

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
TATIANE IVY OKAZAKI

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL DA
PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*) NA BACIA DO ALTO PARAGUAI POR MEIO DE
MICROSSATÉLITES PARA O SEU MANEJO SUSTENTADO**

Mogi das Cruzes, SP

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE DE MOGI DAS CRUZES
TATIANE IVY OKAZAKI

**AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE GENÉTICA INTRA E INTERPOPULACIONAL DA
PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*) NA BACIA DO ALTO PARAGUAI POR MEIO DE
MICROSSATÉLITES PARA O SEU MANEJO SUSTENTADO**

Dissertação apresentada à Universidade de
Mogi das Cruzes para a obtenção do Título
de Mestre em Biotecnologia.
Área de concentração: Ambiental.

Prof^o Orientador: Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

Mogi das Cruzes, SP

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Universidade de Mogi das Cruzes - Biblioteca Central

Okazaki, Tatiane Ivy

Avaliação da diversidade genética intra e interpopulacional da Piraputanga (*Brycon hilarii*) na Bacia do Alto Paraguai por meio de microssatélites para o seu manejo sustentado / Tatiane Ivy Okazaki. – 2009.

92 f.

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

Área de concentração: Ciências biológicas

Orientador: Prof^o Dr^o Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

1. Piraputanga 2. *Brycon 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 trinta de abril de dois mil e nove, na Universidade de Mogi das Cruzes, realizou-se a defesa de dissertação "Avaliação da diversidade genética intra e inter populacional da piraputanga (*Brycon hilarii*) na bacia do Alto Paraguai por meio de microssatélite para o seu manejo sustentado" para obtenção do grau de Mestre pelo(a) candidato(a) **Tatiane Ivy Okazaki**. 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 da Silva Hilsdorf e Vitor Fernandes Oliveira de Miranda da Universidade de Mogi das Cruzes e Daniela Calcagnotto da Universidade 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, 30 de ABRIL de 2009.

Comissão Examinadora

Julgamento

Prof. Dr. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf

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

Prof. Dr. Vitor Fernandes O Miranda

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

Prof.^a Dr.^a Daniela Calcagnotto

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

*Aos meus avós, pessoinhas em forma de anjo
sem as quais eu nunca chegaria aqui.*

AGRADECIMENTOS

Deixei os agradecimentos pro fim porque pensei que seria fácil... → Esqueci do fato que estaria exausta, estressada, esquecida e com sono... >< Então se eu deixei você de lado aqui, pode vir tirar satisfações comigo depois da defesa... =P

Primeiramente quero agradecer a pessoa que possibilitou meus primeiros passos na ciência. Meu querido orientador mais legal de todo o mundo, Prof. Dr. Alexandre W. S. Hilsdorf! Você sempre acreditou que eu podia fazer tudo isso, mesmo quando eu te enrolava até... E não é que você tava certo??? Muuuito obrigada por tudo! Sempre vou pensar com carinho desses cinco anos de pesquisa juntos... ^^

Ao CNPq e à Embrapa Pantanal, pelo apoio financeiro que possibilitou a realização do trabalho.

À Emiko Kawakami de Resende da Embrapa Pantanal pelas coletas de piraputanga, porque sem elas o trabalho não teria saído do papel.

À minha querida família Okazaki e anexos, em especial à Tia Cris, sem a qual eu não teria nem entrado numa faculdade de biologia; à minha mãe, que forneceu 23, X para a minha pessoa poder existir; à Tia Cíntia, que me salvou com seus conhecimentos ótimos de informática que possibilitaram a sobrevivência do meu laptop e existência de muitas tabelas; à Pitti que foi meu suporte de vida naquela semana terrível que eu não tinha vontade de levantar da cama; à minha avó que cozinha muito bem e que tem uma habilidade master de me acordar; ao meu avô que faz um café muito bom, me levava toda segunda pra estação de trem possibilitando, assim, a minha ida à Mogi das Cruzes e me deu esse sobrenome demais que mostra que o meu lugar é na genética! XD

Às minhas amigas lindas Ana, Carol, Clara, Jamila, Maira e Talita, que perto ou longe sempre estiveram aqui no meu S2, em especial a Clara, porque eu amo essa mina demais e sem ela eu não passo de um pontinho rosa desbotado...

Às minhas lindas amigas do LagoaA/LGPA, “visitantes permanentes”, Calou (Carol), Coris (Corina), Fabi, Fê (Fernanda), Jujuba (Juliana), Ká (Karla), Nê (Neilce), Paolha (Paola), Sarita (Sara), Tama-chan (Tamara) e Vânia, que dentro ou fora do laboratório, sempre me ajudaram e sem elas, a pesquisa não teria cor, sabor ou

gosto, em especial a Ju, porque eu não sou nada sem ela e ela não é nada sem mim... Gus, você também se encaixa aqui, só transfira os pronomes, adjetivos e substantivos femininos para o masculino, tá? =)

Aos companheiros republicanos Paty e Paulo, que fizeram a transição casa-morar sozinha não ser nada mais do que casa-casa.

Ao Clan XIV, porque nem tudo nessa vida é trabalho e com certeza eles me “ajudaram” muito nessa área! Em especial ao Gus, meu terapeuta mode on que me ajudou sempre que eu precisei, ao Rê, saco de pancada, consultor tecnológico e corretor de dissertação pra todas as horas ;) , ao Ernesto (fófis) que me ajudou a desestressar quando eu já estava surtando e ao Rike Rike companheiro de aventuras e doador de casa quando eu não estava em Mogi e não queria estar em casa...

Aos nossos hóspedes que tornaram a vida em Mogi muito mais divertida, em especial a Carolzinha, Bianca e Luisa.

Às toptops do laboratório Angela, Tuca e Cris, modelos de como pesquisadoras devem ser e às quais eu devo muito do meu conhecimento como pesquisadora hoje.

Aos amigos do LGM e laboratório de virologia, companheiros de madrugadas, experimentos e internet XD, que deixaram o ambiente mais gostoso de trabalhar, em especial ao Alex, Almir, Cris, Emy, Fê (Agro), Fê (Moléculo), Flavinha, Marília, Maristela, Robson, por todas as nossas conversas, desabafos, risadas e apoios...

Aos colegas do curso, pela força e por mostrar que não estávamos sozinhos nessa empreitada que é o mestrado, em especial a Ana, Carol, Priscila e Tiago.

Aos professores do curso de Biotecnologia, que muito contribuíram para a minha formação e conhecimento, me ensinando não só conteúdo, mas também a pensar, em especial ao Prof. Luis Nunes, Profa. Regina, Profa. Santana e Prof. Welington.

Ao Prof. Cláudio Shida, pelo auxílio com a estatística.

Aos professores Welington e Vítor, pela presença na banca de qualificação e pelas dicas valiosas que foram bem utilizadas no presente trabalho.

A todos os outros amigos, colegas, que de uma forma ou de outra também contribuíram com esse trabalho e que eu esqueci de citar aqui.

E à natureza, porque é por causa dela que a vida, este trabalho e nós existimos.

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar,
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.*

*Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.*

*Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

(Martin Luther King)

RESUMO

A piraputanga (*Brycon hilarii*) é uma espécie pertencente a família Characidae, endêmica da Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai. É uma espécie importante tanto para pesca artesanal como para pesca esportiva da região. A manutenção dos estoques de piraputanga em um nível de uso sustentável depende dentre outras da conservação da variabilidade genética intra e interpopulacional. Para isso, é necessário o conhecimento do grau de diferenciação genética das populações de piraputanga. Para o desenvolvimento de programas de manejo e conservação desta espécie, este estudo objetivou a avaliação da variabilidade genética dentro e entre as populações da piraputanga, a partir do uso de marcadores microssatélites. O DNA total de tecidos da nadadeira caudal de espécimes de piraputanga foi extraído e então *loci* microssatélites foram amplificados com o uso de *primers* específicos e não específicos para a espécie. Os alelos foram genotipados e análises estatísticas foram conduzidas. A análise AMOVA mostrou que mais de 98% do total da variação genética encontra-se dentro dos indivíduos dentro das populações, indicando que não existe diferença genética entre estas. Este dado foi corroborado pelos valores calculados de R_{ST} e F_{ST} ($P > 0,05$) que sugerem uma total pan-mixia entre as populações. A análise bayesiana também indicou que o mais provável número de populações existente seria um ($K=1$). O número de migrantes encontrado foi de 5,68 indivíduos, mostrando um alto fluxo gênico entre os rios. O valor médio de F_{IS} ficou entre 0,034 e 0,205, indicando um déficit de heterozigotos e a presença de endogamia. Entretanto, neste caso, este valor pode ser explicado pela presença de alelos nulos nas análises de alguns *loci*. De acordo com esses resultados, não há sobrepesca dos estoques e para fins conservacionais, as populações devem ser manejadas como uma metapopulação.

Palavras-chave: Piraputanga, *Brycon hilarii*, microssatélites, conservação.

ABSTRACT

Piraputanga (*Brycon hilarii*) is a Characidae species, endemic to Alto Paraguai Hydrographic Basin. It is an important species for region's commercial and sports fishing. Maintenance of piraputanga stocks in a sustainable level depends on the conservation of the genetic variability both within and among populations. Therefore, knowledge on the genetic differentiation degree in piraputanga's populations is needed. In order to develop effective strategies for this species conservation, this study aimed to determine levels of genetic variation within and among populations of piraputanga, based in microsatellite markers. Extraction of total DNA from tail fin tissues was performed, followed by the amplification of microsatellite *loci* with the use of specific and non-specific primers. Genotyping of alleles took place and statistical analyses were conducted. AMOVA analysis shows that more than 98% of genetic variation is within individuals within populations, indicating there's no genetic difference between the studied populations. This data matches R_{ST} and F_{ST} ($P>0.05$) calculated values, which suggest panmitic populations. The Bayesian analysis also shows that the most probable number of populations would be one ($K=1$). The number of migrants found was 5.68 individuals, suggesting high gene flow amongst rivers. F_{IS} average value ranges between 0.034 e 0.205, which indicates heterozigotes deficit and the occurrence of imbreeding. However, in this case, this positive F_{IS} value can be explained by the occurrence of null alleles in some *loci*. According to these results, there's no stock overfishing happening, and for conservational means, these piraputanga populations must be managed as a metapopulation.

Keywords: Piraputanga, *Brycon hilarii*, microsatellites, conservation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Piraputanga (<i>Brycon hilarii</i>).....	19
Figura 2. Mapa com as amostragens de piraputanga na bacia do Alto Paraguai.....	29
Figura 3. Gel de agarose da extração de DNA total de indivíduos da amostragem Paraguai.....	38
Figura 4. Gel de agarose da extração de DNA total de indivíduos da amostragem Cuiabá.....	38
Figura 5. Fragmentos amplificados do <i>locus</i> Bh15.....	40
Figura 6. Valores de K para o conjunto de dados das sete amostragens.	53
Figura 7. Estrutura <i>bar plot</i> representando a atribuição dos genótipos para cada população,.....	53
Figura 8. Valores de ΔK para o conjunto de dados das sete amostragens.	54
Figura 9. Estrutura <i>bar plot</i> representando a atribuição dos genótipos para uma única população.	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações sobre as coletas de piraputangas.....	28
Tabela 2. Primers testados, desenhados para as espécies <i>Brycon hilarii</i> , <i>Brycon opalinus</i> e <i>Brycon cephalus</i>	32
Tabela 3. Condições de amplificação dos microssatélites.....	33
Tabela 4. Condições de amplificação para o sequenciador automático	34
Tabela 5. Condições de amplificação para os <i>loci</i>	39
Tabela 6. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o <i>locus</i> BoM 1	41
Tabela 7. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o <i>locus</i> Bh16.....	41
Tabela 8. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o <i>locus</i> Bh15.....	42
Tabela 9. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o <i>locus</i> Bh05.....	42
Tabela 10. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o <i>locus</i> BC48-10	43
Tabela 11. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o <i>locus</i> Bh08.....	44
Tabela 12. Estatísticas para a diversidade genética: Número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_O), heterozigosidade esperada (H_E), coeficiente de endogamia (F_{IS})	45
Tabela 13. Número de alelos encontrados para cada amostragem.....	46
Tabela 14. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Bh05 para todas as amostragens.....	47
Tabela 15. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Bh08 para todas as amostragens.....	47
Tabela 16. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Bh15 para todas as amostragens.....	48
Tabela 17. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> Bh16 para todas as amostragens.....	48

Tabela 18. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o <i>locus</i> BoM1 para todas as amostragens.....	48
Tabela 19. Estimativas das frequências alélicas encontradas para <i>locus</i> BC48-10 para todas as amostragens.....	49
Tabela 20. Médias das diversidades gênicas dentro de cada amostragem.....	49
Tabela 21. AMOVA considerando todas as amostragens em um mesmo grupo.....	50
Tabela 22. AMOVA considerando quatro grupos de sub-bacias com suas respectivas populações.....	51
Tabela 23. Valores de F_{ST}	51
Tabela 24. Diferenciação genética entre pares de populações utilizando o índice Φ_{ST}	52
Tabela 25. Diferenciação genética entre pares de populações utilizando o índice R_{ST}	52

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 BIODIVERSIDADE AQUÁTICA	14
1.2 O PANTANAL	15
1.3 AS ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Brycon</i> E SUA IMPORTÂNCIA	17
1.4 A PIRAPUTANGA (<i>Brycon hilarii</i>)	18
1.5 CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES	20
1.6 CONHECIMENTO DA VARIAÇÃO GENÉTICA	21
1.7 MICROSSATÉLITES	22
1.8 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 MÉTODO	28
3.1 LOCAIS E DATAS DE COLETA	28
3.2 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE TECIDOS	30
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	30
3.4 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO MATERIAL GENÉTICO DOS ESTOQUES	31
3.4.1 <i>Genotipagem manual por gel de poliacrilamida</i>	32
3.4.2 <i>Genotipagem automática</i>	34
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	35
3.5.1 <i>Diversidade genética intrapopulacional</i>	35
3.5.2 <i>Diversidade genética entre populações</i>	35
4 RESULTADOS	38
4.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE TECIDO DE NADADEIRA CAUDAL	38
4.2 OTIMIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES	39
4.2.1 <i>Genotipagem de todos os indivíduos para as quatro amostragens</i>	40
4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL	41
4.3.1 <i>Diversidade alélica e equilíbrio de Hardy-Weinberg</i>	44
4.3.2 <i>Estimativas das frequências alélicas para os seis loci microssatélites</i>	46
4.3.3 <i>Médias das diversidades gênicas dentro de cada amostragem</i>	49

4.3.4 <i>Análise de alelos nulos</i>	50
4.4 DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS AMOSTRAGENS	50
4.4.1 <i>Análise de Variância Molecular (AMOVA)</i>	50
4.4.2 <i>Valores de diferenciação genética F_{ST} e R_{ST}</i>	51
4.4.3 <i>Análise de estruturação populacional</i>	52
4.4.4 <i>Valores de Nm entre as amostragens</i>	54
5 DISCUSSÃO	55
5.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE TECIDO DE NADADEIRA CAUDAL.....	55
5.2 TESTES DE OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS E ELETROFORESE	55
5.3 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRA POPULACIONAL	56
5.4 DIVERSIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL.....	59
5.5 AUSÊNCIA DE ESTRUTURAÇÃO DA PIRAPUTANGA RELACIONADA A HIDROGRAFIA PANTANEIRA E REPRODUÇÃO DA ESPÉCIE	61
5.6 IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO E MANEJO SUSTENTADO DA ESPÉCIE.....	64
6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES	68
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICE	85

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIODIVERSIDADE AQUÁTICA

O Brasil abriga aproximadamente 14% das espécies existentes no mundo, a biota mais diversa entre os 17 países megadiversos do planeta (LEWINSOHN; PRADO, 2002). Os peixes de água doce são responsáveis por 20 a 25% da biodiversidade de vertebrados e há indícios de que somente na América do Sul ocorram mais de 8.000 espécies, considerando-se apenas duas das diversas ordens descritas, Characiformes e Siluriformes (LOWE-MCCONNELL, 1999). O Brasil é o líder em peixes de água doce, com 2.122 espécies catalogadas, aproximadamente 21% da lista mundial (BUCKUP; MENEZES 2003).

Os peixes neotropicais (de água doce e salgada) contribuem com aproximadamente 13% de toda a biodiversidade de vertebrados. Provavelmente 30 a 40% da fauna de peixes de água doce neotropicais continuam não descritas e o total pode chegar a 6.000 espécies (REIS *et al.* 2003), sendo 5.000 o número estimado somente para a América do Sul (SCHAEFER, 1998). O número preciso de espécies de água doce é desconhecido e difícil de ser estimado devido a diversos fatores restritivos, como esforço amostral insuficiente ou até mesmo inexistente (AGOSTINHO *et al.*, 2005). Aproximadamente 400 espécies novas de peixes de água doce são descritas a cada década, e Vari e Malabarba (1998) imaginam um aumento eventual de 50% na riqueza mundial de peixes (aproximadamente 33 mil), com os peixes neotropicais (8 mil) contribuindo para 24% do total.

Os peixes se apresentam como os vertebrados mais diversificados e os de maior variação genética conhecida (TORRES *et al.*, 2004) e são bons indicadores de tendências da biodiversidade pois sua enorme variedade reflete uma grande gama de condições ambientais (MOYLE; LEIDY, 1992).

Em uma definição, a biodiversidade seria como uma estrutura de variabilidade entre organismos vivos com cinco níveis de complexidade (1 - ecossistemas inteiros; 2 - nichos ecológicos; 3 - espécies; 4 - populações dentro de espécies; 5 - genes

dentro de populações) distribuída bioespacialmente e hierarquicamente (GROOMBRIDGE, 1992). Seguindo esta definição, mudanças em quaisquer dos componentes podem resultar em reduções na biodiversidade total. Enquanto que os riscos para a biodiversidade terrestre tendem a ser ressaltados, os riscos à diversidade aquática são bem menos expostos e talvez nunca sejam considerados (BEARDMORE *et al.*, 1997).

Moyle e Leidy (1992) concluíram que 20% das espécies de peixes de água doce já foram extintas ou estão em vias de extinção, e que as espécies mais prováveis de serem ameaçadas de extinção são ou adaptadas para a vida em grandes rios ou espécies endêmicas com pequena distribuição. Ambientes de água doce são particularmente sensíveis à perda de biodiversidade induzida pelo homem, por causa dos altos níveis de endemismo e pela demanda global por água e serviços hidráulicos (BEARDMORE *et al.*, 1997), mas de modo geral, infelizmente predomina o pensamento de que rios e mares são fontes inesgotáveis de recursos e que são estes ambientes pouco afetados pelas interferências humanas (GREENWOOD, 1992).

Os ecossistemas aquáticos são pouco estudados, comparado com ecossistemas terrestres, embora ocupem quase três quartos da superfície terrestre e contenham a maior parte da diversidade biológica, particularmente em relação ao número de espécies (BEARDMORE *et al.*, 1997).

1.2 O PANTANAL

O Pantanal é um dos maiores ecossistemas de áreas úmidas do mundo (BUCHER *et al.*, 1994). Está localizado em uma depressão ampla e rasa no centro da América do Sul. Está posicionada na Bacia do Alto Paraguai, ao sul da Bacia Amazônica e a leste dos Andes. Anualmente, o Alto Rio Paraguai e seus tributários transbordam e inundam regularmente mais de 150.000 km² de terras (SILVA; GIRARD, 2004).

O Alto Paraguai drena uma área de 500.000 km², dos quais dois terços estão nos Estados brasileiros do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Baseado na

elevação, a bacia do Pantanal pode ser subdividida em 3 unidades fisiográficas. A primeira, o Planalto ou platô (250-750m acima do nível do mar) é a região de cabeceiras. Sua cobertura vegetal é caracterizada pelo cerrado, usado predominantemente para a agricultura e criação de gado. A segunda é a depressão, a qual ocorre a altitudes entre 180 e 250m. É uma região pequena com declives verticais cobertos por uma floresta densa, o cerradão. A última unidade é o Pantanal, entre 150 a 180m, uma planície de liberação baixa, aproximadamente metade do tamanho do platô, com um gradiente hidráulico que não excede 15cm por quilômetro (SILVA; GIRARD, 2004).

O principal fator ecológico que determina os padrões e processos no Pantanal é o pulso de cheias (JUNK; SILVA, 1999), o qual segue um ciclo anual e monomodal, com amplitudes de 2 a 5m e uma duração de três a seis meses. Existe um atraso de aproximadamente quatro meses antes que o pico de nível da água passe através do Pantanal Norte (Mato Grosso) para o Pantanal Sul (Mato Grosso do Sul). A estação seca já está acontecendo no norte do Pantanal quando o nível de água alcança o pico no sul. Os níveis da água em qualquer estação no norte são extremamente variáveis, subindo e descendo em resposta à chuva. Já os níveis da água no sul sobem e descem mais calmamente durante o ano porque a retenção de inundação natural diminui as flutuações causadas por grandes tempestades (HECKMAN, 1999). O Pantanal também está sujeito a uma variação pluri-anual da intensidade de inundação, com alternância de anos apresentando grandes inundações com anos significativamente secos (MOURÃO *et al.*, 2000).

