



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
CAMPUS JABOTICABAL



Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma*
corruscans (Siluriformes: Pimelodidae), da Bacia Paraná-
Paraguai, por marcadores moleculares do tipo
microsatélite.

CELSO BENITES

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2008



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA
CAMPUS JABOTICABAL



Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, (Spix & Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microssatélite.

CELSO BENITES

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Aquicultura, do Centro de Aquicultura da UNESP, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Aquicultura, Área de Concentração em Aquicultura em Águas Continentais.

Jaboticabal
São Paulo – Brasil
2008

B467c Benites, Celso
Caracterização genética do pintado, *Pseudoplatystoma
corruscans* (Siluriformes:Pimelodidade) da Bacia hidrográfica Paraná-
Paraguai, por marcadores moleculares tipo microsatélite./ Celso
Benites. -- Jaboticabal, 2008
88 f.: il.; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aqüicultura da UNESP, 2008
Orientador: Fausto Foresti
Banca examinadora: Cláudio de Oliveira, Alexandre Wagner da
Silva Hilsdorf, Newton Castagnolli e Luiz Edivaldo Pezzato.

Bibliografia

1. *Pseudoplatystoma corruscans*, 2. Microsatélite, 3. Estrutura
genética. 4. Bacia Paraná-Paraguai. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de
Aqüicultura de UNESP.

CDU 639.31:575



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
REITORIA
CENTRO DE AQUICULTURA DA UNESP

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, (Spix & Agassiz, 1829) (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microssatélite.

AUTOR: CELSO BENITES

ORIENTADOR: Prof. Dr. FAUSTO FORESTI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR em AQUICULTURA pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FAUSTO FORESTI
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA
Departamento de Morfologia / Instituto de Biociências de Botucatu

Prof. Dr. LUIZ EDIVALDO PEZZATO
Departamento de Melhor e Nutri Animal / Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de Botucatu

Prof. Dr. ALEXANDRE WAGNER SILVA HILSDORF
Universidade Moji das Cruzes, SP.

Prof. Dr. NEWTON CASTAGNOLLI
Campus de Jaboticabal-Fcav / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 18 de julho de 2008.

Presidente da Comissão Examinadora
Prof. Dr. FAUSTO FORESTI

DEDICATÓRIA

Dedico esta minha conquista,

A minha mãe Dna. Rosa, amor verdadeiro, suporte de afeto, (in emorian) meu exemplo de fé, gente e perseverança...

Ao meu pai Sr. Vergílio, verdadeiro homem humilde e de caráter (in memorian), com saudades...

Aos meus queridos filhos, Afonso Celso e Camila Isabel razão de minhas eternas batalhas e ansiedade por novos desafios...

Aos meus irmãos Vilma, Vilmar, Reni e Rubens pelo eterno apoio e serem verdadeiros "cernes" em todos os momentos de minha vida.....

A Alba Maria pelos princípios, sua crença no amanhã.....E estruturação da personalidade de nossos filhos

A todos os meus treze sobrinhos que habitam meu coração.....

A Kimiko com amor, paciência e tolerância...

"Clama a mim, e responderte-ei e anunciarte-ei cousas grandes e firmes, que não sabes".

(Jeremias 33:3)

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo a Ele, DEUS, o Pai Eterno, em quem deposito toda a minha Fé inabalável e que em momento algum de minha vida, faltou-me.

Desejo expressar meus sinceros agradecimentos às Instituições e pessoas que, de alguma forma, contribuíram a execução deste trabalho, especialmente:

A minha Instituição, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, através do Departamento de Zootecnia que não mediu esforços para a minha liberação, assumindo a responsabilidade pela ausência nas minhas atividades, que o cargo requer.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela concessão da Bolsa de Estudos para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Aqüicultura da UNESP Jaboticabal por propiciar oportunidade da capacitação. E na oportunidade, um agradecimento especial à Veralice Cappato amiga e eficiente Oficial Administrativo da Pós-graduação, pela presteza de suas informações e companheirismo.

Ao Centro de Pesquisa do Pantanal (CPP) que através do Projeto da Rede Pesca e recursos do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) financiou esta Tese, propiciando a aquisição de reagentes, todos os insumos e equipamentos para realização da pesquisa.

Ao grande amigo e Vice-Reitor da UFMS Prof. Dr. Amauri de Souza, eterno incentivador e fundamental para liberação Institucional nesta minha empreitada. Também à minha Coordenadora de Pós Graduação, Profa. Dra. Marise Terezinha Lopes P. Peres pelo compromisso e zelo com a nossa Universidade, para torná-la modelo em Biotecnologia do contexto regional.

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti do Departamento de Morfologia da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, meu orientador, pelo apoio, incentivo e pela confiança em mim depositada para a consecução deste trabalho. Eu te admiro muito, você sabe.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da UNESP, Botucatu, meu co-orientador, não oficial porém de fato, pelo incentivo, grande contribuição dada e que foi extremamente importante para a realização desta pesquisa.

Ao pesquisador e emérito Prof. Dr. Luiz Edivaldo Pezzato do Departamento de Melhoramento e Nutrição Animal da UNESP, Botucatu na época do meu ingresso do Programa da Pós-graduação do CAUNESP ele era o Coordenador e muito torceu pelo pleno sucesso desta capacitação.

À pesquisadora Dra. Emiko Kawakami de Rezende do Centro de Pesquisa da Embrapa Pantanal, Corumbá (MS) minha eterna amiga, companheira, incentivadora e modelo de dedicação à pesquisa do bioma pantanal, principalmente a ictiofauna.

