54	18	0,922	0,917
Sh16	(TG) <sub>10</sub>	F - 5' CCT CAG ACG TGA TCT GAT AAG G 3' R - 5' GCG TCG GAG CAG TAG TTA TA 3'	Perfeito	151	200	58	15	0,900	0.891

**APÊNDICE B** - Genótipos de todos os indivíduos analisados das populações, sendo A: Igarapava; B: Tietê; C: Lavras; D: Paranapanema.

	Sh01		Sh05		Sh10		Sh12		Sh16	
População										
A	183	187	178	182	126	132	225	237	204	212
A	177	183	196	204	134	138	239	239	206	214
A	177	183	192	198	136	142	239	239	208	216
A	177	183	168	174	136	142	000	000	188	192
A	179	185	000	000	000	000	221	233	196	204
A	173	179	192	200	130	136	221	233	196	204
A	177	183	198	206	126	132	241	249	208	214
A	177	183	000	000	124	130	000	000	188	192
A	177	183	168	176	132	136	243	249	206	214
A	177	183	190	198	122	128	243	249	200	204
A	181	189	186	196	122	128	000	000	206	212
A	181	189	186	194	130	136	225	237	202	214
A	187	197	174	184	142	148	225	239	196	204
A	193	199	194	204	140	148	235	245	196	204
A	185	191	184	190	134	140	239	249	204	210
A	183	183	186	194	142	148	225	225	196	204
A	189	197	192	202	134	140	221	233	200	200
A	181	189	172	180	136	140	233	243	196	204
A	177	183	192	200	128	134	233	243	196	204
A	199	205	188	194	130	138	229	239	200	212
A	197	203	184	190	122	128	241	249	196	204
A	197	193	186	192	132	138	233	243	204	210
A	000	000	180	186	130	138	237	245	202	214
A	191	199	186	192	132	138	225	225	202	214
A	185	191	180	186	122	128	231	231	204	212
A	189	197	180	188	122	128	237	247	202	212
A	177	183	200	206	122	128	243	253	202	212

---

A	193	201	190	196	122	128	241	251	204	212
A	177	183	180	184	122	128	241	251	204	212
A	177	183	194	200	122	128	225	225	202	212
A	179	187	180	180	124	130	231	231	204	212
A	181	181	180	186	122	128	241	253	204	214
A	193	201	176	184	132	138	233	245	204	214
A	177	183	186	194	122	128	243	253	206	214
A	191	199	000	000	122	128	243	253	196	196
A	000	000	192	200	122	128	243	253	198	198
A	189	201	172	180	122	128	243	253	196	204
A	000	000	194	200	122	128	241	251	198	210
A	000	000	186	194	000	000	000	000	196	204
B	000	000	000	000	000	000	225	233	208	216
B	000	000	184	190	128	136	225	233	202	208
B	177	183	000	000	126	134	225	233	204	212
B	179	187	000	000	128	134	225	233	200	206
B	185	199	198	204	000	000	225	233	204	214
B	177	183	180	18	124	134	223	231	208	216
B	185	185	178	186	124	132	223	231	202	206
B	195	203	180	188	132	140	000	000	204	212
B	177	183	198	206	132	136	223	231	204	204
B	197	203	180	188	122	128	223	231	210	218
B	195	203	180	184	122	128	225	233	196	204
B	205	205	168	174	122	130	225	233	204	212
B	195	203	000	000	124	128	233	243	210	218
B	191	199	184	192	122	128	231	241	210	218
B	191	199	190	196	134	140	249	24	202	210
B	191	201	186	194	122	128	229	239	204	204
B	185	191	180	184	124	130	229	239	202	202

---

---

B	179	187	186	194	134	138	227	239	200	212
B	201	201	186	194	134	140	227	239	202	210
B	185	191	176	184	134	140	231	243	204	210
B	179	185	180	186	134	138	233	245	202	210
B	179	185	180	190	134	140	231	243	202	214
B	179	185	180	190	134	138	231	243	194	202
B	183	189	168	168	128	134	231	241	194	202
B	189	197	184	190	134	140	231	243	202	212
B	187	193	180	190	130	136	000	000	202	208
B	181	187	184	190	136	140	231	241	202	208
B	183	189	180	188	136	140	231	241	202	208
B	185	193	170	176	134	138	231	241	204	212
B	189	195	180	180	136	140	231	239	202	208
B	195	187	184	192	122	128	231	239	202	208
B	181	189	180	188	128	136	229	239	204	212
B	187	193	180	186	000	000	227	239	202	214
B	183	189	172	180	128	136	227	239	204	214
B	183	189	184	194	124	130	229	239	204	214
B	183	189	196	202	122	128	229	239	202	208
B	183	189	182	192	122	128	229	239	202	208
B	181	187	176	184	134	140	227	239	204	216
B	177	183	184	192	122	128	233	245	204	216
B	177	183	000	000	122	128	231	245	204	216
B	179	187	178	186	130	138	231	245	204	214
B	181	187	000	000	122	128	231	245	206	214
B	179	181	186	194	122	128	233	245	204	214
B	181	187	182	188	128	136	231	231	204	204
B	181	187	000	000	122	130	233	247	202	208
B	181	187	182	190	122	130	233	247	200	206