Essas cheias e vazantes periódicas cumprem um papel fundamental e complexo de manutenção e auto-reconstituição da biodiversidade local, além de regular o fluxo das águas oriundas do Mato Grosso (BUCHER *et al.*, 1994).

A supressão de habitats naturais no Cerrado circundante levou a uma erosão severa, causando deposição de sedimentos nas terras baixas do Pantanal e alterando os padrões de fluxo de água e regimes hidrológicos. Nos últimos 30 anos, por exemplo, o Rio Taquari vem tendo inundações excessivas e permanentes em áreas extensas que previamente inundavam apenas temporalmente (HARRIS *et al.*, 2005).

Grandes projetos de infraestrutura também ameaçam o Pantanal. A represa hidroelétrica Manso, concluída em 2000, é a maior de nove reservatórios na área, e alterou os padrões hidrológicos naturais ao longo da bacia do Rio Cuiabá (HARRIS

et al., 2005). Sedimentação, os padrões de fluxo e a diminuição dos cardumes de peixes são três problemas enfrentados pelo rio, apontados, por muitos, como gerados pela represa (SAFFORD, 2001).

De acordo com a avaliação de conservação da *World Wildlife Fund* (WWF) e do Programa de Suporte a Biodiversidade (1995), o Pantanal é globalmente incrível (nível 1 em uma escala até 4 – não singular) em termos de individualidade biológica, é vulnerável (nível 3 em uma escala até 5 – pouco vulnerável) em termos de conservação e tem alta prioridade (nível 1 em uma escala até 4 – baixa prioridade) para ações de conservação (SILVA; GIRARD, 2004).

Não se conhece toda a riqueza da biodiversidade pantaneira, podendo-se apenas estimá-la pela grande extensão do território e pelo número de espécies aí encontradas (ODALIA-RÍMOLI *et al.*, 2000). Britski *et al.* (1999) identificou 263 espécies de peixes para o Pantanal, as quais certamente ocorrem nessa bacia, dada a sua dimensão e a falta de barreiras que impeçam a livre dispersão. As espécies de importância econômica são as mesmas da bacia como um todo, como o pacu, o pintado, a cachara, o dourado, o jaú, o piavuçu, a piraputanga, o barbado e o curimatá.

1.3 AS ESPÉCIES DO GÊNERO *Brycon* E SUA IMPORTÂNCIA

A ordem Characiformes é o grupo dominante entre os peixes de água doce da América do Sul, sendo a família Characidae a maior e mais complexa desta ordem (BRITSKI *et al.*, 1999). Nela estão peixes de hábitos alimentares muito diversificados (herbívoros, onívoros, carnívoros) e que exploram uma grande variedade de habitats (BRITSKI *et al.*, 1988). O tamanho das espécies varia desde 2 centímetros até mais de um metro (BRITSKI, 1972).

Calcagnotto *et al.* (2005) sequenciando genes nucleares e mitocondriais revisou a taxonomia da família Characidae e gêneros antes creditados como caracídeos foram revisados em outras famílias. O gênero *Brycon*, pertencente à subfamília Bryconinae, mantêm-se parte da família Characidae (CALCAGNOTTO *et al.*, 2005), e pode ser considerado como o segundo grupo de peixes de maior

ocorrência na América Neotropical, depois do gênero *Astyanax*. Foram descritas 74 espécies do gênero *Brycon*, dentre as quais, 42 são reconhecidas (LIMA, 2003).

No Brasil, espécies deste gênero podem ser encontradas em diversas bacias hidrográficas e de acordo com Mendonça e Melo (1994 *apud* ZUNTINI *et al.*, 2004) vêm despertando o interesse das instituições de pesquisa nos últimos anos, devido à excelente qualidade da carne, ao hábito alimentar onívoro, ao rápido crescimento e ganho de peso, características as quais constituem ótimos indicadores para a seleção desses peixes como alternativa para o desenvolvimento da piscicultura.

Na Bacia Hidrográfica do Rio Paraíba do Sul, pertencente às bacias do Leste do Brasil, também há espécies do gênero *Brycon*. Dados de captura no Paraíba do Sul mostraram que no início da década de 50 havia uma pesca comercial na região, e que, a piabanha (*Brycon insignis*) era o segundo peixe em volume de captura, com rendimento de 23 ton/ano, aproximadamente (MACHADO; ABREU, 1952).

Os peixes de água doce do gênero *Brycon* são tipicamente cinza-prateados, de tamanho médio a grande, e normalmente importantes para pesca comercial, de subsistência e para a aquicultura (GOMIERO; BRAGA, 2007).

A reprodução dos *Brycon* é típica dos peixes que formam cardumes, migrando rio acima para se reproduzir (piracema), sempre para áreas favoráveis para o desenvolvimento de larvas e alevinos (KRAMER, 1978).

De acordo com a classificação de Vazzoler (1996) o tipo de desova do *Brycon opalinus* é total e sincrônica em dois grupos, na qual, em cada período reprodutivo, existem dois lotes de oócitos em diferentes estados de maturação dentro dos ovários: um estoque reserva de oócitos e oócitos que irão amadurecer sincronicamente e serão postos no período reprodutivo, uma vez ao ano. A desova total é frequente em representantes do gênero *Brycon*. Em *Brycon hilarii* a desova também ocorre desta forma.

1.4 A PIRAPUTANGA (*Brycon hilarii*)

A Piraputanga (*Brycon hilarii*) (Figura 1) é um representante do gênero *Brycon* anteriormente nominado de *Brycon microlepis* (VALENCIENNES, 1850) e

recentemente modificado para *Brycon hilarii* (LIMA, 2003). A Piraputanga é importante tanto para pesca comercial do Pantanal, sendo um dos principais pratos da cozinha pantaneira, como para o turismo ecológico. Alcançam cerca de 50 cm de comprimento total e 2,5 kg; indivíduos acima desse peso são raros. São espécies onívoras, alimentam-se de peixes, frutos e sementes. Vivem em locais de corredeiras e nos remansos, embaixo de árvores frutíferas e próximos às plantas aquáticas. É uma espécie conhecida por realizar a piracema, ou seja, migrar rio acima para desovar e assim, se reproduzir.

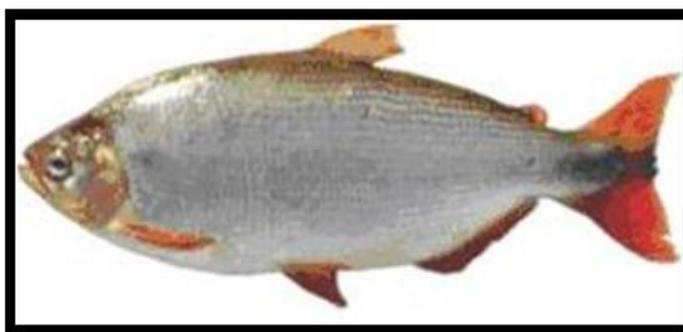


Figura 1. Piraputanga (*Brycon hilarii*). Foto de Alexandre W. S. Hilsdorf.

Devido à apreciação do seu sabor, o consumo de piraputanga tem aumentado e a sua comercialização vem crescendo em restaurantes ao redor de Cuiabá, embora dados básicos sobre a biologia desta espécie sejam insuficientes e faltem informações sobre a situação atual de seu estoque (MATEUS; ESTUPIÑÁN, 2002).

Para o Pantanal Mato-grossense, onde pescadores possuem uma forte importância econômica, pouco se conhece sobre o atual nível de exploração dos estoques pesqueiros. Entretanto, para outras espécies comercialmente importantes, como o pacu, a cachara e a piraputanga, entre outras, não existe nenhum dado disponível do rendimento máximo sustentável (MATEUS; ESTUPIÑÁN, 2002).

Felizmente, a piraputanga foi considerada como uma das espécies de peixes de água doce prioritárias para compor os novos projetos de pesquisa em aquicultura do Sistema Nacional de Pesquisa Agropecuária – SNPA (QUEIROZ *et al.*, 2002). Segundo o Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai (PCPAB, 1997) em 1995 esta espécie encontrava-se como a sexta espécie mais coletada (28,3 toneladas) na pesca comercial do Estado do Mato Grosso, mas segundo Mateus e

Estupiñán (2002) esta figura pode ter sido subestimada, já que não existe nenhum acompanhamento sistemático dos descarregamentos pesqueiros neste Estado.

1.5 CONSERVAÇÃO DE ESPÉCIES

Peixes brasileiros são de grande interesse conservacional, já que a fauna de peixes de água doce no Brasil é particularmente diversa e muitas espécies não são encontradas naturalmente fora da América do Sul. Esta diversidade sustenta um grande número de comunidades locais, através de pesqueiros e pesca esportiva. Muitas das espécies dependem da inundação sazonal para a migração reprodutiva, assim como para acessar as lagoas sazonais para criar as larvas e jovens. Elas são particularmente sensíveis aos efeitos negativos de represas hidroelétricas, urbanização, agricultura e espécies introduzidas (CAROLSFELD *et al.*, 2003).

Diversas metodologias têm sido desenvolvidas com o objetivo de acessar o *status* de conservação de espécies vegetais e animais (NATURE CONSERVANCY COUNCIL, 1990). O sistema de classificação mais conhecido e amplo para acessar o status de ameaça das espécies de peixes é aquele adotado e desenvolvido pela União Internacional para a Conservação da Natureza e Recursos Naturais (IUCN – *International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources*) (IUCN, 1990). A única espécie do gênero *Brycon* presente na lista da IUCN é o *Brycon acuminatus* (IUCN, 2008). Já em outra publicação de espécies ameaçadas de extinção, o livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção (ROSA; LIMA, 2008), encontra-se 6 espécies do gênero *Brycon* (*B. devillei*, *B. insignis*, *B. nattereri*, *B. opalinus*, *B. orbignyanus*, e *B. vermelha*).

Esforços estão em progresso para mostrar os efeitos da poluição e destruição do habitat ripário. Pelos últimos 20 anos muitas companhias hidroelétricas fizeram programas de reprodução em cativeiro como uma tentativa para mitigar os efeitos negativos das suas represas, mas a efetividade desta abordagem não é bem conhecida (GODINHO; FERREIRA, 1998). Os peixes usados nestes programas são normalmente bastante férteis e o *Ne* (tamanho efetivo populacional) é geralmente bem baixo (SATO *et al.*, 2000). Como resultado, a diversidade genética e as

adaptações genéticas locais são comprometidas, fatores esses acreditados como centrais para o fracasso a longo termo de muitos programas de reabilitação, incluindo o de salmonídeos (WAPLES; DO, 1994).

1.6 CONHECIMENTO DA VARIAÇÃO GENÉTICA

Estimativas confiáveis da biodiversidade em todos os níveis de complexidade são extremamente difíceis de conseguir. Para fazer isso efetivamente é necessária uma abordagem na qual informações do habitat e diversidade de espécies sejam integradas com informações em sistemática e genética de populações. O mais fundamental dos componentes de diversidade é a variação genética. Esta variação é examinada pela metodologia de genética de população, na qual níveis de variação genética podem ser quantificados e comparados entre e dentro dos táxons. (BEARDMORE *et al.*, 1997).

A diversidade genética, definida aqui como qualquer medida que quantifica a magnitude da variabilidade genética dentro de uma população, é mais frequentemente caracterizada usando dados que ilustram a variação ou em estados alélicos discretos ou em caracteres continuamente distribuídos. A variação em estados alélicos ou traços fenotípicos podem ser neutros ou não, quando se trata de consequências adaptativas. Os marcadores moleculares do tipo microssatélites, representam típicos estados alélicos discretos, assumidos neutros (HUGHES *et al.*, 2008). Com estados alélicos discretos, a medida da diversidade genética ou reflete o número de alelos ou haplótipos dentro de uma população, e/ou a uniformidade das frequências alélicas ou haplotípicas (FRANKHAM *et al.*, 2002).

A diversidade genética fornece a matéria prima para a evolução pela seleção natural (FISHER, 1930). A biologia da conservação e a relacionada genética da conservação levantaram alertas dos potenciais efeitos ecológicos em curto prazo da diminuição da diversidade genética, particularmente em populações pequenas ou em perigo (FRANKHAM *et al.*, 2002). Estudos mostram que a deriva genética e endogamia podem alterar a diversidade genética fixando indivíduos homozigotos, com consequências ecológicas, como reduzir a habilidade de uma população de

persistir em ambientes estressantes ou em transformação (FRANKHAM *et al.*, 2002). A endogamia, resultante de um N_e baixo, produz uma homoziguidade média maior e geralmente deletéria, tanto para populações naturais quanto artificiais (BEARDMORE *et al.*, 1997).

A heteroziguidade é importante para o bem estar de populações naturais e artificiais por duas razões. Primeiro, permite através do processo normal de recombinação e segregação, a produção de uma gama de genótipos, que podem explorar os recursos disponíveis em diferentes maneiras, disponíveis como um espectro de diferentes tipos que levam a respostas adaptativas para condições alteradas. Segundo, existem várias evidências indicando que, normalmente, indivíduos heterozigotos são superiores a indivíduos homozigotos em características como crescimento, fertilidade e resistência a doenças (BEARDMORE *et al.*, 1997).

1.7 MICROSSATÉLITES

Inferências sobre fluxo gênico e variabilidade genética em populações naturais podem ser feitas através de diversas técnicas disponíveis para a detecção de polimorfismos, onde são utilizados marcadores moleculares para acessar o genoma de uma ou mais espécies, quantificar a variabilidade e determinar a estrutura genética das populações (PRIOLI *et al.*, 2001).

Os genomas de eucariotos são densamente povoados por diferentes classes de sequências repetidas, umas mais complexas, como os minissatélites e outras mais simples (HAMADA *et al.*, 1982). Sequências simples repetidas (“SSR – *Simple Sequence Repeats*”), denominadas também de microssatélites (LITT; LUTY, 1989), consistem de pequenas sequências com 1 a 6 nucleotídeos de comprimento, repetidas em “tandem” (JACOB *et al.*, 1991).

Os microssatélites são abundantemente distribuídos pelos genomas e possuem altos níveis de polimorfismo alélico (WEBER; MAY, 1989; TAUTZ; SCHLÖTTERER, 1994), com altas taxas de mutações, de 10^{-4} a 10^{-2} (LAI; SUN, 2003). Esse polimorfismo é baseado nas diferenças de tamanho devido às variações no número de unidades de repetição em um dado *locus* (LIU; CORDES, 2004).

Os polimorfismos seriam gerados por um pareamento desigual meiótico (JEFFREYS *et al.*, 1985) ou um “deslize” (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação (KORNBERG, 1980 *apud* LITT; LUTY, 1989; TAUTZ; SCHLÖTTERER, 1994). Segundo Tautz e Schlötterer (1994) a taxa de mutação seria controlada predominantemente pela eficiência do sistema de reparo do DNA, mas podendo aumentar com a quantidade de repetições. LAI e SUN (2003) mostraram que quando a mutação por *slippage* ocorre, mais frequentemente ela resulta na expansão das repetições em microssatélites curtos, enquanto que em longos, na diminuição das repetições. SHINDE *et al.* (2003) acrescenta que energeticamente, as expansões seriam menos favoráveis que as contrações, já que para a primeira ocorrer no mínimo 3 bases devem ser dissociadas, contra apenas 2 para a segunda.

Geneticistas de populações desenvolveram dois modelos de mutação que estariam por trás da evolução dos microssatélites (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002), o modelo de alelos infinitos (IAM – *infinite alleles model*) (KIMURA; CROW, 1964) e o modelo de mutação passo a passo (SMM – *stepwise mutation model*) (KIMURA; OHTA, 1978). No IAM, a probabilidade de qualquer alelo sofrer uma mutação para qualquer outro estado alélico é idêntica. Já no SMM, cada mutação cria um novo alelo ao adicionar ou deletar uma única repetição microssatélite, ou seja, alelos de tamanhos muito diferentes são mais distantes que alelos de tamanhos similares (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). De acordo com Schlötterer *et al.* (1997), o modelo de mutação passo a passo se aproximaria bem do processo mutacional que age nos microssatélites.

Os microssatélites são marcadores de herança mendeliana e codominantes, ou seja, permitem a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos (WEBER; MAY, 1989; QUELLER *et al.*, 1993; SKIBINSKI, 1994), características que juntamente com seu alto polimorfismo e abundância no genoma facilitaram seu uso em estudos de inferência filogenética, mapeamento genômico, genética populacional (SCHLÖTTERER *et al.*, 1997), instabilidade genômica no câncer, ciência forense e biologia da conservação (SHINDE *et al.*, 2003). A análise de *loci* microssatélites é realizada por meio da técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR-*Polymerase Chain Reaction*) (POWELL *et al.*, 1996), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) complementares (18 a 25 bases) às regiões que os flanqueiam.

Ocorrendo a uma média de 15 kb a 30 kb, a repetição dinucleotídica (CA)_n é uma das mais abundantes famílias de microssatélites nos genomas de vertebrados

(STALLINGS, 1995). Os microssatélites predominantes em peixes compreendem repetições de duas bases, usualmente (GT/AC)_n ou (CT/GA)_n (GOFF *et al.*, 1992).

No campo da aquicultura e pesca, os microssatélites são úteis para a caracterização de estoques genéticos, seleção de reprodutores, construção de mapas de ligação, mapeamento de traços quantitativos importantes economicamente, identificação dos genes responsáveis por esses traços e aplicação em programas de reprodução (CHISTIAKOV *et al.*, 2006).

Dentre as vantagens do uso de microssatélites na análise de variabilidade genética está a detecção de *loci* únicos, utilizando-se condições altamente restritivas (temperaturas de anelamento em torno de 60° C). A alta temperatura de anelamento proporciona ao pesquisador, a certeza de estar analisando um *locus* específico (HOSHINO *et al.*, 2002).

Outra grande vantagem dos microssatélites é a possibilidade de utilização em espécies relacionadas de *primers* desenvolvidos para uma determinada espécie na detecção de *loci* SSR, processo esse denominado de *transferabilidade* ou *amplificação cruzada*, que permite que outra espécie seja avaliada com marcadores potentes, sem a necessidade de gastos com o desenvolvimento de *primers* (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996; HOSHINO *et al.*, 2002).

1.8 ESTUDOS EM GENÉTICA POPULACIONAL DE PEIXES NEOTROPICAIS

Estudos sobre a avaliação e estruturação populacional genética de peixes de água doce neotropicais tem sido focados em espécies pertencentes as ordens Characiformes e Siluriformes (OLIVEIRA *et al.*, 2009), sendo utilizado diversos marcadores moleculares para tal.

Peres *et al.* (2005) avaliaram populações de *Astyanax altiparanae* (Characiformes) utilizando a técnica de eletroforese de aloenzimas, encontrando valores de diversidade gênica considerados altos para a técnica ($H_e = 0,1518 \pm 0,0493$) e alta diferenciação gênica entre as populações.

Sofia *et al.* (2008) com o marcador molecular RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA* – polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), estudaram populações do siluriforme *Hypostomus ancistroides* que se encontravam em moderada diferenciação genética com diversidades gênicas de 0,1230 a 0,1526. O RAPD foi bastante utilizado para estudar diferentes espécies do gênero *Brycon*. Populações de *Brycon lundii* foram analisadas com este mesmo marcador (WASKO; GALETTI, 2002), sendo encontrada estruturação entre estas. Wasko *et al.* (2004) comparou estoques naturais e de cativeiro de *Brycon cephalus*, evidenciando uma menor variabilidade genética nos estoques de cativeiro. Sanches e Galetti (2007), com o RAPD, encontraram estruturação entre populações de *Brycon hilarii* provenientes da sub-bacia do Rio Miranda, assim como Santis *et al.* (2007) encontrou estruturação entre populações de *Brycon henni*, na Colômbia. Lopera-Barreto *et al.* (2008) mostraram moderada estruturação genética entre estoques de *Brycon orbignyanus*.

Wasko e Galetti (2003) utilizaram a DAMD (*Direct Amplification of Minisatellite-region DNA* – Amplificação direta de regiões de minissatélite do DNA) para acessar a informação genética de três espécies de *Brycon* (*Brycon orbignyanus*, *B. microlepis* e *B. lundii*), encontrando, mais uma vez, diferenciação entre as amostragens de *B. lundii*.

O DNA mitocondrial (DNAmt) também é utilizado como ferramenta para estudos populacionais com peixes neotropicais de água doce. Hilsdorf *et al.* (2002), através da ferramenta RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism* – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) estudou populações de *Brycon opalinus*, constatando alta diversidade haplotípica e a existência de diferenciação genética entre as populações.