---

---

B	185	191	182	190	122	130	233	247	200	206
B	177	183	180	186	122	130	233	245	200	206
B	185	191	178	184	122	130	233	245	204	204
B	181	187	170	176	122	130	233	245	202	202
B	181	187	182	190	128	136	231	245	200	206
B	179	185	182	190	126	132	231	245	202	212
B	181	187	182	190	126	134	231	231	200	212
B	177	183	182	190	122	130	229	239	202	212
B	181	187	182	192	134	138	231	231	198	204
B	179	183	182	190	126	134	239	249	198	204
C	173	173	186	194	122	130	000	000	198	204
C	173	173	190	198	122	130	225	237	200	206
C	181	187	000	000	134	138	229	239	196	204
C	181	187	176	182	122	130	231	241	210	218
C	195	203	190	198	136	142	231	241	206	214
C	197	203	000	000	128	134	235	243	196	204
C	183	189	182	190	132	138	227	239	200	210
C	199	203	192	200	122	130	237	247	206	214
C	203	211	184	192	136	142	233	241	200	210
C	195	203	198	206	122	130	241	253	212	204
C	179	187	184	192	124	130	235	245	208	208
C	183	191	198	206	126	132	241	253	202	210
C	187	195	196	202	130	136	239	253	202	210
C	177	183	184	192	136	142	245	257	198	198
C	177	183	186	194	122	130	229	241	200	200
C	177	183	186	194	136	142	221	233	202	210
C	179	187	186	196	000	000	225	237	196	196
C	181	187	190	196	122	128	237	249	198	198
C	179	187	184	192	122	128	241	253	192	198

---

---

C	173	179	184	188	122	128	241	253	192	200
C	173	179	000	000	130	136	229	239	196	204
C	177	183	184	192	122	128	225	235	192	200
C	173	179	186	194	134	128	241	253	194	200
C	173	179	184	194	132	136	241	253	196	204
C	179	185	188	196	122	128	245	257	196	204
C	177	183	184	190	124	130	245	253	204	210
C	183	189	188	196	126	132	229	243	196	204
C	173	179	196	202	124	130	227	239	206	214
C	181	181	182	192	122	128	229	239	200	210
C	177	177	184	194	124	130	227	239	200	210
C	177	183	188	198	122	128	245	249	200	208
C	179	185	182	190	122	128	235	243	202	210
C	177	183	182	190	130	138	245	245	208	218
C	181	189	186	194	126	132	245	245	206	214
C	177	183	182	188	122	128	247	257	208	208
C	179	187	182	190	122	128	233	243	206	214
C	179	187	182	190	122	128	233	243	208	218
D	187	193	170	176	134	140	247	257	204	214
D	195	203	000	000	130	136	223	233	198	210
D	203	211	182	190	128	134	233	247	198	210
D	177	183	18	196	000	000	237	249	198	210
D	177	183	168	196	134	140	243	253	200	204
D	203	211	184	190	000	000	241	253	200	206
D	199	203	182	190	000	000	247	257	206	214
D	185	193	182	190	124	130	237	249	208	208
D	177	177	182	190	138	142	237	249	204	216
D	181	189	182	190	136	140	229	241	204	208
D	203	211	000	000	126	132	231	243	210	218

---

---

D	201	211	186	194	136	140	231	243	198	206
D	173	179	182	190	134	140	221	233	198	206
D	183	191	000	000	130	138	223	233	202	208
D	189	197	168	174	124	130	235	243	196	204
D	177	183	168	174	130	140	245	249	202	208
D	197	205	178	184	128	134	223	233	204	208
D	185	193	182	190	134	142	239	251	202	210
D	185	193	194	202	134	134	223	233	200	208

---

**APÊNDICE C** - Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh01 para todas as populações.

Alelo	Amostragem			
	RG Igarapava	Tietê	RG Lavras	Paranapanema
01 (GT) <sub>17</sub>	0,014	0,000	0,122	0,026
02 (GT) <sub>19</sub>	0,171	0,065	0,135	0,132
03 (GT) <sub>20</sub>	0,043	0,083	0,162	0,026
04 (GT) <sub>21</sub>	0,071	0,111	0,081	0,026
05 (GT) <sub>22</sub>	0,214	0,130	0,149	0,105
06 (GT) <sub>23</sub>	0,043	0,111	0,027	0,079
07 (GT) <sub>24</sub>	0,043	0,148	0,122	0,026
08 (GT) <sub>25</sub>	0,086	0,083	0,041	0,053
09 (GT) <sub>26</sub>	0,114	0,093	0,014	0,132
10 (GT) <sub>28</sub>	0,000	0,046	0,041	0,026
11 (GT) <sub>29</sub>	0,071	0,019	0,014	0,053
12 (GT) <sub>30</sub>	0,057	0,028	0,014	0,026
13 (GT) <sub>31</sub>	0,043	0,028	0,000	0,026
14 (GT) <sub>32</sub>	0,014	0,037	0,068	0,132
15 (GT) <sub>33</sub>	0,014	0,019	0,000	0,026
16 (GT) <sub>36</sub>	0,000	0,000	0,014	0,105

**APÊNDICE D** - Estimativa das frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh05 para todas as populações.

Alelo	Amostragem			
	RG Igarapava	Tietê	RG Lavras	Paranapanema
01 (TG) <sub>08</sub>	0,028	0,031	0,000	0,094
02 (TG) <sub>09</sub>	0,000	0,020	0,000	0,031
03 (TG) <sub>10</sub>	0,028	0,010	0,000	0,000
04 (TG) <sub>11</sub>	0,028	0,010	0,000	0,063
05 (TG) <sub>12</sub>	0,028	0,041	0,015	0,031
06 (TG) <sub>13</sub>	0,014	0,031	0,000	0,031
07 (TG) <sub>14</sub>	0,125	0,163	0,000	0,000
08 (TG) <sub>15</sub>	0,014	0,102	0,118	0,219
09 (TG) <sub>16</sub>	0,069	0,122	0,132	0,063
10 (TG) <sub>17</sub>	0,139	0,092	0,088	0,031
11 (TG) <sub>18</sub>	0,028	0,061	0,074	0,031
12 (TG) <sub>19</sub>	0,056	0,143	0,132	0,250
13 (TG) <sub>20</sub>	0,097	0,051	0,103	0,000
14 (TG) <sub>21</sub>	0,111	0,051	0,103	0,063
15 (TG) <sub>22</sub>	0,042	0,020	0,088	0,063
16 (TG) <sub>23</sub>	0,042	0,020	0,074	0,000
17 (TG) <sub>24</sub>	0,083	0,000	0,015	0,000
18 (TG) <sub>25</sub>	0,014	0,010	0,029	0,031
19 (TG) <sub>26</sub>	0,028	0,010	0,000	0,000
20 (TG) <sub>27</sub>	0,028	0,010	0,029	0,000

**Apêndice E** - Estimativas das frequências alélicas encontradas para o locus Sh10 para todas as populações. As frequências para os alelos privados estão em negrito.

Alelo	Amostragem			
	RG Igarapava	Tietê	RG Lavras	Paranapanema
01 (GT) <sub>19</sub>	0,203	0,179	0,236	0,000
02 (GT) <sub>20</sub>	0,027	0,047	0,056	0,063
03 (GT) <sub>21</sub>	0,027	0,038	0,042	0,031
04 (GT) <sub>22</sub>	0,216	0,179	0,181	0,063
05 (GT) <sub>23</sub>	0,081	0,113	0,194	0,156
06 (GT) <sub>24</sub>	0,081	0,038	0,056	0,031
07 (GT) <sub>25</sub>	0,054	0,160	0,042	0,250
08 (GT) <sub>26</sub>	0,081	0,094	0,097	0,094
09 (GT) <sub>27</sub>	0,081	0,057	0,042	0,063
10 (GT) <sub>28</sub>	0,054	0,094	0,000	0,188
11 (GT) <sub>29</sub>	0,054	0,000	0,056	0,063
12 (GT) <sub>32</sub>	<b>0,041</b>	0,000	0,000	0,000

**APÊNDICE F** – Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh12 para todas as populações.

<b>Amostragem</b>				
<b>Alelo</b>	<b>RG Igarapava</b>	<b>Tietê</b>	<b>RG Lavras</b>	<b>Paranapanema</b>
1 (CA) <sub>06</sub>	0,043	0,000	0,014	0,026
2 (CA) <sub>07</sub>	0,000	0,037	0,000	0,105
3 (CA) <sub>08</sub>	0,129	0,065	0,042	0,000
4 (CA) <sub>09</sub>	0,000	0,046	0,042	0,000
5 (CA) <sub>10</sub>	0,014	0,065	0,069	0,026
6 (CA) <sub>11</sub>	0,057	0,241	0,028	0,053
7 (CA) <sub>12</sub>	0,100	0,157	0,056	0,158
8 (CA) <sub>13</sub>	0,014	0,000	0,056	0,026
9 (CA) <sub>14</sub>	0,057	0,000	0,056	0,079
10 (CA) <sub>15</sub>	0,100	0,139	0,097	0,026
11 (CA) <sub>16</sub>	0,086	0,046	0,139	0,053
12 (CA) <sub>17</sub>	0,143	0,046	0,069	0,105
13 (CA) <sub>18</sub>	0,043	0,102	0,125	0,026
14 (CA) <sub>19</sub>	0,014	0,028	0,028	0,079
15 (CA) <sub>20</sub>	0,071	0,019	0,028	0,105
16 (CA) <sub>21</sub>	0,043	0,000	0,000	0,026
17 (CA) <sub>22</sub>	0,086	0,000	0,111	0,053
18 (CA) <sub>24</sub>	0,000	0,009	0,042	0,053