Santos *et al.* (2007) sequenciou a região controle do DNAmt de populações de *Colossoma macropomum*, observando alta variabilidade em todas as populações amostradas e detectando a ausência de diferenciação genética entre estas. Iervolino (2008) encontrou resultados semelhantes (alta variabilidade genética e pan-mixia das populações) ao estudar populações de *Piaractus mesopotamicus*, também utilizando a ferramenta de sequenciamento da região controle do DNAmt.

Populações selvagens e de cativeiro de *Brycon opalinus* foram analisadas por Barroso *et al.* (2005) usando microssatélites, o mesmo marcador molecular utilizado no presente estudo, e encontraram alta variabilidade genética ($H=85,6\%$) em todas

as populações, que estariam estruturadas, sendo consideradas como diferentes unidades de manejo.

Suganuma *et al.* (2008), também utilizando microssatélites, não encontraram estruturação genética entre populações de *Piaractus mesopotamicus*. Pineda *et al.* (2006), com esses mesmos *primers* desenhados para *P. mesopotamicus*, avaliaram a variabilidade genética de *P. brachypomus*, encontrando 0,468 de variabilidade genética para as populações.

Morelli *et al.* (2007) analisou populações de *Prochilodus lineatus* com o uso combinado de microssatélites e de DNAm, encontrando alta variabilidade genética e baixa estruturação genética entre as populações. Já Carvalho-Costa *et al.* (2008) usando apenas microssatélites, não encontraram estruturação alguma estudando populações de uma espécie do mesmo gênero, *Prochilodus costatus*.

Populações de *Arapaima gigas* foram analisadas combinando microssatélites com DNAm (HRBEK *et al.*, 2007), sendo encontrado um pequeno efeito de isolamento por distância nos dados de microssatélites, mas não através dos dados de DNAm. Outro trabalho com a mesma espécie (HAMOY *et al.*, 2008) desenvolveu um painel de genotipagem *multiplex* para a espécie.

Benites (2008) e Pereira *et al.* (2008) avaliaram populações de *Pseudoplatystoma corruscans* utilizando *primers* microssatélites, encontrando estruturação altamente significativa entre as amostragens da Bacia do Paraná-Paraguai. Pereira *et al.* (2008) ainda indica um comportamento de *homing* para a espécie.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliação da diversidade genética intra e interpopulacional da espécie *Brycon hilarii* para o estabelecimento de estratégias de manejo sustentado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar a hipótese nula de pan-mixia entre amostragens provenientes de três sub-bacias (Rio Cuiabá, Rio Taquari e Rio Miranda) e o Rio Paraguai na Bacia do Alto Paraguai;
- Identificação de unidades de manejo para conservação;
- Propor estratégias de conservação das populações selvagens de acordo com os resultados obtidos pelo presente estudo.

3 MÉTODO

3.1 LOCAIS E DATAS DE COLETA

A obtenção de material dos indivíduos foi feita a partir do trabalho conjunto entre o Laboratório de Genética de Organismos Aquáticos e Aquicultura/ Núcleo Integrado de Biotecnologia/ UMC e a EMPRAPA Pantanal.

Foram coletados 204 animais de três Sub-bacias e do Rio Paraguai da Bacia do Alto Paraguai (Tabela 1, Figura 2), em diferentes datas entre 2000 e 2004. A súmula das coletas realizadas encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1. Informações sobre as coletas de piraputangas.

Bacia Hidrográfica	Local de coleta	Número de Animais Coletados	Data da coleta	Coordenadas
Sub-Bacia do Rio Cuiabá	Rio Cuiabá - Porto Cercado	40	Mar/jun/nov de 2002	16°42'41,50"S 56°28'11,10"O
	Rio Cuiabá - Parque Nacional	14	Jun/set de 2001	17°51'37,13"S 57°23'21,31"O
Rio Paraguai	Rio Paraguai	30	Set de 2004	18°57'44,40"S 57°25'54,10"O
Sub-Bacia do Rio Taquari	Rio Taquari - Palmeiras	40	Out/nov de 2000; Nov/dez de 2001	18°31'26,86"S 54°42'35,80"O
	Rio Taquari - Caronal	33	Ago/out de 2000; abr/jun/jul de 2001	18°16'20,00"S 55°30'56,85"O
Sub-Bacia do Rio Miranda	Rio Formoso	33	Out de 2000; Nov/dez de 2001	21°18'17,41"S 56°22'51,44"O
	Rio Miranda	14	2000 a 2002	21°5'53,00"S 56°13'53,00"O

3.2 PROCEDIMENTOS DE COLETA DE TECIDOS

A coleta de material biológico para a extração de DNA total foi realizada sem o sacrifício dos animais, segundo o protocolo descrito por Hilsdorf *et al.* (1999). Amostras de nadadeira caudal dos indivíduos foram cortadas e conservadas em álcool 95% a -20° para evitar a degradação do DNA.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

A extração de DNA total foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Taggart *et al.* (1992), modificado pelo uso de tampão STE (0,1M NaCl, 0,05 M Tris-HCl e 0,01 M EDTA dissódico, pH 8,0). Neste tampão a concentração de EDTA (Ácido etilenodiaminotetracético) foi diminuída, visto que este pode reagir com o MgCl₂ (Cloreto de Magnésio) e reduzir a eficiência das amplificações por PCR.

O tecido das nadadeiras conservado em etanol 95% foi picotado e hidratado em tampão TE (10,0 mM de Tris-HCl, 1,0 mM de EDTA, pH 7,5) durante 1h, com a troca do tampão a cada 20 minutos e as amostras foram agitadas durante esse tempo. Ao final deste tempo, todo o TE foi substituído por 500 µl de tampão STE (0,05 M Tris-HCl, 0,01M EDTA e 0,1M NaCl, 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. O material foi agitado vigorosamente, incubado a 65°C por 1h e agitado a cada 15 minutos. Após a incubação foi adicionado 5 µl de RNase A (USB) a 10 mg/ml às amostras, que foram incubadas a 37°C por mais 1h e novamente agitadas a cada 15 minutos.

O processo de separação do DNA total, dos restos celulares, foi feito com a adição de 400 µl de fenol equilibrado e 200 µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) e posterior centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos microtubos de 1,5 ml e uma segunda purificação foi feita, acrescentando a mesma quantidade de clorofórmio/álcool isoamílico que a coletada do sobrenadante e então uma nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 minutos foi

realizada. O sobrenadante novamente foi transferido para novos microtubos de 1,5 ml. A precipitação do DNA foi feita com a adição de etanol 100% a -20°C (etanol 100% 2:1 sobrenadante coletado) e 30 µl de acetato de sódio a 3,0 M (pH 5,2) ao sobrenadante.

As amostras foram armazenadas por 16 horas a -20°C e então centrifugadas a 4°C por 30 minutos, a 14.000 rpm, para a obtenção do DNA precipitado. A fase líquida foi desprezada e 500 µl de etanol 70% a -20°C foi acrescentado para lavagem das amostras, que foram então centrifugadas por um minuto a 14.000 rpm. Novamente, descartou-se o líquido, e o precipitado, após a sua secagem total, foi hidratado com 50µl de tampão TE, e armazenado a 4°C por 48 horas para a completa ressuspensão do DNA.

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 0,8% e coradas com brometo de etídeo para a verificação da qualidade do material extraído. A quantificação do material extraído foi verificada no espectrofotômetro de espectro completo Nanodrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

3.4 AVALIAÇÃO DO POLIMORFISMO DO MATERIAL GENÉTICO DOS ESTOQUES

Para avaliar o material genético das amostras, foram testados marcadores microssatélites (Tabela 2) desenhados para *Brycon hilarii* (SANCHES; GALETTI, 2006) e para *Brycon opalinus* e *Brycon cephalus* (BARROSO *et al.*, 2003).

Tabela 2. *Primers* testados, desenhados para as espécies *Brycon hilarii*, *Brycon opalinus* e *Brycon cephalus*.

Espécie	Loci	Sequência dos Primers	Repetição Microsatélite	Tamanho total (pb)
<i>Brycon hilarii</i>	Bh05	F - 5' CTT CCA CTC ATA CCG GCA CT 3' R - 5' ACA TCT GGC ATT AGG CAT AG 3'	(AC) ₁₃	204
	Bh06	F - 5' GCG TTG CGT GTG TAT 3GTT AA 3' R - 5' AGA GGT GTC CAC AAA GTT TT 3'	(GT) ₁₄	160
	Bh08	F - 5' CCA TGG CTC AAC ACA GAT AT 3' R - 5' TGT ACG AAT CCT GAA ATG CT 3'	(GAT) ₅	127
	Bh13	F - 5' AGC AAT TTA AGC AAG TGA AG 3' R - 5' GCG TCG GAG CAG TAG TTA TA 3'	(AT) ₇	120
	Bh15	F - 5' GAG AGC ATT GTC AGG ATT TA 3' R - 5' ACT AAT GAC TGC TAC TGC GG 3'	(ATTT) ₅	129
	Bh16	F - 5' CCT CCA ATG AAA ACA GTG CG 3' R - 5' ACG ACT TAG CCA CCC ACC CT 3'	(TAA) ₈	139
<i>Brycon opalinus</i>	BoM 1	F - 5' CCATCTCTACTTTTTGGTTCC 3' R - 5' TGCCAGATACAGCCC 3'	(CA) ₁₆	157
	BoM 2	F - 5' CTGGGCAGCGGAAGAG 3' R - 5' CCCACATCTCTCCCCTTCG 3'	(CA) ₄₅	210
	BoM 7	F - 5' CTCTGCCCCAGGTCTCACT 3' R - 5' CGGGAGTGACGAAATG 3'	(CA) ₃₁	208
	BoM 12	F - 5' GCAGCAGAAAGAAACAG 3' R - 5' CGGGGAGATTTCAACCT 3'	(GT) ₁₅	92
	BoM 13	F - 5' CATTTCCTCAGTCCTTTTCAGC 3' R - 5' CCCACTTAGGGTTCGCAC 3'	(CT) ₁₁	158
<i>Brycon cephalus</i>	BC48-6	F - 5' GGAGGACAGTGAGTGGACG 3' R - 5' GTTTGCTTGGACATCTGC 3'	(CA) ₂₅	137
	BC48-10	F - 5' GTTCCACCTATTGCTGACAC 3' R - 5' GAAAATACTACTCTACGGGGAC 3'	(CA) ₁₀	76

3.4.1 Genotipagem manual por gel de poliacrilamida

Os *primers* liofilizados (Invitrogen™ Life Technologies) foram ressuspensos em água dideionizada estéril a uma concentração de 1,0 µg/ µl para a solução de estoque. A solução de uso dos *primers* foi feita adicionando-se 20 µl do *primer forward* e 20 µl do *reverse* a 200 µl de água dideionizada estéril.

As ampliações dos microssatélites pela reação de polimerase em cadeia (Tabela 3) foram realizadas nos termocicladores PTC-100 e PTC-200 (MJ Research e Bio Rad). Testes de gradiente de temperatura entre 45°C e 65°C foram realizados para encontrar a temperatura de anelamento ideal para os *primers*. Testes de concentração de MgCl₂ entre 1,5mM e 3,0mM também foram feitos. Ambos os testes foram feitos com apenas uma amostra.

Tabela 3. Condições de amplificação dos microssatélites.

Etapas	Temperatura	Tempo
Denaturação Inicial	94°C	3 minutos
Denaturação	94°C	1 minuto
Anelamento	Variável	45 segundos
Extensão	72°C	1 minuto e 30 segundos
Recomeçar ciclo desde a denaturação	-	34 vezes
Extensão final	72°C	5 minutos

A visualização dos fragmentos amplificados foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida entre 7,5 e 10% (para 10%: 18,5 ml de H₂O MilliQ; 10 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) dependendo do *locus* estudado, corado em nitrato de prata (AgNO₃) (Synth) a 2g/L e revelado com solução de hidróxido de sódio (NaOH) (12g/L com 800µL de formaldeído). O tempo de corrida variou dependendo do tamanho do fragmento estudado. O tamanho dos fragmentos, em pares de base (pb), foi estimado por comparação com o marcador 10pb (Invitrogen) e com o marcador 100pb (Fermentas) utilizando o programa “*Alpha Index 6.5*” (AlphamagerTM: Alpha Inotech Corporation).

3.4.2 Genotipagem automática

Após a confirmação da amplificação dos *loci* em poliacrilamida, *primers forward* para a genotipagem automática dos *loci* microssatélites foram construídos seguindo metodologia de Schuelke (2000), acrescentando uma sequência de 18 nucleotídeos correspondentes ao *primer* universal M-13 (5' – TGT AAA ACG ACG GCC AGT – 3') antes da sequência do *primer forward*. Além desses, um *primer* universal M-13 marcado com uma fluorescência Cy5 também foi construído, para permitir a leitura dos fragmentos pelo sequenciador automático Alf Express II (GE Healthcare) utilizado.

Os *primers* foram diluídos segundo Schuelke (2000). O *primer forward* foi diluído a 0,04 pmol/μl, e os *primers reverse* e universal a 0,16 pmol/μl. As amplificações dos microssatélites foram conduzidas no termociclador PTC-100 (BioRad) e as condições modificadas para a inclusão do *primer* universal com fluorescência (Tabela 4). As reações possuíam um volume final de 3 μl, corridas com 3μl de corante próprio para sequenciadores automáticos (formamida 2:1 dextran blue) e 1μl de marcador interno 300pb (5 fmol/μl). A corrida foi realizada segundo recomendações do fabricante.

Tabela 4. Condições de amplificação para o sequenciador automático

Etapas	Temperatura	Tempo
Denaturação Inicial	94°C	5 minutos
Denaturação	94°C	30 segundos
Anelamento	Variável	45 segundos
Extensão	72°C	45 segundos
Recomeçar ciclo desde a denaturação	-	30 vezes
Denaturação	94°C	30 segundos
Anelamento	53°C	45 segundos
Extensão	72°C	45 segundos
Recomeçar ciclo desde a denaturação	-	8 vezes
Extensão final	72°C	10 minutos

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 50-500pb (5 fmol/ μ l) que gera uma escala entre 50 e 500 pb de 50 em 50pb.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

3.5.1 Diversidade genética intrapopulacional

A diversidade genética dentro das populações foi caracterizada pelo número de alelos por locus (A), riqueza alélica (Ar), heterozigosidade observada (H_o), diversidade gênica esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_e) e frequências alélicas, estimativas obtidas pelos programas ARLEQUIN v. 3.01 (EXCOFFIER *et al.*, 2006), GENEPOP SOFTWARE (RAYMOND; ROUSSET, 1995) e FSTAT 1.2 (GOUDET, 1995).

O déficit de heterozigosidade intrapopulacional (F_{IS}) foi calculado para avaliação do grau de endogamia em cada uma das populações, através do programa GENEPOP SOFTWARE (RAYMOND; ROUSSET, 1995). Também com o auxílio deste programa, foi obtido o valor de F_{IT} , que corresponde à endogamia total.

3.5.2 Diversidade genética entre populações

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 pan-mixia 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 F_{ST} (WRIGHT, 1965, segundo a metodologia de NEI, 1977), baseados no número de diferentes alelos entre pares de populações (WEIR; COCKERHAM, 1984; MICHALAKIS; EXCOFFIER, 1996) foram calculados pelo programa ARLEQUIN v. 2001 (SCHNEIDER *et al.*, 2001).

Uma estimativa análoga ao F_{ST} , o R_{ST} (SLATKIN, 1995) também foi calculada a partir do programa ARLEQUIN v. 2001 (SCHNEIDER *et al.*, 1997). Enquanto que os valores de F_{ST} derivam da variância das frequências alélicas e seguem o modelo mutacional de alelos infinitos, os valores de R_{ST} levam em consideração a variância dos tamanhos dos alelos, segundo o modelo mutacional *stepwise* (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002).

Um valor de F_{ST} global com uma probabilidade associada exata foi calculado pelo programa estatístico R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2004), utilizando o pacote HIERFSTAT (GOUDET, 2005) que implementa o algoritmo de Yang (YANG, 1998) e computa estimativas das estatísticas F de qualquer número de níveis hierárquicos.

O programa estatístico Structure v.2.2 (PRITCHARD *et al.*, 2000) 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. Assim sendo, o programa foi utilizado para identificar quantas populações existiriam na amostragem realizada, ao designar indivíduos semelhantes genotipicamente a um número K de populações.

O Nm (estimativa do fluxo gênico de acordo com WRIGHT, 1969) foi calculado pelo programa ARLEQUIN v. 2001 (SCHNEIDER *et al.*, 2001).

Também foi verificada a presença ou ausência de alelos nulos, com o programa Micro-Checker (OOSTERHOUT, 2004).

4 RESULTADOS

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE TECIDO DE NADADEIRA CAUDAL

O DNA total obtido das extrações estava íntegro, com alto peso molecular, para a maior parte das amostragens (Figura 4), exceto para alguns indivíduos da amostragem Cuiabá (Figura 5), cujo DNA mostrou certo grau de degradação, com um arraste indicando quebra do DNA e baixo peso molecular.

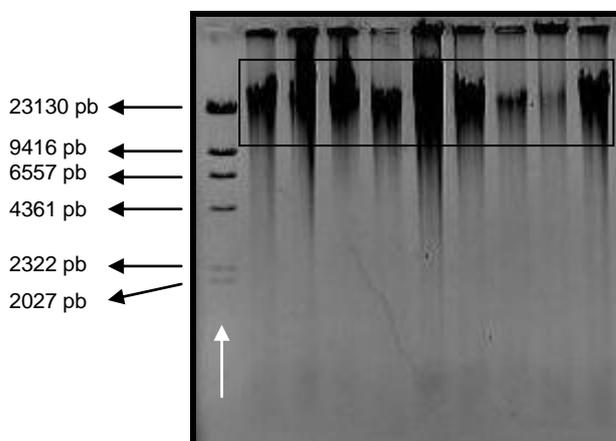


Figura 3. Gel de agarose da extração de DNA total de indivíduos da amostragem Paraguai. A seta branca indica o marcador λ Hind III. Em destaque estão as amostras com alto peso molecular.

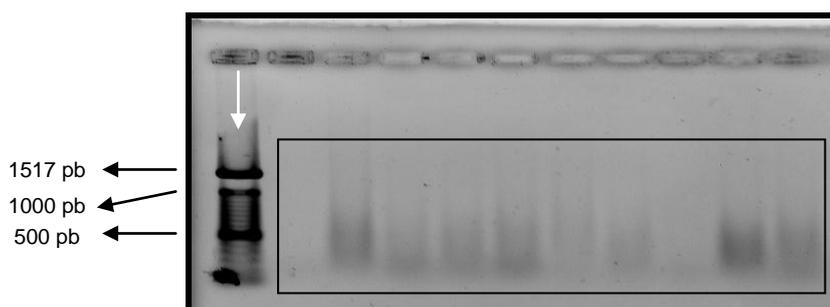


Figura 4. Gel de agarose da extração de DNA total de indivíduos da amostragem Cuiabá. A seta branca indica o marcador 100pb. Em destaque estão amostras com degradação do DNA.

A concentração de DNA total obtida foi adequada, entre 114,7 e 3124,9 ng/ μ L, com bons níveis de pureza, mostrados pelas razões entre os comprimentos de onda de 260/280 e 260/230 próximos a e/ou acima de 2,0; indicados pelo fabricante do espectrofotômetro como bons índices de pureza da amostra.

4.2 OTIMIZAÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO DOS MICROSSATÉLITES

Os *loci* Bh05, Bh08, Bh15, Bh16, BoM1 e BC48-10 foram escolhidos para as análises por apresentarem melhores resultados de amplificação, com bandas nítidas, na faixa esperada de tamanho e pouco *stutter* (bandas extras causadas por erros de amplificação da enzima *Taq* polimerase). O DNA foi diluído para atingir melhores resultados, como bandas mais finas, mais fáceis e confiáveis para genotipar. As condições de amplificação dos microssatélites foram determinadas em géis de poliacrilamida. As melhores temperaturas de anelamento para os *primers* variaram de 56°C a 60°C e a concentração ótima de MgCl₂ variou de 1,5mM a 2,5mM (Tabela 5). As mesmas condições foram utilizadas nas análises com o sequenciador automático.

Tabela 5. Condições de amplificação para os *loci*

<i>Loc</i>	Temperatura de anelamento	Concentração de MgCl ₂
Bh05	60°C	1,5mM
Bh08	58°C	2,5mM
Bh15	56°C	2,5mM
Bh16	58°C	2,0mM
BoM1	60°C	2,0mM
BC48-10	60°C	2,0mM

As amplificações dos *loci* BoM 1 e Bh16 foram visualizadas em poliacrilamida. Porém, a visualização em poliacrilamida das amplificações do *locus* Bh15, apresentou *stutters* que poderiam atrapalhar a genotipagem manual (Figura 6), então procedeu-se a análise deste *locus* no sequenciador automático para uma

melhor investigação de quais seriam as verdadeiras bandas correspondentes aos alelos dos microssatélites.

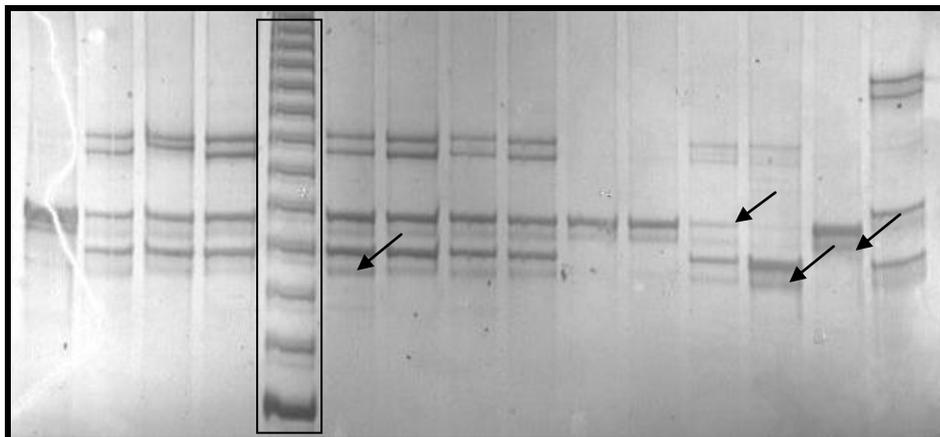


Figura 5. Fragmentos amplificados do *locus* Bh15. A seta mostra exemplos de bandas *stutter* a serem investigadas. Em destaque está o marcador 10pb, a banda inferior possui 100 pares de base.

A análise do *locus* Bh15 no sequenciador automático mostrou picos nítidos e distintos para as amostras duvidosas, revelando quais as bandas que deveriam ser consideradas na genotipagem como um alelo verdadeiro. Outro problema ocorreu na visualização em poliacrilamida do *locus* Bh8. Os alelos da maioria das amostras possuíam diferença de até 30pb, impossibilitando a visualização destes em uma mesma corrida, ocasionando a genotipagem errônea de diversas amostras heterozigotas, como homozigotas.

Assim sendo, após verificar que os resultados entre as duas metodologias, nos diferentes *loci* usados, corroboravam um ao outro, as análises restantes foram realizadas utilizando-se somente o sequenciador automático.

4.2.1 Genotipagem de todos os indivíduos para as quatro amostragens

A genotipagem dos indivíduos de todas as amostragens encontra-se no Apêndice A.

4.3 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

A partir da genotipagem dos géis de poliacrilamida foram encontrados 14 alelos para o *locus* BoM 1 (Tabela 6), 4 para o *locus* Bh16 (Tabela 7); a partir da genotipagem dos géis de poliacrilamida e genotipagem automática, 4 alelos para o *locus* Bh15 (Tabela 8); e a partir da genotipagem automática, 15 alelos para o *locus* Bh05 (Tabela 9), 21 alelos para o *locus* BC48-10 (Tabela 10), 17 alelos para o *locus* Bh08 (Tabela 11).

Tabela 6. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o *locus* BoM 1

Alelos	Tamanho total (pb)	Nº de repetições (CA)
01	165	11
02	167	12
03	169	13
04	171	14
05	173	15
06	175	16
07	177	17
08	179	18
09	181	19
10	183	20
11	185	21
12	187	22
13	189	23
14	191	24

Tabela 7. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o *locus* Bh16

Alelos	Tamanho total (pb)	Nº de repetições (TAA)
01	136	7
02	139	8
03	142	9
04	148	11

Tabela 8. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o *locus* Bh15

Alelos	Tamanho total (pb)	N° de repetições (ATTT)
01	125	4
02	129	5
03	137	7
04	141	8

Tabela 9. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o *locus* Bh05

Alelos	Tamanho total (pb)	N° de repetições (AC)
01	208	06
02	210	07
03	212	08
04	214	09
05	216	10
06	218	11
07	220	12
08	222	13
09	224	14
10	226	15
11	228	16
12	230	17
13	232	18
14	234	19
15	236	20

*número de repetições ajustado da genotipagem automática

Tabela 10. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o *locus* BC48-10

Alelos	Tamanho total (pb)	N° de repetições (CA)
01	54	01
02	56	02
03	58	03
04	60	04
05	62	05
06	64	06
07	66	07
08	68	08
09	72	10
10	74	11
11	76	12
12	78	13
13	80	14
14	82	15
15	84	16
16	86	17
17	88	18
18	90	19
19	92	20
20	94	21
21	96	22

*número de repetições ajustado da genotipagem automática

Tabela 11. Estimativa do tamanho de alelos encontrados e respectivo número de repetições para o *locus* Bh08

Alelos	Tamanho total (pb)	Nº de repetições (GAT)
01	138	03
02	141	04
03	144	05
04	147	06
05	150	07
06	153	08
07	156	09
08	159	10
09	162	11
10	195	22
11	198	23
12	201	24
13	204	25
14	207	26
15	210	27
16	213	28
17	216	29

*número de repetições ajustado da genotipagem automática

4.3.1 Diversidade alélica

Os seis *loci* microssatélites utilizados para a piraputanga foram polimórficos, sendo encontrados 75 alelos diferentes, contabilizando todas as amostragens avaliadas. O número total de alelos por *locus* (A) variou de 4 (Bh15 e Bh16) a 21 (BC48-10). Os valores de riqueza alélica, que corrige o número total de alelos considerando o tamanho amostral, foi de 2 (Bh15) a 14 (BC48-10). As médias de heterozigosidade observada (H_o) foram de 0,56 a 0,69 e as médias de heterozigosidade esperada (H_e) variaram entre 0,70 e 0,73. As médias do déficit de heterozigosidade intrapopulacional (F_{IS}), ou coeficiente de endogamia, foram positivas em todas as sub-bacias, com valores entre 0,034 e 0,205 (Tabela 12).

Tabela 12. Estatísticas para a diversidade genética: Número de alelos (A), riqueza alélica (A_R), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), coeficiente de endogamia (F_{IS})

Amostragem	Loci	A	Ar	Ho	He	P-value	F_{IS}
Sub-bacia do Rio Cuiabá	Bh05	12	10,15	0,83	0,86	0,04	0,026
	Bh08	11	9,02	0,74	0,72	0,15	-0,035
	Bh15	3	2,52	0,52	0,50	1,00	-0,035
	Bh16	3	3,00	0,51	0,47	0,62	-0,085
	BoM 1	8	7,91	0,98	0,84	0,00	-0,174
	BC48-10	12	11,45	0,54	0,89	0,00	0,394
	Todos <i>loci</i> (DP)	8,17 (4,26)	7,34 (3,74)	0,69 (0,19)	0,71 (0,19)		0,034
Rio Paraguai	Bh05	10	9,90	0,59	0,82	0,01	0,292
	Bh08	12	11,60	0,70	0,81	0,00	0,133
	Bh15	3	2,93	0,57	0,51	0,44	-0,105
	Bh16	3	3,00	0,27	0,35	0,07	0,231
	BoM 1	9	9,00	0,86	0,82	0,00	-0,056
	BC48-10	11	10,93	0,35	0,86	0,00	0,605
	Todos <i>loci</i> (DP)	8,00 (4,00)	7,89 (3,92)	0,56 (0,22)	0,70 (0,21)		0,205
Sub-bacia do Rio Taquari	Bh05	13	10,32	0,68	0,85	0,00	0,194
	Bh08	14	11,34	0,75	0,83	0,00	0,097
	Bh15	4	3,26	0,49	0,48	0,96	-0,005
	Bh16	4	3,63	0,40	0,41	0,28	0,023
	BoM 1	13	11,80	0,91	0,89	0,00	-0,019
	BC48-10	16	12,95	0,70	0,90	0,00	0,225
	Todos <i>loci</i> (DP)	10,67 (5,28)	8,88 (4,30)	0,66 (0,18)	0,73 (0,22)		0,100
Sub-bacia do Rio Miranda	Bh05	9	8,29	0,77	0,83	0,00	0,073
	Bh08	12	9,95	0,64	0,85	0,00	0,250
	Bh15	2	2,00	0,47	0,48	1,00	0,020
	Bh16	3	3,00	0,51	0,45	0,21	-0,134
	BoM 1	10	9,39	0,88	0,86	0,00	-0,022
	BC48-10	14	14,00	0,63	0,91	0,00	0,334
	Todos <i>loci</i> (DP)	8,33 (4,84)	7,77 (4,53)	0,65 (0,15)	0,73 (0,21)		0,116

Após a estimativa do tamanho dos alelos para cada *locus*, foi obtido o número de alelos totais e exclusivos para cada amostragem (Tabela 13). Dentre as amostragens, a de Taquari apresentou o maior número de alelos totais (64) e também o maior número de alelos exclusivos, sendo esta a amostragem com maior número de animais analisados.

Tabela 13. Número de alelos encontrados para cada amostragem

Amostragens	Amostragem Total (204)	Número Total de Alelos	Alelos exclusivos encontrados
Cuiabá	54	49	4
Paraguai	30	48	2
Taquari	73	64	10
Miranda	47	50	2

4.3.2 Estimativas das frequências alélicas para os seis *loci* microssatélites

As frequências alélicas calculadas para os 6 *loci* microssatélites e para todas as amostragens avaliadas, estão descritas nas Tabelas 14 a 22. A maior frequência alélica encontrada foi de 0,800, para o *locus* Bh16. As frequências alélicas para os alelos exclusivos variou de 0,007 (*locus* Bh08) a 0,067 (*locus* BC 48-10).

Tabela 14. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Bh05 para todas as amostragens. As frequências para os alelos privativos estão sublinhadas.

Alelos	Amostragens			
	Cuiabá	Paraguai	Taquari	Miranda
01	<u>0,011</u>	0,000	0,000	0,000
02	0,011	0,034	0,009	0,000
03	0,011	0,000	0,009	0,000
04	0,000	0,017	0,018	0,000
05	0,032	0,000	0,009	0,000
06	0,213	0,207	0,193	0,174
07	0,191	0,103	0,202	0,209
08	0,053	0,017	0,061	0,023
09	0,011	0,000	0,018	0,023
10	0,021	0,000	0,000	0,012
11	0,170	0,207	0,096	0,105
12	0,181	0,293	0,228	0,256
13	0,096	0,069	0,123	0,174
14	0,000	0,034	0,026	0,023

Tabela 15. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Bh08 para todas as amostragens. As frequências para os alelos privativos estão sublinhadas.

Alelos	Amostragens			
	Cuiabá	Paraguai	Taquari	Miranda
01	0,000	0,000	<u>0,007</u>	0,000
02	0,000	0,000	<u>0,007</u>	0,000
03	0,000	0,017	0,000	0,011
04	0,009	0,000	0,028	0,128
05	0,009	0,017	0,014	0,011
06	0,481	0,350	0,282	0,245
07	0,046	0,033	0,049	0,085
08	0,037	0,017	0,035	0,011
09	0,019	0,000	0,014	0,011
10	0,009	0,017	0,021	0,000
11	0,000	<u>0,017</u>	0,000	0,000
12	0,000	<u>0,017</u>	0,000	0,000
13	0,019	0,117	0,049	0,043
14	0,111	0,100	0,169	0,191
15	0,065	0,067	0,056	0,074
16	0,194	0,233	0,246	0,181
17	0,000	0,000	0,021	0,011

Tabela 16. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Bh15 para todas as amostragens. As frequências para os alelos privados estão sublinhadas.

Alelos	Amostragens			
	Cuiabá	Paraguai	Taquari	Miranda
01	0,000	0,000	<u>0,014</u>	0,000
02	0,417	0,417	0,333	0,383
03	0,574	0,567	0,639	0,617
04	0,009	0,017	0,014	0,000

Tabela 17. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* Bh16 para todas as amostragens. As frequências para os alelos privados estão sublinhadas.

Alelos	Amostragens			
	Cuiabá	Paraguai	Taquari	Miranda
01	0,123	0,083	0,118	0,081
02	0,698	0,800	0,750	0,709
03	0,179	0,117	0,118	0,209
04	0,000	0,000	<u>0,014</u>	0,000

Tabela 18. Estimativas das frequências alélicas encontradas para o *locus* BoM1 para todas as amostragens. As frequências para os alelos privados estão sublinhadas.

Alelos	Amostragens			
	Cuiabá	Paraguai	Taquari	Miranda
01	0,000	0,034	0,007	0,000
02	0,000	0,000	<u>0,045</u>	0,000
03	0,085	0,103	0,119	0,075
04	0,213	0,328	0,157	0,225
05	0,128	0,138	0,142	0,163
06	0,277	0,224	0,164	0,213
07	0,128	0,034	0,090	0,125
08	0,096	0,069	0,097	0,075
09	0,032	0,034	0,060	0,050
10	0,043	0,034	0,037	0,050
11	0,000	0,000	0,037	0,013
12	0,000	0,000	<u>0,030</u>	0,000
13	0,000	0,000	<u>0,015</u>	0,000
14	0,000	0,000	0,000	<u>0,013</u>

Tabela 19. Estimativas das frequências alélicas encontradas para *locus* BC48-10 para todas as amostragens. As frequências para os alelos privativos estão sublinhadas.

Alelos	Amostragens			
	Cuiabá	Paraguai	Taquari	Miranda
01	<u>0,019</u>	0,000	0,000	0,000
02	<u>0,029</u>	0,000	0,000	0,000
03	0,000	0,069	0,008	0,107
04	0,038	0,017	0,195	0,054
05	0,000	0,000	0,102	0,071
06	0,000	0,000	0,042	0,018
07	0,000	0,000	<u>0,051</u>	0,000
08	0,000	0,000	<u>0,017</u>	0,000
09	0,000	0,000	<u>0,008</u>	0,000
10	0,000	0,103	0,008	0,071
11	0,029	0,190	0,000	0,036
12	0,154	0,086	0,008	0,000
13	0,183	0,276	0,093	0,161
14	0,096	0,086	0,119	0,196
15	0,029	0,034	0,034	0,036
16	<u>0,067</u>	0,000	0,000	0,000
17	0,135	0,052	0,051	0,018
18	0,163	0,069	0,110	0,107
19	0,058	0,017	0,144	0,054
20	0,000	0,000	0,008	0,054
21	0,000	0,000	0,000	<u>0,018</u>

4.3.3 Médias das diversidades gênicas dentro de cada amostragem

Na Tabela 20 são apresentadas as médias das diversidades gênicas para todas as amostragens. Estas medidas equivalem à heterozigosidade esperada para dados diplóides e são definidas como a probabilidade de que dois haplótipos escolhidos ao acaso sejam diferentes na amostragem (NEI, 1987).

Tabela 20. Médias das diversidades gênicas dentro de cada amostragem

Amostragens	Médias da Diversidade Gênica
Cuiabá	0,622620 +/- 0,375011
Paraguai	0,667232 +/- 0,375094
Taquari	0,550811 +/- 0,361117
Miranda	0,664150 +/- 0,461774

4.3.4 Análise de alelos nulos

Segundo análises realizadas com o programa Microchecker, alelos nulos podem estar presentes em quase todas as amostragens do *locus* BC48-10, exceto para a amostragem do Rio Taquari – Caronal e também nas amostragens do Paraguai e do Rio Taquari – Caronal para o *locus* Bh5.

4.4 DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA ENTRE AS AMOSTRAGENS

4.4.1 Análise de Variância Molecular (AMOVA)

A avaliação da estrutura genética dentro e entre as amostragens da piraputanga foi estimada pela Análise de Variância Molecular (AMOVA – *Analysis of MOlecular VAriance*). Duas hierarquizações foram realizadas, uma considerando as sete amostragens como cada uma sendo uma população (Tabela 21) e outra considerando cada Sub-bacia com suas respectivas amostragens como sendo uma população (Tabela 22). Em ambas, a maior parte da variância encontra-se dentro dos indivíduos, indicando que existe pouca variância entre as populações ou entre as sub-bacias.

Tabela 21. AMOVA considerando todas as amostragens em um mesmo grupo.

Causas da variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variância	P-value
Entre populações	6	8,258	0,00922	1,10	0,29619+- 0,01452
Entre indivíduos dentro das populações	197	167,381	0,01796	2,14	0,24829+- 0,01260
Dentro dos indivíduos	204	166,000	0,81373	96,77	0,15738+- 0,00937
Total	407	341,640	0,84091	100	

Tabela 22. AMOVA considerando quatro grupos de sub-bacias com suas respectivas populações.

Causas da variação	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variância	P-value
Entre grupos	3	4,066	-0,00174	-0,21	0,36852+- 0,01663
Entre populações dentro dos grupos	3	4,192	0,01073	1,28	0,03617+- 0,00603
Entre indivíduos dentro das populações	197	167,381	0,01796	2,14	0,24340+- 0,01292
Dentro dos indivíduos	204	166,000	0,81373	96,79	0,17009+- 0,01214
Total	407	180,429	0,84068	100	

4.4.2 Valores de diferenciação genética F_{ST} e R_{ST}

Os valores de F_{ST} gerados pelo pacote estatístico Hierfstat (Tabela 23) foram considerados significativamente não diferentes de zero, com um valor P associado exato de 0,227.

Tabela 23. Valores de F_{ST}

Nível de hierarquização	F_{ST}
F pop/tot	0,027
F Ind/tot	0,201
F Ind/pop	0,179

Os valores de Φ_{ST} baseados no método de distância pelo número de alelos diferentes encontram-se na tabela 24.

Tabela 24. Diferenciação genética entre pares de populações utilizando o índice Φ_{ST} . Acima da diagonal encontram-se os valores de P e abaixo os valores de Φ_{ST}

	Rio Cuiabá	Rio Paraguai	Rio Taquari	Rio Miranda
Rio Cuiabá	-	0,31532+-0,0455	0,03604+-0,0201	0,03604+-0,0201
Rio Paraguai	0,00153	-	0,54955+-0,0478	0,16216+-0,0326
Rio Taquari	0,01192	-0,00167	-	0,34234+-0,0264
Rio Miranda	0,01387	0,00747	0,00068	-

Os valores de R_{ST} entre as populações, calculados a partir da média dos componentes de variância, podem ser observados na Tabela 25. Enquanto que as estimativas de F_{ST} utilizam as frequências alélicas como dados de entrada, as medidas de R_{ST} (SLATKIN, 1995) levam em consideração ambos as frequências alélicas e o número de repetições em cada alelo.

Tabela 25. Diferenciação genética entre pares de populações utilizando o índice R_{ST} . Acima diagonal encontram-se os valores de P e abaixo os valores de R_{ST}

	Rio Cuiabá	Rio Paraguai	Rio Taquari	Rio Miranda
Rio Cuiabá	-	0,01802+-0,0121	0,00000+-0,0000	0,19820+-0,0402
Rio Paraguai	0,02941	-	0,81982+-0,0214	0,45045+-0,0489
Rio Taquari	0,03905	-0,01148	-	0,38739+-0,0526
Rio Miranda	0,00347	-0,00597	0,00039	-

4.4.3 Análise de estruturação populacional

O número de populações mais provável encontrado para as amostragens foi um ($K=1$) (Figura 7), o K com menor desvio padrão dentre os K assumidos pela análise (entre 1 e 14). A representação gráfica da estrutura populacional resultante da análise bayesiana (Figura 8) mostra que não houve a divisão das populações, ilustrado pela ausência de divisão vertical das cores, que representaria os diferentes K assumidos pela análise.

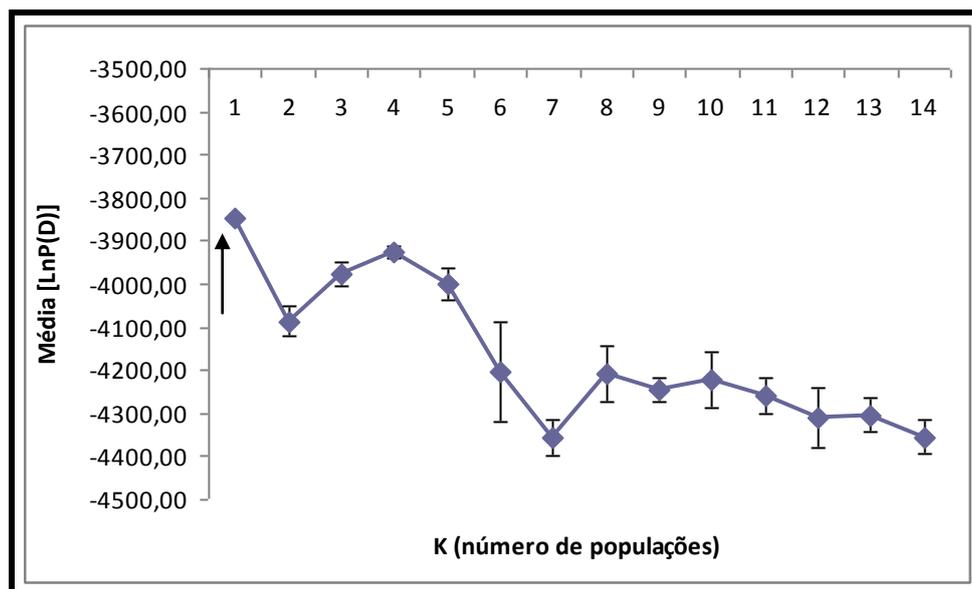


Figura 6. Valores de K para o conjunto de dados das sete amostragens. A seta indica o valor de K com o menor desvio padrão.