**APÊNDICE G** – Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Sh16 para todas as populações. As frequências para os alelos privados estão em negrito.

<b>Amostragem</b>				
<b>Alelo</b>	<b>RG Igarapava</b>	<b>Tietê</b>	<b>RG Lavras</b>	<b>Paranapanema</b>
1 (TG) <sub>04</sub>	<b>0,026</b>	0,000	0,000	0,000
2 (TG) <sub>06</sub>	0,026	0,000	0,041	0,000
3 (TG) <sub>07</sub>	0,000	0,018	0,014	0,000
4 (TG) <sub>08</sub>	0,154	0,009	0,108	0,026
5 (TG) <sub>09</sub>	0,038	0,018	0,081	0,132
6 (TG) <sub>10</sub>	0,051	0,063	0,149	0,079
7 (TG) <sub>11</sub>	0,077	0,214	0,054	0,079
8 (TG) <sub>12</sub>	0,256	0,223	0,122	0,158
9 (TG) <sub>13</sub>	0,051	0,063	0,081	0,105
10 (TG) <sub>14</sub>	0,026	0,098	0,095	0,184
11 (TG) <sub>15</sub>	0,038	0,063	0,135	0,132
12 (TG) <sub>16</sub>	0,128	0,089	0,014	0,000
13 (TG) <sub>17</sub>	0,115	0,071	0,068	0,053
14 (TG) <sub>18</sub>	0,013	0,045	0,000	0,026
15 (TG) <sub>19</sub>	0,000	0,027	0,041	0,026

**APÊNDICE H** – Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de *loci* para cada das populações de *Salminus hilarii* coletadas, sendo, A: Igarapava; B: Tietê; C: Lavras; D: Paranapanema.

<b>Pop</b>	<b>Locus 1</b>	<b>Locus 2</b>	<b>P-Value</b>	<b>S.E.</b>
A	Sh01	Sh05	1.00000	0.00000
A	Sh01	Sh10	0.51860	0.04504
A	Sh05	Sh10	0.28051	0.04018
A	Sh01	Sh12	0.45755	0.04406
A	Sh05	Sh12	1.00000	0.00000
A	Sh10	Sh12	0.00000	0.00000
A	Sh01	Sh16	0.79402	0.03298
A	Sh05	Sh16	0.06903	0.02125
A	Sh10	Sh16	0.51498	0.04324
A	Sh12	Sh16	0.15647	0.02886
B	Sh01	Sh05	0.52016	0.04557
B	Sh01	Sh10	0.55056	0.04184
B	Sh05	Sh10	0.08460	0.02179
B	Sh01	Sh12	0.05666	0.01764
B	Sh05	Sh12	0.07973	0.01914
B	Sh10	Sh12	0.02089	0.00826
B	Sh01	Sh16	0.39674	0.04158
B	Sh05	Sh16	0.08784	0.02361
B	Sh10	Sh16	0.02674	0.00768
B	Sh12	Sh16	0.73869	0.03126
C	Sh01	Sh05	0.25826	0.03464
C	Sh01	Sh10	0.19832	0.03144
C	Sh05	Sh10	0.43989	0.03572
C	Sh01	Sh12	0.17413	0.03348
C	Sh05	Sh12	0.40442	0.04273
C	Sh10	Sh12	0.61391	0.03839
C	Sh01	Sh16	0.98109	0.00910
C	Sh05	Sh16	0.47732	0.04142
C	Sh10	Sh16	1.00000	0.00000
C	Sh12	Sh16	0.48541	0.04455
D	Sh01	Sh05	0.78889	0.02614
D	Sh01	Sh10	1.00000	0.00000
D	Sh05	Sh10	1.00000	0.00000
D	Sh01	Sh12	1.00000	0.00000
D	Sh05	Sh12	0.58978	0.03476
D	Sh10	Sh12	1.00000	0.00000
D	Sh01	Sh16	1.00000	0.00000
D	Sh05	Sh16	1.00000	0.00000
D	Sh10	Sh16	1.00000	0.00000
D	Sh12	Sh16	1.00000	0.00000

# 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](#)