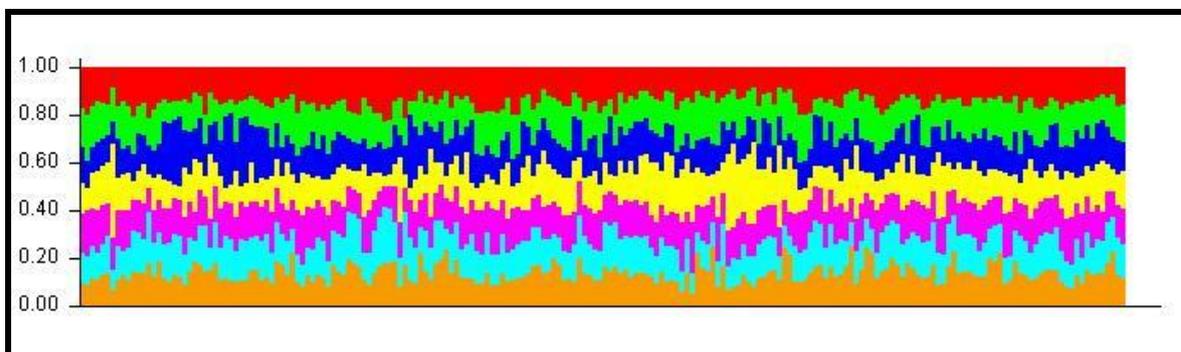


Figura 7. Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para cada população, representada por cada cor.

O valor de ΔK foi também calculado para indicar com melhor precisão o número de populações certo para as amostragens (Figura 9), como indica Evanno *et al.* (2005), reafirmando que o valor de K mais provável para os dados do presente estudo realmente é 1, ou seja, que as amostragens de *Brycon hilarii* não possuem nenhum grau de estruturação genética.

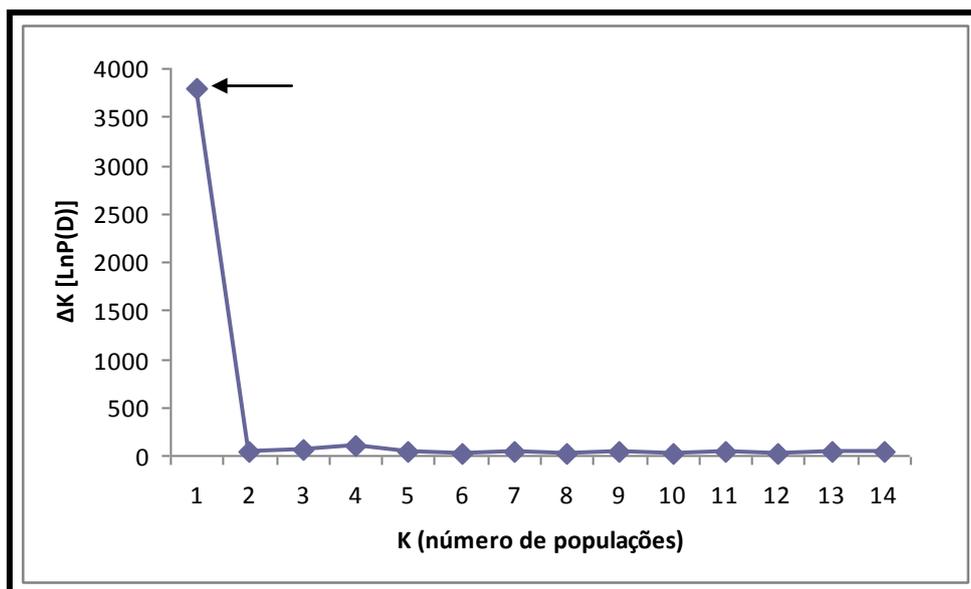


Figura 8. Valores de ΔK para o conjunto de dados das sete amostragens. A seta indica o valor de K com o maior ΔK calculado.

O *bar plot* resultante da segunda análise, com o K pré-determinado como 1, para confirmar a análise anterior, mostra todos os indivíduos alocados em uma única população (Figura 10).

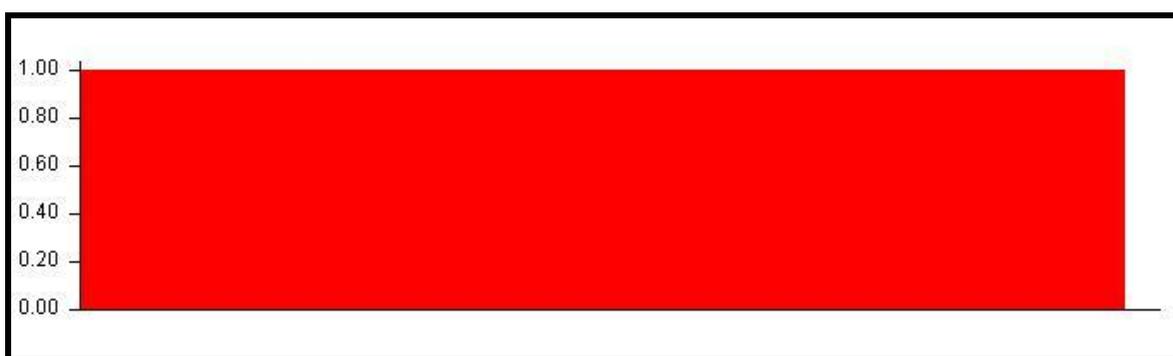


Figura 9. Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para uma única população.

4.4.4 Valores de Nm entre as amostragens

O valor de número de migrantes (Nm), calculado utilizando-se as frequências alélicas dos alelos exclusivos, após a correção do número amostral, foi de 5,68.

5 DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL DE TECIDO DE NADADEIRA CAUDAL

O DNA total obtido foi satisfatório para a amplificação dos *loci* microssatélites. Apesar de algumas amostras possuírem certo grau de degradação, a amplificação destas amostras foi possível, provavelmente pelo fato do marcador possuir um baixo peso molecular, o qual não ultrapassa poucas centenas de pares de bases (BECKMANN; WEBER, 1992).

A concentração de DNA foi um fator importante para a amplificação dos alelos. Concentrações entre 5 e 10 ng/ μ L de reação apresentaram melhores resultados. Outros trabalhos com peixes neotropicais de água doce utilizaram concentrações de DNA com valores próximos ou iguais (BARROSO *et al.*, 2003; SANCHES; GALETTI, 2006; PINEDA *et al.*, 2006).

5.2 TESTES DE OTIMIZAÇÃO DOS PRIMERS E ELETROFORESE

O padrão de corrida em microssatélites com repetições dinucleotídicas é de difícil análise, mesmo em géis de considerável resolução, como os de poliacrilamida. Uma característica bastante comum observada nestes géis, é a presença de bandas extras ou sombras (NAISH; SKIBINSKI, 1998). Dos 13 *loci* testados, apenas 6 foram considerados para a análise, já que os *loci* que possuíam muitas bandas extras foram descartados. Os alelos válidos para a análise foram identificados pela maior intensidade da banda no gel (TAUTZ, 1989), como confirmou a genotipagem automática, onde apenas picos estreitos e altos foram considerados como alelos

válidos (FERNANDO *et al.*, 2003), e estes eram correspondentes em tamanho a bandas com maior intensidade.

5.3 DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAPOPULACIONAL

Um total de 75 alelos diferentes foram encontrados na avaliação dos 6 *loci* microssatélites. A amostragem de Taquari apresentou o maior número de alelos encontrados (64), enquanto que as amostragens de Cuiabá, Paraguai e Miranda apresentaram um número parecido de alelos (entre 48 e 50). O média do número de alelos encontrado para cada população variou entre 8 e 10,67 com respectivos desvios padrão de 4 a 5,28. Os valores de riqueza alélica não variaram em relação ao número de alelos, tendo médias entre 7,34 e 8,88 e desvios padrões de 3,74 a 4,30 respectivamente.

Considerando que os microssatélites são uma classe de marcadores moleculares com uma excepcional alta taxa de mutação (JEFFREYS *et al.*, 1988), amostragens maiores revelariam a variação de alelos que realmente correspondem àquela presente na população, assim como amostragens pequenas podem não mostrar toda a variabilidade alélica presente na população natural (BEAUMONT; HOARE, 1988; FERGUSON; DANZMANN, 1998; HILSDORF *et al.*, 2006). Para trabalhos com marcadores microssatélites, um tamanho amostral ideal não deveria ser menor do que 50 indivíduos (FERGUSON; DANZMANN, 1998) o que explicaria os menores números de alelos encontrados para as amostragens com número amostral menor ou próximo a 50.

A média do número de alelos encontrados por *locus* foi 12,5, acima do observado para peixes de água doce (DEWOODY; AVISE, 2000). Matsumoto (2005) encontrou uma média de 7,6 alelos por *locus* para *Brycon insignis*, utilizando 2 *loci* também presentes neste trabalho (BoM1 e BC48-10). Barroso *et al.* (2005) encontrou 23,1 alelos por *locus* para *Brycon opalinus*, utilizando o *locus* BoM1, também usado neste trabalho, para o qual encontrou 18 alelos, 4 a mais que no presente trabalho. Calcagnotto *et al.* (2001) encontrou uma média de 6,5 alelos para *Piaractus mesopotamicus*, Wilson *et al.* (2004) encontrou uma média de 5,1 alelos

para *Salvelinus fontinalis* e para *Mystus nemurus*, Usmani (2003) encontrou uma média de 6,3 alelos por *locus*. Benites (2008) encontrou uma média de 17 alelos para *Pseudoplatystoma corruscans*, próximo ao encontrado para a mesma espécie (15,3) por Pereira *et al.* (2008).

O *locus* dinucleotídeo BC48-10 foi o que apresentou o maior número de alelos (21), enquanto que os *loci* Bh15 (tetranucleotídico) e Bh16 (trinucleotídico) apresentaram o menor número de alelos, apenas 4. Microssatélites com mais repetições tendem a ser mais polimórficos, assim como microssatélites puros e di- ou trinucleotídicos. Microssatélites tetranucleotídicos também são considerados altamente polimórficos, mas menos que os di- ou trinucleotídicos puros (JARNE; LAGODA, 1996). Isso explicaria o porquê da maior diversidade alélica encontrada para os *loci* Bh05, Bh06, Bh08 e BC48-10 em relação aos *loci* Bh15 e Bh16. Apesar de este último ser também trinucleotídico, ele possui um tamanho menor que o *locus* trinucleotídico Bh08, explicando a diferença na diversidade alélica encontrada.

A heterozigosidade observada variou de 0,27 para o *locus* Bh16, na amostragem do Rio Paraguai, a 0,98 para o *locus* BoM1, na amostragem do Rio Cuiabá. Os valores de heterozigosidade observada não desviam significativamente dos valores de heterozigosidade esperada segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg somente para os *loci* Bh15 e Bh16 em todas as amostragens e para o *locus* Bh08 na amostragem do Rio Cuiabá.

Os valores de F_{IS} representam uma medida do desvio das frequências genotípicas em relação às frequências pan-míticas, expressas em termos de deficiência ou excesso de heterozigotos, e que também podem ser interpretados como coeficiente de endogamia (f) (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002; KELLER; WALLER, 2002). Exceto para os *loci* Bh15, Bh16 e BoM1, o F_{IS} encontrado foi positivo, indicando uma deficiência de heterozigotos. Normalmente, este valor seria um indicativo de que a endogamia nas populações estudadas ocorre com mais frequência do que o esperado ao acaso, mas a alta riqueza alélica encontrada justamente nos *loci* com o coeficiente de endogamia positivo contradiz isso.

Valores baixos de heterozigosidade observada podem ser oriundos de diversas causas, como seleção, endogamia, migração ou alelos nulos (BEAUMONT; HOARE, 1988). Considerando que microssatélites são regiões não codificadoras do DNA, a causa seleção pode ser excluída, já que esta ocorre sobre genes expressos. A migração causa um excesso de homozigotos para todos os *loci* estudados

(BEAUMONT; HOARE, 1988), o que não é o caso do estudo em questão. Uma das explicações para o déficit de heterozigotos pode ser dada pela presença de alelos nulos (BALL *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2001). Estes alelos não são detectáveis em *loci* microssatélites, e podem ser causados por polimorfismos no sítio de ligação com o *primer* (O'REILLY; WRIGHT, 1995) resultando na não amplificação do produto de PCR, acarretando na leitura de um indivíduo heterozigoto como um homozigoto (BEAUMONT; HOARE, 1988).

Uma análise realizada pelo programa Microchecker (OOSTERHOUT *et al.*, 2004) indicou que alelos nulos podem estar presentes no *locus* BC48-10 para todas as amostragens, exceto para a amostragem do Rio Taquari – Caronal e no *locus* Bh5 para as amostragens do Paraguai e do Rio Taquari – Caronal.

A distribuição dos alelos nas amostragens não foi uniforme, com a presença de alelos exclusivos em todos os *loci* e para todas as amostragens. O *locus* BC48-10 apresentou 7 alelos exclusivos, os *loci* Bh08 e BoM1 apresentaram 4, enquanto que os *loci* Bh05, Bh15 e Bh16 apresentaram apenas 1 alelo único. A amostragem Taquari foi a que mais apresentou alelos únicos (10) e a que menos apresentou foi Miranda e Paraguai, com apenas 2 alelos. Alelos únicos reforçam a característica de dispersão restrita em espécies de água doce (SALGUEIRO *et al.*, 2003), mas também são reflexo do tamanho amostral, amostragens maiores teriam mais alelos privativos que amostragens pequenas (KALINOWSKI, 2004) e justamente na amostragem maior foi encontrado o maior número de alelos únicos.

O maior valor de diversidade gênica ($H_e=0,91$) foi encontrado no *locus* BC48-10, *locus* que também apresentou o maior número de alelos e riqueza alélica. Altos níveis de diversidade genética parecem ser comumente observados em peixes migratórios com grandes populações pan-miticas. Isto porque o grande tamanho efetivo da população e o alto padrão de migração minimizam o efeito de deriva gênica como uma força que reduziria a diversidade genética intrapopulacional (SANTOS *et al.*, 2007).

Os valores de diversidade gênica, ou seja, a probabilidade de que dois genótipos escolhidos ao acaso sejam diferentes numa determinada população (NEI, 1987), ficaram entre 0,55 e 0,67, apesar dos valores de heterozigosidade esperada chegarem a 0,91, provavelmente devido ao H_e dos *loci* Bh15 e Bh16 serem baixos, devido ao número baixo de alelos encontrados e segundo Xu *et al.* (2001), nem

sempre altos valores de heterozigosidade representam altos valores de diversidade genética entre as populações.

Segundo Frankham *et al.* (2008), a diversidade genética pode ser descrita usando polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica. Enquanto que a perda da variabilidade genética tem sido associada à redução na heterozigosidade (ALLENDORF; PHELPS, 1980; VUORINEN, 1984), outros estudos salientam que a diversidade alélica e a presença de alelos de baixa frequência (RYMAN *et al.*, 1995) podem representar uma medida mais sensível da saúde da população (WAPLES *et al.*, 1990; TESSIER *et al.*, 1997).

Segundo Santos *et al.* (2007) altos níveis de diversidade genética são comumente observados em peixes migradores com grandes populações pan-míticas. Isto ocorreria porque o grande tamanho efetivo da população e altas taxas de migração minimizam o efeito da deriva genética como uma força que diminui a diversidade genética intrapopulacional.

5.4 DIVERSIDADE GENÉTICA INTERPOPULACIONAL

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) demonstrou que a variabilidade genética encontra-se totalmente dentro dos indivíduos na análise considerando um grupo com 7 populações. Para a análise considerando as quatro Sub-bacias como 4 grupos e as amostragens dentro de cada bacia como populações, 98,93% da variabilidade encontra-se dentro das populações e 1,28 % entre as populações dentro de cada bacia. Para qualquer uma das amostragens, não existe variação significativa entre os maiores agrupamentos, indicando que não existe diferenciação genética entre as amostragens.

A variabilidade genética entre diferentes populações e também entre os indivíduos de uma mesma população é essencial para adaptação às mudanças ambientais. A maior parte das populações naturais é caracterizada por elevados níveis de variação genética (SOLÉ-CAVA, 2001).

De acordo com Avise *et al.* (1988) uma população é pan-mítica quando o nível de diversidade genética é proporcional ao tamanho efetivo da população e a

taxa de mutação, assumindo uma constância dos dois ao longo do tempo. O tamanho efetivo de uma população é o tamanho de uma população idealizada que perderia diversidade genética na mesma taxa da população atual (FRANKHAM *et al.*, 2002).

Os índices de fixação (Φ_{ST}) foram todos não significativamente diferentes de zero ($P=0,227$), indicando, de acordo com Wright (1978), que as amostragens encontram-se em pan-mixia. Isto é, a análise dos seis *loci* mostrou que não existe qualquer estruturação genética entre as populações estudadas. Os valores par a par entre as populações ficaram entre -0,00167 e 0,01387, sendo significativamente diferentes de zero ($P<0,05$) apenas a amostragem do Rio Cuiabá em relação ao Rio Miranda e Rio Taquari, com valores menores que 0,05, indicativos de uma pequena estruturação populacional.

A ausência de estruturação pode ser explicada pela característica migradora da espécie, embora Sanches (2002), com o uso de RAPD como marcador molecular, tenha encontrado populações estruturadas de piraputanga na região da sub-bacia do Rio Miranda.

O R_{ST} é um valor análogo ao Φ_{ST} mas utiliza como base para o cálculo o número de repetições entre os alelos, pelo modelo de SMM (stepwise mutation model), onde se considera mais próximos evolutivamente alelos de tamanhos parecidos (BALLOUX; LUGON-MOULIN, 2002). Os valores de R_{ST} ficaram entre -0,01148 e 0,03905 sendo significativamente diferentes de zero ($P<0,05$) apenas a amostragem do Rio Cuiabá em relação ao Rio Miranda e Rio Paraguai, com valores menores que 0,05, indicativos de uma pequena estruturação populacional, apesar do F_{ST} global encontrado pelo programa Hierfstat ser significativamente não diferente de zero.

Por não necessitar de informações prévias sobre a estruturação populacional ao utilizar um método Bayesiano de análise, o programa Structure é uma ferramenta que funciona muito bem para inferir o número de populações quando existe a ocorrência de pequenas estruturações ($F_{ST} < 0.03$; LATCH *et al.*, 2006), como as que poderiam estar ocorrendo com as populações analisadas.

A análise testou a existência de 1 a 14 populações e indicou que todos os indivíduos estariam designados a apenas uma população, já que o $K=1$ foi o que apresentou o $\ln(\text{PD})$ menor (-3845,88) e com menor desvio padrão (0,38), além do ΔK ter tido o maior valor (3803,84). Ou seja, as amostragens não diferem entre si,

dado que corroboraria o encontrado com a análise AMOVA e o F_{ST} global. Outros autores utilizaram a mesma ferramenta para estudar a estrutura populacional de outros peixes do Pantanal, como Sukanuma (2008), que encontrou o mesmo resultado ($K=1$) ao estudar populações de pacu e Benites (2008), que por outro lado, encontrou uma alta estruturação ($K=11$) para populações de pintado. Populações de salmonídeos também foram analisadas pelo software Structure, sendo encontrada estruturação para amostragens de *Salmo salar* ($K=3$) da Suécia (NILSSON *et al.*, 2008) e da França ($K= 5$) (GRANDJEAN *et al.*, 2009) e de *Salmo trutta* ($K= 2$) (NILSSON *et al.*, 2008).

Um dos problemas na análise da estrutura populacional é a estimativa da quantidade de fluxo gênico, que é o determinante mais importante da estrutura populacional. Se um fluxo gênico entre as populações vizinhas é baixo, cada população evolui de forma quase independente. Assim, a alta diferenciação entre as populações é esperada quando há um fluxo gênico baixo ($Nm < 1$), enquanto um fluxo gênico alto ($Nm > 1$) é o suficiente para impedir uma diferenciação substancial devido à deriva e seleção natural (SLATKIN, 1985). Segundo Kimura e Maruyama (1971) quando a estimativa de Nm assumir valores maiores que 4 as populações pan-míticas podem ser consideradas como uma única unidade populacional, quando Nm for menor que 1 as populações podem ser consideradas diferenciadas.

O valor de Nm encontrado foi 5,68, indicando mais uma vez que as populações de piraputanga podem ser consideradas como uma única unidade populacional. Iervolino (2008) encontrou resultados similares ($Nm>5,8$) com populações de pacu da Bacia do Alto Pantanal.

5.5 AUSÊNCIA DE ESTRUTURAÇÃO DA PIRAPUTANGA RELACIONADA A HIDROGRAFIA PANTANEIRA E REPRODUÇÃO DA ESPÉCIE

A avaliação da estrutura genética de uma espécie distribuída em uma bacia pode determinar a intensidade com que o fluxo gênico vem ocorrendo entre suas populações. Um fluxo gênico limitado, aliado à pesca predatória, limita a

recuperação genética da população por migração, ocorrendo o colapso da pesca no local (HILSDORF *et al.*, 2006). Para a piraputanga, foi observada a ocorrência de fluxo gênico entre as populações, de acordo com os dados de Φ_{ST} , F_{ST} , R_{ST} , Nm e ΔK que mostram pouca ou nenhuma estruturação genética entre as populações, embora os ecossistemas de água doce, como é o caso, sejam mais propícios às formações geológicas que impeçam o fluxo gênico (WAPLES, 1998; HILSDORF *et al.*, 2006).

São muitos os relatos de estruturação ou diferenciação populacional dentro de um único sistema hidrográfico relacionadas com fatores ambientais, biológicos, ou antropogênicos (HASSANIEN *et al.*, 2004). Provavelmente isso não ocorra com as populações da piraputanga devido ao ecossistema onde estão inseridas, cuja hidrografia propicia o fluxo gênico.

A característica mais proeminente do Pantanal é o regime anual de inundação (PONCE, 1995). A inundação anual é causada pela falta de um gradiente preciso entre os rios e a planície inundável. Quando o fluxo dos rios aumenta na estação chuvosa, os rios na planície inundável são incapazes de transmitir o volume aumentado de água, transbordando a planície e inundando porções extensas da bacia do Pantanal (CARVALHO, 1986), formando uma rede de lagoas, baías e baixadas alagadas interligadas por cursos d'água perenes (corixos) ou efêmeros (vazantes; POR *et al.*, 1997).

O comportamento reprodutivo constitui um fator decisivo para a subdivisão populacional da espécie (HASSANIEN *et al.*, 2004). A mobilidade constitui um fator importante quando se tratando da estrutura genético-populacional, já que espécies que apresentam grande mobilidade, como peixes migradores e aves, exibem níveis de estruturação populacional menos complexos (WARD *et al.*, 1992). Um grande percentual das espécies de peixes pantaneiros é considerado como sendo de piracema. Após um período de seca, os peixes migram para os corpos de água maiores; iniciam assim vários deslocamentos, primeiro das áreas alagadas para os rios e depois rio acima (AGOSTINHO *et al.*, 2003). Bittencourt e Cox-fernandes (1990) afirmaram que a migração é uma adaptação dos peixes às condições adversas decorrentes do pulso de inundação da água, aproveitando a abundante fonte de alimentos disponível sazonalmente em diferentes locais. Os peixes migradores usam diferentes habitats para alimentação, abrigo e para reprodução. No Alto Paraguai, os habitats usados para alimentação são as áreas alagadas, canais

temporários, lagoas marginais, ao longo do rio Paraguai, o canal principal do rio é usado para migração e as cabeceiras para reprodução (RESENDE, 2003). A piraputanga é um exemplo de peixe migrador. Após um período de seca, os peixes migram para os corpos de água maiores; iniciam assim vários deslocamentos, primeiro das áreas alagadas para os rios e depois rio acima (AGOSTINHO *et al.*, 2003).

Perto do Cáceres ao norte do Pantanal o pico de inundação ocorre normalmente em fevereiro e março, concomitantemente com o pico de chuvas. Em Ladário, mais ao sul, ao longo do Rio Paraguai, a inundação ocorre de maio a julho. Mais ao sul, em Porto Murtinho, o pico de inundação está distribuído por 4 meses, de maio a agosto (PONCE, 1995). Nos meses de novembro e dezembro as piraputangas se deslocam para reprodução. Em dezembro e janeiro, auge da piracema, grupos de *Brycon hilarii* sexualmente maduros, fazem a desova (SABINO; ANDRADE, 2003). Em fevereiro ocorre o término da estação reprodutiva dos peixes migradores (RESENDE; SANTOS, 2002), com os cardumes de peixe deixando o curso do rio para procurar por comida nas áreas inundadas adjacentes. Em abril, os peixes dispersam das áreas inundadas para o curso do rio ou para lagoas permanentes em um movimento conhecido como lufada (PRODEAGRO, 1997 *apud* ALHO, 2008). O crescimento da piraputanga é concomitante com o aumento do nível da água, provavelmente devido ao aumento da disponibilidade de alimento (LOWE-MCCONNEL, 1999).

O encontro de indivíduos de diversos rios nestes períodos de cheia, aliado com o hábito migratório da espécie, permite inferir o porquê da não existência de estruturação genética entre as amostragens de diferentes sub-bacias.

Padrões como o observado neste estudo, com falta de estruturação e alto fluxo gênico entre as populações de diferentes rios são comuns em grandes migradores que habitam locais sem barreiras geográficas. Em Santos *et al.* (2007) resultados semelhantes foram observados com *Colossoma macropomum* na bacia Amazônica, localizada em uma região topograficamente semelhante ao Pantanal. Outra espécie neotropical, *Prochilodus lineatus*, constitui uma única população panmítica na região da bacia do Paraná, com uma alta variabilidade nos estoques selvagens (SIVASUNDAR *et al.*, 2001). Iervolino (2008) mostrou, com o sequenciamento do D-loop do DNAm de pacu (*Piaractus mesopotamicus*), que suas populações do Pantanal encontram-se não estruturadas, assim como Sukanuma

(2008), que utilizou microssatélites como ferramenta molecular, confirmando os dados de Calcagnotto (1998), que estudou a espécie com a ferramenta RFLP.

Entretanto, Benites (2008) e Pereira *et al.*, (2008) encontraram estruturação genética para populações de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*), um grande migrador do Pantanal. Segundo Resende (comunicação pessoal) uma explicação para isso seria a natureza bentônica da espécie. Por serem espécies pelágicas, a piraputanga e o pacu teriam seus ovos e larvas, produzidos nas cabeceiras, carregados rio abaixo para áreas inundadas, onde encontrariam alimento e cresceriam, assim como os adultos, que após a piracema realizam a lufada, encontrando alimento nestas mesmas áreas inundadas. Em anos de grandes cheias estas áreas se interligam, permitindo uma grande mistura de larvas e adultos de diferentes rios, explicando assim, a pan-mixia encontrada para as espécies. Por ser uma espécie bentônica, o pintado não possuiria essa mesma mobilidade mesmo em tempos de cheia, não existindo assim o encontro de indivíduos de diferentes rios.

Santos *et al.* (2007) também sugere como hipótese para a pan-mixia encontrada para o tambaqui na Bacia Amazônica, a migração dos adultos para áreas inundadas em busca de alimento e o transporte passivo de larvas e ovos para estas áreas.

5.6 IMPORTÂNCIA DA CONSERVAÇÃO E MANEJO SUSTENTADO DA ESPÉCIE

A rápida expansão da aquicultura e a sobreexploração da indústria pesqueira criou condições onde o uso irresponsável dos recursos naturais pode resultar em impactos ambientais e sociais adversos e insustentabilidade (FAO, 2007). De acordo com Vida (1994), o futuro da biodiversidade está na diversidade genética das espécies.

Em geral, quanto mais alta a diversidade genética mantida, mais alta é a capacidade de adaptação, e conseqüentemente a probabilidade de sobrevivência da espécie. Ou seja, a informação sobre a variabilidade genética das espécies a serem conservadas é essencial para programas de conservação (VIDA, 1994). A

fragmentação de populações causa diferenciação genética entre elas, reduzindo a diversidade genética nas populações pequenas, que geralmente está associada com a endogamia e redução geral na reprodução e sobrevivência (FRANKHAM *et al.*, 2008).

Sendo assim, o conhecimento da estrutura genética das populações de uma espécie de peixe economicamente importante é necessário para a criação de ações de manejo, auxiliando não só na conservação da espécie, mas também na maximização de uma captura sustentável, evitando o colapso de uma pesca comercial ou esportiva (HILSDORF *et al.*, 2006), o que seria poderia ocorrer com a piraputanga, uma importante espécie de valor econômico para o Mato Grosso do Sul (RESENDE; SANTOS, 2002) e de interesse turístico da região (SABINO; ANDRADE, 2002).

Segundo uma análise do rendimento por recruta e taxa de exploração feita por Mateus e Estupiñán (2002), o rendimento máximo sustentável não foi alcançado, portanto o estoque da piraputanga ainda não está sobreexplorado. Entretanto, indivíduos abaixo do tamanho limite legal para pesca estão sendo explorados, indicando uma tendência para pesca de jovens pela indústria pesqueira, o que poderia acarretar na diminuição do número efetivo de população, causando em longo prazo uma diminuição no tamanho total da espécie, o que por enquanto parece não ocorrer. Segundo Catella e Albuquerque (1996), a pesca da piraputanga mostrou crescimento expressivo na pesca profissional, passando de 0,33 t (2002) para 3 t em 2003. O mesmo não foi observado na pesca esportiva, que vem mostrando redução desde 2000.

Uma análise de Sabino e Andrade (2002) mostrou que o rendimento econômico de apenas um exemplar de piraputanga no Aquário Natural Baía Bonita, proveniente de gastos de turistas que vão ao local para observar os cardumes, chega a pouco mais de três mil reais por ano e quase 16 mil ao longo da sua vida, ressaltando a importância da conservação da espécie para a economia local.

Além disso, a piraputanga possui importância ecológica, sendo um dos principais peixes de hábitos frugívoros do Rio Formoso, atuando tanto como predadora quanto dispersora de sementes (SABINO *et al.*, 2005) e segundo Reys (2002) é um dos principais dispersores de sementes das florestas ripárias ao longo do Rio Formoso. Na área do Pantanal Passo da Lontra, próximo ao Rio Miranda, também foi verificada a ictiocoria (dispersão de sementes por peixes) como

contribuição para manter a dinâmica das formações vegetais existentes no local, realizada por endozoocoria (dispersão através da ingestão e posterior liberação da semente) pelos peixes pacu, curimatá, pacu-peva e jaraqui (PAULA *et al.*, 1995). Outra forma interessante de dispersão de sementes realizada por peixes do Pantanal foi observada por Bertazzoni (2008), que encontrou espécimes de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) com frutos de arroz-do-campo (*Oryza latifolia*) presos as suas escamas.

A dispersão de sementes realizada pelos peixes na vegetação ripária é sempre ocasional, porém pode ser importante no processo de dispersão de diásporas a longas distâncias, notadamente rio acima (SABINO *et al.*, 2005), como é o caso da piraputanga, que carrega as sementes durante a piracema, sendo um dos maiores fatores influenciadores da distribuição vegetal ao longo da floresta.

Durante o período de inundação do Pantanal, quando a água sobe de 3-4m, que a pesca é a atividade mais comum (SILVA; GIRARD, 2004). Infelizmente, é na época das cheias que a piraputanga tem seu período reprodutivo, e segundo Resende (2005), durante a piracema, o apelo para perpetuação da espécie é tão intenso que os peixes se descuidam de suas estratégias de proteção, tornando-se presa fácil. A viagem de centenas de quilômetros os deixa extenuados, e muitos pescadores aproveitam-se dessa fragilidade para capturá-los facilmente e em grandes quantidades. Agindo desse modo, interferem em todo o processo de perpetuação da espécie e renovação dos estoques, que será sentido na diminuição do tamanho dos peixes e na quantidade disponível para a pesca nos anos subsequentes, por essa razão sendo importante proteger os peixes na época de piracema. O defeso da Piracema é determinado pela Lei nº 7.679, de 23 de novembro de 1988, e estabelecido anualmente pelo IBAMA, com a colaboração de órgãos, instituições e associações envolvidas com a pesca em cada bacia hidrográfica (RESENDE, 2005).

Outro problema que pode ocorrer com a falta de manejo sustentado em populações naturais é a diminuição do tamanho populacional, que pode acarretar em um processo de deriva genética, conseqüente endogamia e perda de heterozigose (AVISE, 1994).

A avaliação da estrutura genética da piraputanga da Bacia do Alto Paraguai não mostrou estruturação entre os rios, o que indica que as piraputangas do pantanal devem ser manejadas como uma metapopulação. Segundo Haig (1998), se

a população da espécie é homogênea ao longo da área de ocorrência, ou seja, não existe estruturação populacional alguma, então é viável concentrar a proteção da espécie em apenas uma área, usando indivíduos dessa área para a recolonização de outras quando necessário, como por exemplo, para recolonizar populações esgotadas e manejar reintroduções de indivíduos provenientes de áreas com alta diversidade genética (Hrbek *et al.*, 2005), uma técnica batizada de *source-sink* (PULLIAM, 1988). Entretanto, Hrbek *et al.* (2005) alerta que variação genética adaptativa é diferente de variação genética neutra, então apesar de existir interconexões genéticas entre as áreas, as reintroduções não devem ser realizadas sem pesquisas adicionais e monitoramento cuidadoso.

6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Foi possível avaliar a diversidade genética da espécie *Brycon hilarii* por meio do marcador microssatélite.

A alta variabilidade genética encontrada indica que não está havendo sobrepesca da espécie, mas tendo em vista a sua importância econômica e ecológica é necessário que continue sendo respeitado o defeso da piracema, e que a pesca da espécie seja suspensa durante o período de reprodução desta.

O presente estudo mostrou que as populações de piraputanga da Bacia do Alto Paraguai formam uma grande população pan-mítica, ou seja, existe um amplo fluxo gênico entre os indivíduos dos diferentes rios amostrados, provavelmente devido a dois fatores. O primeiro seria a característica de inundação da bacia onde a espécie se encontra e o segundo é a característica migradora da espécie em períodos reprodutivos, que juntamente com a inundação periódica da bacia, possibilita a troca de genes entre indivíduos de populações, já que permite o encontro de indivíduos de diferentes rios.

Assim sendo, propõe-se para fins conservacionistas que a piraputanga seja tratada como uma metapopulação, e esforços de conservação sejam concentrados em uma área com alta variabilidade genética, possivelmente a do Rio Taquari, onde foi encontrada a maior riqueza alélica, para que indivíduos desta população possam ser utilizados para repovoamento em outras áreas da bacia, se assim necessário, conservando uma grande parte da variabilidade e permitindo a adaptação destes indivíduos ao local seguindo o modelo *source-sink* de manejo.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINHO, A.A.; THOMAZ, S.M.; GOMES, L.C. Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. **Conservation Biology**, v.19, p. 646-652, 2005.
- AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI H.I.; JÚLIO, H.F. Migratory fish from the upper Paraná River basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B; ROSS, C.; BAER, A. (Eds). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Canada: World Fisheries Trust, 2003. p. 19–99.
- ALHO, C.J.R. Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n.4, p. 957-966, 2008.
- ALLENDORF, F. W.; PHELPS, S. R. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 109, p. 537-543, 1980.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 511p.
- BALL, A. O.; LEONARD, S.; CHAPMAN, R. W. Characterization of (GT)_n microsatellites from native white shrimp (*Penaeus setiferus*). **Molecular Ecology**, v.7, p.1251-1253, 1998.
- BALLOUX, F.; MOULIN, N.L. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, v.11, 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**, v.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) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. **Aquaculture**, v.247, p. 51– 65, 2005.
- BEARDMORE, J.A.; MAIR, G.C.; LEWIS, R.I. Biodiversity in aquatic systems in relation to aquaculture. **Aquaculture Research**, v.28, p. 829-839, 1997.

BEAUMONT, A.R.; HOARE, K. **Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture**. United Kingdom: Blackwell Science, 1988.

BECKMANJN, S.; WEBER, J.L. Survey of human and rat microsatellites. **Genomics**, v.12, p. 627-631, 1992.

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

BERTAZZONI, E.C. **Aspectos da Biologia e Fenologia de *Oryza latifolia* Desv. (Poaceae) no Pantanal sul-mato-grossense**. Tese de Mestrado. Campo Grande: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, 2008.

BITTENCOURT, M.M.; COX-FERNANDES, C. Peixes migradores sustentam pesca comercial. **Ciência Hoje**, v. 11, n. 64, p. 20-24, 1990.

BRITSKI, H.A. Peixes de água doce do Estado de São Paulo: Sistemática. In: **Poluição e Piscicultura**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, Instituto de Pesca da CPRN da Secretaria da Agricultura, 1972. p. 79-108.

BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco)**. Minas Gerais: Ministério da Irrigação – CODEVASF, 1998.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z., LOPES, B.S. **Peixes do Pantanal: manual de identificação**. Brasília: EMBRAPA, 1999.

BUCHER, E.H.; BONETTO, A.; BOYLE, T.; CANEVARI, P.; CASTRO, G. **Hidrovia: Uma Análise ambiental da via fluvial Paraguai-Paraná**. São Paulo: NUPAUB-USP, 1994.

BUCKUP, P. A.; MENEZES, N.A. **Catálogo dos peixes marinhos e de água doce do Brasil**. 2. ed. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2003.

CALCAGNOTTO, D. **Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Através da Análise do DNA Mitocondrial**. Tese de doutorado. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1998.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p. 245-247, 2001.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.36, p.135–153, 2005.

CAROLSFELD, J.; HARVEY, B; ROSS, C.; BAER, A. (Eds). **Migratory fishes of South America: biology, social importance and conservation status**. Canada: World Fisheries Trust, 2003.

CARVALHO, N.O. Hidrologia da bacia do alto Paraguai. In: Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio Econômicos do Pantanal, 1, 1984, Corumbá. **Anais Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio Econômicos do Pantanal**. Corumbá: EMBRAPA, 1986.

CARVALHO-COSTA, L.F.; HATANAKA, T.; GALETTI JR, P.M. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p. 377-380, 2008.

CATELLA, A.C.; ALBUQUERQUE, S.P. Sistema de Controle da Pesca de Mato Grosso do Sul - SCPESCA/MS 10 - 2003. **Boletim de Pesquisa**. Pantanal:Embrapa Pantanal, v.75, 2007. p. 1-5.

CHISTIAKOW, D.A., HELLEMANS, B., AND VOLCKAERT, F.A.M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics. **Aquaculture**, v. 255, p. 1–29, 2006.

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

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.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. ARLEQUIN ver 3.01, An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**. 2006. Disponível em: <[http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin 3](http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3)>. Acesso em: Set. 2008.

FAO. The next frontier in genetic research: under water. **FAO**. 2007. Disponível em: <www.fao.org/newsroom/en/news/2007/1000593/index.html>. Acesso em Set 2008.

FERGUSON, M.M.; DANZMANN, R.G. Role of genetics markers in fisheries and aquaculture: useful tools or stamp collecting?. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.55. p. 1553-1563, 1998.

FERNANDO, P.; VIDYA, T.N.C.; RAJPAKSE, A.; DANGOLLA, A.; MELNICK, D.J. Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality? **Journal of Heredity**, v. 94, p.115–123, 2003.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA CENARGEN, 1996. 220p.

FISHER, R.A. **The Genetical Theory of Natural Selection**. Oxford: Oxford University Press, 1930.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

FRANKHAM, R., BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética de Conservação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2008.

GODINHO F.N.; FERREIRA M.T. The relative influences of exotic species and environmental factors on an Iberian native fish community. **Environmental Biology of Fishes**, v.51, p.41–51, 1998.

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.

GOMIERO, L.M.; BRAGA, F.M.S. Relação gonadossomática e estratégia reprodutiva de *Brycon opalinus* no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, p.721-726, 2007.

GOUDET, J. FSTAT, a program for IBM PC compatibles to calculate Weir and Cockerham's (1984) estimators of F-statistics (version 1.2). **Journal of Heredity**, 1995. Disponível em: <<http://74.125.155.132/scholar?q=cache:YL2i49ezimEJ:scholar.google.com/+FSTAT,+a+program+for+IBM+PC+compatibles+to+calculate+>>

[Weir+and+Cockerham's+\(1984\)+estimators+of+Fstatistics+\(version+1.2\).+&hl=ptBR&as_sdt=2000](#)>. Acesso em: Out. 2007.

GOUDET, J. HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, p. 184–186, 2005.

GRANDJEAN, F.; VERNE, S.; CHERBONNEL, C.; RICHARD, A. Fine-scale genetic structure of Atlantic salmon (*Salmo salar*) using microsatellite markers: effects of restocking and natural recolonization. **Freshwater Biology**, v.54, p.417–433, 2009.

GREENWOOD, P.H. Are the major fish faunas wellknown? **Journal of Zoology**, v.42, p.131-138, 1992.

GROOMBRIDGE, B. **Global Biodiversity**. London: Chapman & Hall, 1992.

HAIG, S.M. Molecular contributions to conservation. **Ecology**, v.79, p.413-425, 1998.

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.

HAMOY, I.G.; SANTOS, E.J.M.; SANTOS, S.E.B. Rapid and inexpensive analysis of genetic variability in *Arapaima gigas* by PCR multiplex panel of eight microsatellites. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.1, p.29-32, 2008.

HARRIS, M.B.; ARCANGELO, C.; PINTO, E.C.T.; CAMARGO, G.; RAMOS NETO, M.B.; SILVA, S. M. **Estimativas de perda da área natural da Bacia do Alto Paraguai e Pantanal Brasileiro**. Relatório técnico não publicado. Campo Grande: Conservação Internacional, 2005.

HASSANIEN, H.A.; ELNADY, M.; OBEIDA, A.; ITRIBY, H. Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). **Aquaculture Research**, v.35, p.587-593, 2004.

HECKMAN, C.W. **The Pantanal of Poconé: biota and ecology in the northern section of the world's largest pristine wetland**. London: Kluwer Academic Publishers, 1998. 622p.

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.; CANEPPELE, D.; KRIEGER, J. E. Muscle Biopsy Technique for Electrophoresis Analysis of Fish of the Genus *Brycon*. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.547-550, 1999.

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.

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.

HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I.P. Conservation strategies for *Arapaima gigas* (Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. **Brazilian Journal of Biology**, v.67, n.4, p.909-917, 2007.

HUGHES, A.R., INOUE, B.D., JOHNSON, M.T.J., UNDERWOOD, N. AND VELLEND M. Ecological consequences of genetic diversity. **Ecology Letters**, v.11, p.609-623, 2008.

IERVOLINO, F. **Prospecção e avaliação da diversidade genética intra e inter populacional do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) (HOLMEBERG, 1887) na bacia do Alto Paraguai por meio de marcadores do DNA mitocondrial**. Tese de Mestrado. Mogi das Cruzes: Universidade de Mogi das Cruzes, 2008.

IUCN. **The red data book of endangered animals**. International Union for the Conservation of Nature and Natural Resources, 1990.

JACOB, H. J.; LINDPAINTNER, K.; LINCOLN, S. E.; KUSUMI, K.; BUNKER, R. K.; MAO, Y. P.; GANTEN, D.; DZAU, V. J.; LANDER, E. S. Genetic mapping of a gene causing hypertension in the stroke-prone spontaneously hypertensive rat. **Cell**, v.67, p.213-224, 1991.

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

JEFFREYS, A.J.; ROYLE, N.J.; WILSON, V.; WONG, Z. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. **Nature**, v.322, p.278-281, 1988.

JEFFREYS, A.J.; WILSON, V.; THEIN, S.L. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67-73, 1985.

JUNK, W.J.; SILVA, C.J. O conceito do pulso de inundação e suas implicações para o Pantanal de Mato Grosso. In: II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, Manejo e Conservação. 1999. Corumbá. **Anais do II Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal, Manejo e Conservação**. Brasília: EMBRAPACAP, 1999. p.17-28.

KALINOWSKI, S.T. Counting alleles with rarefaction: Private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, v.5, p.539-543, 2004.

KELLER, L. F.; WALLER, D. M. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology & evolution**, v.17, 2002.

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

KIMURA, M.; OHTA, T. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v.75, p.2868-2872, 1978.

KORNBERG, A. **DNA Replication**. San Francisco: W.H.Freeman, 1980.

KRAMER, D.L., LINDSEY, C.C.; MOODIE, G.E.E.; STEVENS, E.D. The fishes and the aquatic environment of the central Amazon basin, with particular reference to respiratory patterns. **Canadian Journal of Zoology**, v.56, p.717-729, 1978.

LAI, Y.; SUN, F. The Relationship Between Microsatellite Slippage Mutation Rate and the Number of Repeat Units. **Molecular Biology and Evolution**, v.20, p.2123-2131, 2003.

LATCH, E.K.; DHARMARAJAN, G.; GLAUBITZ, J.C.; RHODES JR., O.E. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. **Conservation Genetics**, v.7, p.295-302, 2006.

LEWINSOHN, T. M. e PRADO, P. I. **Biodiversidade brasileira: síntese do estado atual do conhecimento**. São Paulo: Editora Contexto, 2002.

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

LIU, Z.J.; CORDES, J.F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v.238, p.1-37, 2004.

LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; POVH, J.A.; GOMES, P.C.; VARGAS, L.; MANGOLIN, C.A. Genetic Variability in *Brycon orbignyanus* Stocks Used in Stocking Programs: Management and Conservation. **Acta Biológica Colombiana**, v.13, p.107-118, 2008.

LOWE-McCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1999.

MACHADO, C. E.; ABREU, H. C. F. Notas preliminares sobre a caça e a pesca no Estado de São Paulo - I, A Pesca no Vale do Paraíba. **Boletim de Indústria Animal - SP**, v.13, p.145-160, 1952.

MATEUS, L. A. de F.; ESTUPINAN, G. M.B. Fish stock assessment of piraputanga *Brycon microlepis* in the Cuiabá River basin, Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.62, 2002.

MATSUMOTO, C. K. **Análise da Variabilidade Genética Da Piabanha (*Brycon insignis*) e Implicações Para Sua Conservação e Manejo Sustentado**. Tese de Mestrado. Mogi das Cruzes: Universidade de Mogi das Cruzes, 2005.

MENDONÇA, J. O. J.; MELO, J. S. C. Introdução. In: **Seminário Sobre Criação de Espécies do Gênero *Brycon***, 1, 1994.

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.

MORELLI, K.A.; OLIVEIRA, C.; PORTO-FORESTI, F.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. Populational structure of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu river identified by molecular analysis. In: POMPEU, P.S.; SANTOS, H.A.; ALVES, C.B.M. (Eds) **Proceedings of the International Symposium on Fish Passages in South America**. Lavras: UFLA, 2007. 7-12.

MOURÃO, G.; COUTINHO, M.; MAURO, R.; CAMPOS, Z.; TOMÁS, W.; MAGNUSSON, W. Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil. **Biological Conservation**, v.92, n.2, p.175-183, 2000.

MOYLE, P.B.; LEIDY, R.A. Loss of biodiversity in aquatic ecosystems: Evidence from fish faunas. In: FIEDLER P.L., JAIN, S.K. **Conservation Biology: the theory and practice of nature conservation, preservation and management**. New York: Chapman & Hall, 1992. 127-170.

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

NATURE CONSERVANCY COUNCIL. **Guidelines for selection of biologicals**. Peterborough: Nature Conservancy Council, 1990.

NEI, M. DNA polymorphism within and between populations. In: **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press, 1987. p. 254-286.

NILSSON, J.; ÖSTERGREN, J.; LUNDQVIST, H.; CARLSSON, U. Genetic assessment of Atlantic salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta* stocking in a Baltic Sea river. **Journal of Fish Biology**, v.73, p.1201–1215, 2008.

ODALIA-RÍMOLI, A.; ARRUDA, E. J. DE; RÍMOLI, J.; BUENO, R.; COSTA, R.B.D.A. Biodiversidade, Biotecnologia e Conservação Genética em Desenvolvimento Local. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, p.21-30, 2000.

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

OOSTERHOUT, C.V.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535-538, 2004.

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

PAULA, J.E.; CONCEIÇÃO, C.A.; MACÊDO, M. Contribuição para o conhecimento do Pantanal Passo da Lontra. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, p.583-594, 1995.

PCBAP – PLANO DE CONSERVAÇÃO DA BACIA DO ALTO PARAGUAI. **Projeto Pantanal, Programa Nacional do Meio Ambiente PNMA**. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, recursos hídricos e Amazônia Legal, v.3, 1997.

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.; VASCONCELOS, M.S.; RENESTO, E. Genetic variability In: *Astyanax altiparanae* Garutti & Britski, 2000 (Teleostei, Characidae) from the Upper Paraná River basin, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.28, n.4, p.717-724, 2000.

PINEDA, S.H.; OLIVERA, A.M.; URCUQUI I.S.; TRUJILLO B.E.; BUILES G.J.J. Evaluación del polimorfismo por microsatélites en individuos de *Piaractus brachypomus* (Characidae, Serrasalminae) provenientes del río Meta, Colombia. **Revista Colombiana de Ciencias Pecuárias**, v.19, p.66-69, 2006.

PONCE, V.M.. **Hidrologic and enviromental impact of the Paraná-Paraguay waterway on the Pantanal of Mato Grosso, Brazil**. San Diego: San Diego State University, 1995. Disponível em: <http://ponce.sdsu.edu/hidrovia_report.html>. Acessado em Jan. 2009.

POR, F.D., IMPERATRIZ-FONSECA, V.L., LENCIONI, F. **O Pantanal do Mato Grosso**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 1997.

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

PRIOLI, A.J.; JULIO JR, H.F.; PRIOLI, M.A.P.; PAVANELLI, C.S.; SOUZA, M.C.; ZAWADZKI, C.H.; ROMAGNOLO, M.B.; OLIVEIRA, A.V., CASTRO, L.L.; LUCIO, L.C.; PERIOTO, P.S.; CARLO, V.A.; PANARARI, R.S.; MANIGLIA, T.C. **Variabilidade e Estrutura Genética de Populações Naturais**. 2001. Disponível em: <http://www.peld.uem.br/Relat2001/pdf/componente_bioticos_genetica.PDF>. Acesso em: Out. 2008.

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

PRODEAGRO. **Projeto de Desenvolvimento Agroambiental do Estado de Mato Grosso**. Cuiabá: Meio Biótico, Governo do Estado de Mato Grosso, 1997.

PULLIAM, H.R. Sources, Sinks, and Population Regulation. **The American Naturalist**, v.132, n.5, p.652-661, 1988.

QUEIROZ, J.F.; LOURENÇO, J.N.P.; KITAMURA, P.C. A Embrapa e a Aquicultura. Demandas e Prioridades de Pesquisa. **Embrapa Informação Tecnológica**. Brasília: Embrapa, v.11, 2002. 25p.

QUELLER, D.C.; STRASSMANN, J.E.; HUGHES, C.R. **Microsatellites and Kinship**. United Kingdom: Elsevier Science Publishers Ltd., 1993. p. 285-288.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Viena: R Foundation for Statistical Computing, 2004. Disponível em: <<http://www.R-project.org>>. Acesso em Dez. 2008.

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.; FERRARI JR, C.J. **Check list of the freshwater fishes of South and Central America**. Porto Alegre: EDPUCRS, 2003.

REYS, P. **Frugivoria e dispersão de sementes por vertebrados na mata ciliar e no Rio Formoso em Bonito, Mato Grosso do Sul**. Tese de Mestrado. Rio Claro: Universidade Estadual Paulista, 2002.

RESENDE, E.K. **Os pulsos de inundação e o Rio Taquari**. Aquidauana: EMPRAPA Pantanal, 2005.

RESENDE, E.K. Paraguay-Paraná Basin. Excluding the Upper Paraná Basin. In: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. **Migratory Fishes of South America – Biology, Fisheries and Conservation Status**. Canada: The International Bank for Reconstruction and Development, 2003.

RESENDE, E.K.; SANTOS, D.C. **Diagnóstico da pasça e aspectos da biologia reprodutiva dos peixes da bacia hidrográfica do Rio Taquari, Mato Grosso do Sul, Brasil.** Corumbá: Embrapa Pantanal, v.25, 2002. 21p.

RESENDE, E.K. **Influência das atividades antrópicas sobre os peixes da bacia hidrográfica do Rio Miranda, período de 1985 a 1987.** Corumbá: EMBRAPA - Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, 1995.

ROSA, R. S.; LIMA, F. C. Os peixes brasileiros ameaçados de extinção. *In:* MACHADO, A. B.M., DRUMMOND, A. M., PAGLIA, A. P. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção.** 1. ed. Fundação Biodiversitas, v.2, 2008.

RYMAN, N.; UTTER, F.; LAIKRE, L. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.4, p.417-446, 1995.

SABINO, J.; ANDRADE, LP. Uso e conservação da ictiofauna no ecoturismo da região de Bonito, Mato Grosso do Sul: o mito da sustentabilidade ecológica no Rio Baía Bonita (Aquário Natural de Bonito). **Biota Neotropica**, v.3, p.1-9, 2003.

SABINO, J.; REYS, P.; GALETTI, M. Frugivoria e dispersão de sementes por *Brycon hilarii* no Rio Formoso, Bonito, Mato Grosso do Sul, com ênfase na conservação populacional. *In:* Encontro Brasileiro de Ictiologia: Ictiofauna Brasileira – estado atual do conhecimento, 16, 2005, João Pessoa. **Anais Encontro Brasileiro de Ictiologia: Ictiofauna Brasileira – estado atual do conhecimento.** João Pessoa: Sociedade Brasileira de Ictiologia e Universidade Federal da Paraíba, 2005. 151p.

SALGUEIRO, P.; CARVALHO, G.; PEREIRA, M.J.C.; COELHO, M.M. Microsatellite analysis of population structure of the endangered cyprinid *Anaecypris hispanica* in Portugal: implications for 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.

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

SANCHES, A.; GALETTI, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian Journal of Biology**, v.67, n. 4, p.889-895, 2007.

SANTIS, H.P.; CHACÓN L.A.; ECHEVARRIA, A.E.; INCHIMA, S.U.; MOLINA, D.P.; ÁNGEL, M.O.; GÓMEZ, J.B. Caracterización de la diversidad genética en el pez *Brycon henni* (Characiformes:Characidae) en Colombia central por medio de marcadores RAPD. **Revista de Biología Tropical**, v.55, p.1025–1035, 2007.

SANTOS, M.C.F.; RUFFINO, M.L.; FARIAS, J.P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v.71, p.33-44, 2007.

SATO, Y.; FENERICH-VERANI, N.; VERANI, J.R.; VIEIRA, L.J.S.; GODINHO, H.P. Induced reproductive responses of the neotropical anostomid fish *Leporinus elongatus* Val. under captive breeding. **Aquaculture Research**, v.31, p.189-193, 2000.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). In: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.C.; LUCENA, A.S. **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998. 375–400.

SCHLÖTTERER, C.; VOGL, C.; TAUTZ, D. Polymorphism and Locus-Specific Effects on Polymorphism at Microsatellite Loci in Natural *Drosophila melanogaster* Populations. **Genetics**, v.146, p.309-320, 1997.

SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J. M.; ROESSLI, D.; EXCOFFIER, L. **Arlequin v. 2001. A software for population genetic analysis**. Geneva: University of Geneva, 2001.

SHINDE, D.; LAI, Y.; SUN, F.; ARNHEIM, N. Taq DNA polymerase slippage mutation rates measured by PCR and quasi-likelihood analysis: (CA/GT)_n and (A/T)_n microsatellites. **Nucleic Acids Research**, v.31, p.974-980, 2003.

SILVA, C. J.; GIRARD, P. New Challenges in the Management of the Brazilian Pantanal and Catchment Area. **Wetlands Ecology and Management**, v.12, p.553–561, 2004.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v.10, p. 407-417, 2001.

SKIBINSKI, D.O.F. The potencial of DNA techniques in the population and evolutionary genetics of aquatic invertebrates. In: BEAUMONT, A.R. (ed) **Genetics and Evolution of Aquatic Organisms**. London: Chapman & Hall, 1994. 177-199.

SLATKIN, M. Rare alleles as indicators of gene flow. **Evolution**, v.39, p.53-65, 1985.

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

SOFIA, S.H.; GALINDO, B.A.; PAULA, F.M.; SODRÉ, L.M.K.; MARTINEZ, C.B.R. Genetic diversity of *Hypostomus ancistroides* (Teleostei, Loricariidae) from an urban stream. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.1, p.317-323, 2008.

SOLÉ-CAVA, A.M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI, S.R. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2001. p.172-192.

STALLINGS, R.L. Conservation and evolution of (CT)_n/(GA)_n microsatellite sequences at orthologous positions in diverse mammalian genomes. **Genomics**, v.25, p.107-113, 1995.

SUGANUMA, C.H. **Avaliação da diversidade genética de populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o uso de marcadores moleculares do tipo microssatélites**. Tese de doutorado. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, 2008.

SUGANUMA, C.H.; CALCAGNOTTO, D.; BENITES, C.; RESENDE, E.K.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Diversidade genética de populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) da Bacia do Alto Paraguai baseada em análise de microssatélites. In: 45° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2008, Lavras. **Anais 45° Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. Lavras: UFLA, 2008.

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**, v.40, p.963-965, 1992.

TAUTZ, D. A hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v.17, p.6463-6471, 1989.

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

TESSIER, N.; BERNATCHEZ, L.; WRIGHT, J. M. Population structure and impact of supportive breeding inferred from mitochondrial and microsatellite DNA analyses in land-locked Atlantic salmon *Salmo salar* L. **Molecular Ecology**, v.6, p.735-750, 1997.

TORRES, R.A.; MATOSO, D.A.; ARTONI, R.F. Genética de peixes neotropicais. II. Biologia Molecular de Peixes Neotropicais. **Publicatio UEPG: Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.2, p.27-37, 2004.

USMANI, S.; TAN, S.G.; SIRAJ, S.S.; YUSOFF, K. Population structure of the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. **Animal Genetics**, v.34, n.6, p.462-464, 2003.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v.4, p.535–538, 2004.

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

VAZZOLER, A.E.A.M. **Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática**. Maringá: EDUEM, 1996.

VIDA, G. Global issues of genetic diversity. In: LOESCHCKE, V.; TOMIUK, J.; JAIN, S.K. (eds) **Conservation Genetics**. Basel: Birkhauser Verlag, 1994. p.9-19.

VUORINEN, J. Reduction of genetic variability in a hatchery stock of brown trout, *Salmo trutta* L. **Journal of Fish Biology**, v.24, p.339-348, 1984.

WAPLES, R.S. Separating the wheat from the chaff: Patterns of genetic differentiation in high gene flow species. **The Journal of Heredity**, v.89, p.438-450, 1998.

WAPLES, R.S.; DO, C. Genetic risk associated with supplementation of Pacific salmonids: Captive broodstock programs. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.51, p.310-329, 1994.

WAPLES, R.S.; WINANS, G.A.; UTTER, F.M.; MAHNKEN, C. Genetic approaches to the management of Pacific salmon. **Fisheries**, v.9, p.615-624, 1990.

WARD, R.D.; SKIBINSKY, D.O.F.; WOODWARK, M. Protein heterozygosity, protein structure and taxonomic differentiation. **Evolutionary Biology**, v.26, p.3–131, 1992.

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

WASKO, A.P.; GALETTI JR., P.M. PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. **Journal of Applied Ichthyology**, v.19, p.109–113, 2003.

WASKO, A.P.; MARTINS C.; OLIVEIRA C.; SENHORINI, J.A.; FORESTI, F. Genetic monitoring of the Amazonian fish matrinxã (*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.; MAY, P.E. Abundant Class of Human DNA Polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **The American Journal of Human Genetics**, v.44, p.388-396, 1989.

WILSON, A.J.; HUTCHINGS, J.A.; FERGUSON, M.M. Dispersal in a stream dwelling salmonid: inferences from tagging and microsatellite studies. **Conservation Genetics**, v.5, p.25–37, 2004.

WORLD CONSERVATION MONITORING CENTRE. *Brycon acuminatus*. In: IUCN, **2008 IUCN Red List of Threatened Species**, 2008.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Population, Variability Within and Among Natural Populations**. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.

WRIGHT, S. **Evolution and the Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago Press, 1969.

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

XU, Z., PRIMAVERA, J. H., DE LA PENA, L. D.; PETTIT, P.; BELAK, J.; WARREN, A. A. Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp (*Penaeus monodon*) in the Philippines using microsatellites. **Aquaculture**, v.199, p.13-40, 2001.

YANG, R.C. Estimating hierarchical F-statistics. **Evolution**, v.52, p.950–956, 1998.

ZUNTINI, D.; VICENTIN, W.; COSTA, F. E. DOS S.; MARQUES, S. P.; BARBOZA, E. G. Alimentação natural da Piraputanga, *Brycon hilarii* (Teleostei- Characidae) no Rio Miranda, Município de Jardim, MS - Projeto Piracema. **Anais IV Simpósio sobre Recursos Naturais e Sócio-econômicos do Pantanal Corumbá/MS**, 2004.

APÊNDICE A - Genotipagem com número de repetições de todos os indivíduos para as sete amostragens

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Cuiabá – Porto Cercado

	Ind.	Genótipos
01	05 - 05 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 10 - 17 ; 14 - 14 ; 13 - 19 ;	
02	07 - 07 ; 07 - 07 ; 08 - 08 ; 16 - 16 ; 14 - 16 ; 19 - 19 ;	
03	07 - 07 ; 08 - 09 ; 10 - 28 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 15 - 20 ;	
04	07 - 07 ; 00 - 00 ; 08 - 26 ; 11 - 18 ; 14 - 16 ; 15 - 20 ;	
05	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 27 ; 11 - 18 ; 14 - 16 ; 14 - 20 ;	
06	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 07 - 12 ; 14 - 16 ; 14 - 20 ;	
07	05 - 05 ; 07 - 08 ; 08 - 08 ; 10 - 15 ; 00 - 00 ; 01 - 01 ;	
08	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 27 ; 00 - 00 ; 16 - 18 ; 13 - 19 ;	
09	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 26 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 15 - 15 ;	
10	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 26 ; 13 - 16 ; 18 - 20 ; 17 - 19 ;	
11	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 28 ; 11 - 17 ; 16 - 18 ; 14 - 19 ;	
12	05 - 07 ; 08 - 08 ; 06 - 28 ; 00 - 00 ; 16 - 18 ; 14 - 18 ;	
13	07 - 07 ; 08 - 08 ; 12 - 28 ; 13 - 17 ; 13 - 16 ; 14 - 20 ;	
14	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 10 ; 17 - 17 ; 16 - 18 ; 14 - 14 ;	
15	05 - 07 ; 08 - 09 ; 12 - 28 ; 12 - 17 ; 18 - 20 ; 19 - 19 ;	
16	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 08 ; 11 - 17 ; 17 - 19 ; 14 - 19 ;	
17	05 - 07 ; 07 - 08 ; 15 - 27 ; 11 - 17 ; 15 - 17 ; 13 - 13 ;	
18	07 - 07 ; 08 - 08 ; 10 - 28 ; 14 - 16 ; 14 - 17 ; 13 - 18 ;	
19	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 26 ; 11 - 17 ; 15 - 17 ; 13 - 18 ;	
20	07 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 00 - 00 ; 15 - 17 ; 13 - 18 ;	
21	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 15 - 18 ; 14 - 16 ; 13 - 20 ;	
22	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 11 - 16 ; 15 - 17 ; 14 - 19 ;	
23	05 - 07 ; 08 - 09 ; 27 - 27 ; 11 - 16 ; 17 - 19 ; 02 - 02 ;	
24	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 26 ; 13 - 16 ; 15 - 17 ; 14 - 14 ;	
25	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 10 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 14 - 18 ;	
26	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 06 - 11 ; 15 - 17 ; 02 - 04 ;	
27	05 - 05 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 14 - 14 ;	
28	05 - 05 ; 08 - 08 ; 12 - 12 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 19 - 19 ;	
29	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 28 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 13 - 13 ;	
30	05 - 05 ; 08 - 09 ; 07 - 08 ; 00 - 00 ; 15 - 17 ; 13 - 18 ;	
31	07 - 07 ; 08 - 08 ; 25 - 28 ; 08 - 11 ; 13 - 16 ; 19 - 19 ;	
32	05 - 05 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 16 - 18 ; 13 - 16 ; 13 - 13 ;	
33	07 - 08 ; 09 - 09 ; 08 - 28 ; 11 - 12 ; 15 - 17 ; 13 - 18 ;	
34	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 25 ; 12 - 18 ; 13 - 15 ; 15 - 17 ;	
35	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 16 ; 17 - 19 ; 13 - 18 ;	
36	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 26 ; 13 - 16 ; 16 - 18 ; 13 - 18 ;	
37	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 18 ; 14 - 16 ; 18 - 18 ;	
38	05 - 07 ; 07 - 09 ; 08 - 28 ; 11 - 18 ; 14 - 16 ; 17 - 17 ;	
39	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 27 ; 12 - 18 ; 00 - 00 ; 14 - 14 ;	
40	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 17 ; 18 - 20 ; 15 - 15.	

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Cuiabá – Parque Nacional

Ind.	Genótipos
01	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 10 - 12 ; 16 - 20 ; 16 - 16 ;
02	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 12 - 12 ; 00 - 00 ; 04 - 15 ;
03	05 - 05 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 11 ; 16 - 18 ; 17 - 17 ;
04	05 - 05 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 16 - 16 ; 14 - 16 ; 15 - 15 ;
05	05 - 05 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 12 - 16 ; 00 - 00 ; 04 - 17 ;
06	05 - 07 ; 08 - 08 ; 12 - 26 ; 12 - 16 ; 14 - 16 ; 18 - 18 ;
07	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 11 - 11 ; 14 - 16 ; 14 - 14 ;
08	05 - 07 ; 08 - 09 ; 26 - 28 ; 12 - 12 ; 14 - 16 ; 18 - 19 ;
09	05 - 07 ; 07 - 08 ; 15 - 26 ; 16 - 16 ; 14 - 16 ; 19 - 19 ;
10	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 17 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
11	07 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 18 ; 13 - 14 ; 04 - 16 ;
12	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 22 ; 13 - 17 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
13	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 26 ; 12 - 17 ; 00 - 00 ; 12 - 14 ;
14	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 27 ; 12 - 17 ; 14 - 16 ; 12 - 12.

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Paraguai

Ind.	Genótipos
01	05 - 05 ; 08 - 08 ; 08 - 25 ; 17 - 17 ; 11 - 14 ; 12 - 12 ;
02	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 00 - 00 ; 11 - 14 ; 11 - 15 ;
03	07 - 07 ; 07 - 08 ; 26 - 28 ; 16 - 16 ; 14 - 16 ; 11 - 11 ;
04	07 - 07 ; 08 - 08 ; 12 - 12 ; 17 - 17 ; 14 - 16 ; 12 - 16 ;
05	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 18 - 18 ; 18 - 20 ; 12 - 12 ;
06	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 17 - 17 ; 16 - 18 ; 12 - 12 ;
07	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 09 - 17 ; 14 - 16 ; 12 - 12 ;
08	05 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 17 - 11 ; 15 - 15 ; 14 - 14 ;
09	05 - 07 ; 08 - 08 ; 05 - 22 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 11 - 11 ;
10	07 - 07 ; 08 - 08 ; 10 - 28 ; 17 - 18 ; 14 - 16 ; 12 - 12 ;
11	05 - 07 ; 09 - 09 ; 08 - 28 ; 16 - 16 ; 13 - 15 ; 13 - 13 ;
12	05 - 05 ; 07 - 08 ; 28 - 28 ; 07 - 12 ; 14 - 16 ; 13 - 13 ;
13	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 17 - 20 ; 17 - 19 ; 00 - 00 ;
14	05 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 11 - 11 ; 13 - 15 ; 14 - 18 ;
15	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 23 ; 19 - 19 ; 14 - 16 ; 14 - 14 ;
16	05 - 07 ; 08 - 08 ; 25 - 27 ; 17 - 17 ; 15 - 18 ; 14 - 16 ;
17	07 - 07 ; 09 - 09 ; 08 - 27 ; 16 - 17 ; 13 - 15 ; 14 - 14 ;
18	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 26 ; 16 - 12 ; 17 - 19 ; 15 - 15 ;
19	05 - 07 ; 08 - 08 ; 07 - 25 ; 11 - 17 ; 14 - 14 ; 14 - 14 ;
20	05 - 07 ; 08 - 08 ; 27 - 27 ; 07 - 12 ; 13 - 15 ; 14 - 14 ;
21	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 16 ; 13 - 15 ; 15 - 15 ;
22	05 - 07 ; 07 - 08 ; 24 - 26 ; 12 - 16 ; 18 - 20 ; 14 - 14 ;
23	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 18 ; 13 - 16 ; 13 - 18 ;
24	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 11 ; 14 - 16 ; 18 - 19 ;
25	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 16 ; 14 - 16 ; 11 - 04 ;
26	07 - 07 ; 08 - 08 ; 25 - 25 ; 12 - 17 ; 14 - 16 ; 19 - 03 ;
27	05 - 05 ; 07 - 08 ; 08 - 08 ; 11 - 16 ; 14 - 14 ; 03 - 03 ;
28	05 - 05 ; 08 - 09 ; 08 - 28 ; 11 - 11 ; 14 - 16 ; 03 - 19 ;
29	07 - 07 ; 08 - 08 ; 25 - 25 ; 16 - 16 ; 14 - 14 ; 14 - 14 ;
30	05 - 08 ; 08 - 09 ; 08 - 28 ; 13 - 17 ; 00 - 00 ; 19 - 20.

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Taquari - Palmeiras

Ind.	Genótipos
01	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 11 ; 14 - 16 ; 14 - 19 ;
02	07 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 08 ; 11 - 17 ; 16 - 18 ; 03 - 04 ;
03	04 - 05 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 18 - 18 ; 12 - 15 ; 18 - 19 ;
04	07 - 07 ; 08 - 08 ; 22 - 25 ; 12 - 17 ; 12 - 15 ; 00 - 00 ;
05	07 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 12 - 17 ; 16 - 18 ; 00 - 00 ;
06	07 - 07 ; 07 - 09 ; 08 - 08 ; 11 - 17 ; 12 - 15 ; 14 - 14 ;
07	07 - 07 ; 08 - 08 ; 27 - 28 ; 13 - 20 ; 15 - 15 ; 05 - 05 ;
08	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 27 ; 16 - 18 ; 00 - 00 ; 04 - 05 ;
09	05 - 07 ; 08 - 08 ; 27 - 27 ; 12 - 16 ; 00 - 00 ; 04 - 04 ;
10	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 26 ; 12 - 17 ; 12 - 14 ; 04 - 04 ;
11	05 - 05 ; 08 - 08 ; 10 - 28 ; 11 - 11 ; 12 - 15 ; 19 - 04 ;
12	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 10 - 11 ; 12 - 16 ; 04 - 04 ;
13	05 - 05 ; 08 - 08 ; 08 - 22 ; 12 - 18 ; 22 - 22 ; 18 - 18 ;
14	07 - 07 ; 08 - 09 ; 06 - 08 ; 12 - 18 ; 13 - 13 ; 14 - 14 ;
15	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 28 ; 17 - 17 ; 11 - 14 ; 04 - 19 ;
16	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 28 ; 00 - 00 ; 14 - 17 ; 00 - 00 ;
17	00 - 00 ; 00 - 00 ; 12 - 28 ; 14 - 17 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
18	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 16 ; 14 - 18 ; 19 - 04 ;
19	07 - 07 ; 08 - 08 ; 10 - 26 ; 09 - 11 ; 13 - 18 ; 14 - 14 ;
20	07 - 07 ; 08 - 08 ; 06 - 26 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 18 - 18 ;
21	07 - 07 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 00 - 00 ; 18 - 20 ; 14 - 14 ;
22	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 12 - 18 ; 14 - 17 ; 20 - 05 ;
23	07 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 19 - 04 ;
24	07 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 12 - 18 ; 14 - 16 ; 05 - 05 ;
25	05 - 05 ; 08 - 08 ; 08 - 27 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 18 - 20 ;
26	05 - 07 ; 07 - 09 ; 08 - 25 ; 13 - 17 ; 13 - 17 ; 20 - 05 ;
27	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 25 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 05 - 07 ;
28	07 - 07 ; 07 - 08 ; 10 - 29 ; 11 - 17 ; 15 - 17 ; 20 - 20 ;
29	05 - 05 ; 08 - 11 ; 28 - 28 ; 14 - 17 ; 14 - 16 ; 00 - 00 ;
30	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 13 - 17 ; 14 - 17 ; 00 - 00 ;
31	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 12 ; 20 - 22 ; 05 - 07 ;
32	07 - 07 ; 08 - 08 ; 10 - 28 ; 13 - 16 ; 00 - 00 ; 05 - 07 ;
33	07 - 07 ; 08 - 08 ; 10 - 29 ; 00 - 00 ; 14 - 14 ; 19 - 19 ;
34	05 - 05 ; 08 - 08 ; 12 - 15 ; 16 - 19 ; 14 - 16 ; 15 - 20 ;
35	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 12 - 12 ; 16 - 18 ; 06 - 08 ;
36	05 - 05 ; 08 - 08 ; 12 - 15 ; 11 - 16 ; 14 - 16 ; 15 - 20 ;
37	05 - 07 ; 08 - 08 ; 27 - 29 ; 12 - 17 ; 19 - 21 ; 15 - 20 ;
38	05 - 07 ; 08 - 08 ; 12 - 28 ; 18 - 18 ; 17 - 19 ; 15 - 20 ;
39	05 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 11 - 16 ; 15 - 17 ; 15 - 15 ;
40	07 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 26 ; 17 - 17 ; 17 - 19 ; 15 - 20.

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Taquari - Caronal

Ind.	Genótipos
01	05 - 05 ; 08 - 08 ; 06 - 12 ; 11 - 11 ; 14 - 16 ; 16 - 20 ;
02	05 - 05 ; 08 - 08 ; 26 - 26 ; 12 - 18 ; 13 - 16 ; 16 - 16 ;
03	07 - 08 ; 07 - 09 ; 12 - 12 ; 08 - 12 ; 14 - 16 ; 00 - 00 ;
04	05 - 07 ; 08 - 09 ; 25 - 26 ; 07 - 11 ; 16 - 18 ; 05 - 08 ;
05	07 - 08 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 16 - 16 ; 16 - 18 ; 15 - 21 ;
06	05 - 07 ; 08 - 08 ; 25 - 27 ; 19 - 17 ; 18 - 20 ; 15 - 20 ;
07	05 - 07 ; 08 - 09 ; 04 - 07 ; 18 - 16 ; 13 - 15 ; 20 - 20 ;
08	05 - 07 ; 08 - 09 ; 03 - 06 ; 00 - 00 ; 14 - 16 ; 05 - 07 ;
09	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 28 ; 09 - 11 ; 16 - 18 ; 15 - 20 ;
10	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 25 ; 00 - 00 ; 15 - 17 ; 07 - 13 ;
11	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 17 - 19 ; 13 - 15 ; 04 - 07 ;
12	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 17 ; 16 - 16 ; 06 - 06 ;
13	05 - 07 ; 08 - 08 ; 07 - 25 ; 00 - 00 ; 15 - 17 ; 06 - 10 ;
14	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 12 ; 19 - 21 ; 04 - 06 ;
15	04 - 07 ; 08 - 11 ; 26 - 28 ; 12 - 12 ; 19 - 21 ; 04 - 15 ;
16	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 22 ; 13 - 13 ; 18 - 20 ; 04 - 19 ;
17	05 - 07 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 00 - 00 ; 14 - 16 ; 04 - 19 ;
18	07 - 07 ; 07 - 08 ; 00 - 00 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 04 - 19 ;
19	07 - 07 ; 07 - 09 ; 28 - 28 ; 17 - 17 ; 14 - 16 ; 00 - 00 ;
20	05 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 26 ; 18 - 18 ; 13 - 15 ; 00 - 00 ;
21	05 - 07 ; 09 - 09 ; 08 - 26 ; 12 - 12 ; 13 - 15 ; 00 - 00 ;
22	05 - 07 ; 07 - 09 ; 08 - 26 ; 00 - 00 ; 14 - 18 ; 20 - 04 ;
23	07 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 00 - 00 ; 13 - 13 ; 00 - 00 ;
24	07 - 07 ; 08 - 09 ; 00 - 00 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 04 - 20 ;
25	05 - 07 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 00 - 00 ; 13 - 15 ; 19 - 19 ;
26	07 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 11 - 17 ; 21 - 23 ; 00 - 00 ;
27	07 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 26 ; 00 - 00 ; 19 - 21 ; 00 - 00 ;
28	07 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 26 ; 13 - 18 ; 22 - 23 ; 00 - 00 ;
29	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 12 - 16 ; 00 - 00 ; 14 - 15 ;
30	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 17 - 17 ; 17 - 19 ; 15 - 16 ;
31	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 27 ; 11 - 17 ; 17 - 19 ; 04 - 11 ;
32	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 11 ; 00 - 00 ; 04 - 15 ;
33	07 - 07 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 00 - 00 ; 18 - 20 ; 04 - 14.

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Formoso

Ind.	Genótipos
01	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 27 ; 12 - 17 ; 14 - 14 ; 03 - 14 ;
02	07 - 07 ; 00 - 00 ; 08 - 26 ; 17 - 17 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
03	07 - 07 ; 07 - 09 ; 26 - 28 ; 12 - 17 ; 00 - 00 ; 14 - 16 ;
04	05 - 05 ; 07 - 09 ; 15 - 26 ; 13 - 18 ; 00 - 00 ; 04 - 14 ;
05	05 - 05 ; 08 - 08 ; 26 - 27 ; 12 - 17 ; 14 - 16 ; 04 - 15 ;
06	07 - 07 ; 08 - 09 ; 26 - 26 ; 13 - 19 ; 15 - 17 ; 03 - 14 ;
07	05 - 07 ; 08 - 09 ; 27 - 28 ; 14 - 14 ; 15 - 17 ; 14 - 18 ;
08	07 - 07 ; 08 - 09 ; 26 - 28 ; 00 - 00 ; 14 - 16 ; 03 - 03 ;
09	05 - 07 ; 08 - 08 ; 06 - 28 ; 17 - 19 ; 18 - 20 ; 19 - 19 ;
10	05 - 07 ; 07 - 08 ; 08 - 08 ; 12 - 17 ; 13 - 15 ; 05 - 12 ;
11	07 - 07 ; 07 - 08 ; 05 - 26 ; 16 - 18 ; 18 - 20 ; 05 - 11 ;
12	07 - 07 ; 00 - 00 ; 08 - 26 ; 15 - 16 ; 16 - 18 ; 04 - 11 ;
13	07 - 07 ; 00 - 00 ; 26 - 28 ; 12 - 18 ; 15 - 15 ; 03 - 16 ;
14	07 - 07 ; 00 - 00 ; 06 - 06 ; 17 - 17 ; 17 - 19 ; 06 - 12 ;
15	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 25 ; 12 - 17 ; 00 - 00 ; 05 - 11 ;
16	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 16 - 18 ; 14 - 16 ; 14 - 14 ;
17	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 25 ; 12 - 17 ; 14 - 16 ; 20 - 20 ;
18	07 - 07 ; 08 - 09 ; 06 - 06 ; 00 - 00 ; 14 - 16 ; 05 - 11 ;
19	05 - 05 ; 08 - 09 ; 27 - 28 ; 12 - 18 ; 14 - 16 ; 15 - 15 ;
20	05 - 07 ; 07 - 08 ; 10 - 28 ; 11 - 16 ; 13 - 15 ; 00 - 00 ;
21	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 25 ; 12 - 12 ; 16 - 19 ; 00 - 00 ;
22	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 26 ; 12 - 17 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
23	05 - 07 ; 07 - 09 ; 08 - 08 ; 17 - 17 ; 17 - 19 ; 00 - 00 ;
24	07 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 25 ; 16 - 16 ; 14 - 16 ; 15 - 15 ;
25	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 28 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 15 - 15 ;
26	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 26 ; 18 - 18 ; 15 - 17 ; 15 - 15 ;
27	05 - 07 ; 08 - 09 ; 08 - 08 ; 12 - 17 ; 16 - 18 ; 19 - 19 ;
28	05 - 07 ; 08 - 08 ; 27 - 28 ; 11 - 18 ; 15 - 15 ; 19 - 21 ;
29	05 - 07 ; 08 - 08 ; 27 - 27 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 22 - 20 ;
30	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 11 - 17 ; 14 - 18 ; 21 - 21 ;
31	07 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 26 ; 11 - 17 ; 14 - 16 ; 00 - 00 ;
32	05 - 07 ; 08 - 08 ; 08 - 08 ; 00 - 00 ; 13 - 16 ; 14 - 19 ;
33	05 - 07 ; 08 - 09 ; 06 - 06 ; 11 - 16 ; 15 - 17 ; 03 - 14.

Genotipagem dos indivíduos da amostragem do Rio Miranda

Ind.	Genótipos
01	05 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 18 - 18 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
02	05 - 07 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 11 - 18 ; 14 - 16 ; 00 - 00 ;
03	05 - 07 ; 08 - 08 ; 12 - 29 ; 00 - 00 ; 14 - 14 ; 00 - 00 ;
04	07 - 07 ; 08 - 09 ; 12 - 12 ; 11 - 16 ; 14 - 16 ; 00 - 00 ;
05	05 - 05 ; 08 - 08 ; 28 - 28 ; 12 - 18 ; 14 - 17 ; 00 - 00 ;
06	05 - 05 ; 08 - 08 ; 12 - 12 ; 11 - 16 ; 15 - 17 ; 00 - 00 ;
07	05 - 05 ; 08 - 09 ; 12 - 26 ; 12 - 17 ; 13 - 15 ; 00 - 00 ;
08	07 - 07 ; 08 - 08 ; 12 - 28 ; 11 - 11 ; 15 - 21 ; 00 - 00 ;
09	05 - 05 ; 08 - 09 ; 07 - 12 ; 12 - 17 ; 13 - 13 ; 00 - 00 ;
10	05 - 07 ; 08 - 09 ; 26 - 28 ; 12 - 18 ; 17 - 24 ; 00 - 00 ;
11	07 - 07 ; 08 - 09 ; 06 - 06 ; 12 - 18 ; 00 - 00 ; 00 - 00 ;
12	07 - 07 ; 08 - 09 ; 06 - 06 ; 12 - 17 ; 17 - 19 ; 00 - 00 ;
13	07 - 07 ; 08 - 08 ; 26 - 28 ; 11 - 18 ; 16 - 20 ; 00 - 00 ;
14	05 - 07 ; 07 - 08 ; 06 - 26 ; 11 - 11 ; 18 - 20 ; 00 - 00.

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](#)