Ao ilustre pesquisador Prof. Dr. Fabio Edir Costa da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e Presidente da FUNDECT e CPP companheiro da Rede Pesca e das coletas no pantanal do Rio Negro.

À pesquisadora Dra. Elisabeth Romagoza do Instituto de Pesca do Estado de São Paulo, pelo constante incentivo e seriedade em seus trabalhos; minha amiga de sempre que me acompanhou à distância.

Aos colegas de departamento Prof. Dr Ruy Alberto Caetano Correa Filho, Prof. Dr. Valter Joost Von Onselen, e Alfredo Sampaio Carrijo, pelo princípio, crença e estímulo a esta capacitação.

A todos os colegas da etapa inicial deste trabalho, onde cumprimos os créditos previstos no Programa de Pós-Graduação em Aqüicultura do Caunesp. Durante vários meses vivemos em Jaboticabal e outras Instituições bons momentos do aprendizado científico e momentos de alegria e descontração; perdoem-me não relacioná-los nominalmente aqui, mas torna-se prazeroso o fato da lembrança.

Agora, um agradecimento mega especial tem que ser para a "bancada 3" do nosso Laboratório: Luiz, Alex e Jefferson, cujo envolvimento para o desenrolar deste trabalho é incontestável. Principalmente a você, Luiz, que nunca mediu esforços para pacientemente iniciar-me nos protocolos laboratoriais. Seu talento e dedicação científica tem uma iluminação Divina.

A todos os colegas que de maneira direta ou indireta compartilharam comigo esta salutar convivência científica: à galera do Tuiuiú, KNK, você é a única e igual não existe, somente você. Que Deus te conserve deste jeito, amiga, companheira e sempre de bem com a vida. Dani e Ju, galera do "sertanejo". Claudinha, Karina, Heraldo, Konrado, Danilo, Waldo, Marlon, Emanuel, Gustavo, Varvito, Fio Terra, Marcio, a Mineirinha, Lê, Gleicy, Welcy, Natália e Mahmoud. À turma do restaurante "chinês" Ricardo Paiva, Ligia Corazza e Patrícia Elda, excelentes amigades.

Aos amigos da "caserna", Igor, Heleno e recentemente Zequinha, meu obrigado. Aos companheiros do Laboratório de Ecologia, a simpatia da Ana Paula, companheiro Zanata, Zé Carioca, a esposa Fernandinha e o seu pimpolhão, bons papos. Aos servidores dos Laboratoristas Renato, Ricardo e Zé Eduardo sempre com boas histórias para contarem.

Especial agradecimento às excelentes servidoras da CPG/PROPP/UFMS Daysi e Leonora e que sempre me colocaram, com eficiência, a par de todos os compromissos junto a Coordenação de Pós-graduação/UFMS.

E, finalmente, o grande agradecimento é para o companheiro de campo "Brigido", o XimboreliAçu" responsável pelas excelentes coletas de amostras.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	1
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1 Áreas de estudo	5
2.1.1. Bacia do Alto Paraguai	5
2.1.2. Bacia do Alto Paraná	7
2.2. Considerações gerais sobre o gênero <i>Pseudoplatystoma</i>	9
2.3. Características Gerais sobre as espécies	10
2.4. Genética molecular de peixes	12
2.4.1. A importância da variabilidade genética	12
2.4.2. Marcadores microssatélites	14
3. Objetivos	18
4. Materiais e Métodos	19
4.1 Material	19
4.2. Métodos	22
4.2.1. Extração de DNA	22
4.2.2 Amplificação dos microssatélites	23
4.3. Análise estatísticas	25
4.3.1. Análise intrapopulacional	25
4.3.2.. Análise interpopulacional	25
5. Resultados	27
5.1. Análise Intrapopulacional e Variação dos Microssatélites	27

5.2 Análise Interpopulacional	31
6. Discussão	41
6.1. Análise Intrapopulacional e Variação dos Microssatélites.	41
6.2. Análises Interpopulacionais	42
7. Conclusões	53
8. Referências bibliográficas	54
9. Anexos	65

LISTA DE TABELAS

	PÁGINA
TABELA 1.- Localidades de coleta e número amostral de <i>P. corruscans</i>	19
TABELA 2.- Números de alelos por loco por população de <i>P. corruscans</i>	26
TABELA 3 - Análise da variabilidade genética intrapopulacional	28
TABELA 4 - Diferenciação genética entre populações pelo índice Fst	31
TABELA 5 - Diferenciação genética entre populações pelo índice Rst	31
TABELA 6 – Proporção de atribuição correta de cada local amostrado	33
TABELA 7 – Análise da variância molecular (AMOVA) para todas as populações(Fst) ⁰	36
TABELA 8 – Análise da variância molecular (AMOVA) para todas as populações (Rst)	36
TABELA 9 – Análise da variância molecular (AMOVA) Fst para dois grupos de populações .	37
TABELA 10 – Análise da variância molecular (AMOVA) Rst para dois grupos de populações	37
TABELA 11 – Análise da variância molecular (AMOVA) Fst para três grupos de populações	38
TABELA 12 – Análise da variância molecular (AMOVA) Rst para três grupos de populações	38
TABELA 13 – Fluxo gênico pelo Fst para grupamentos das populações	39

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
FIGURA.1.- Bacia Hidrográfica do Paraguai,Pantanal Mato-grossense	6
FIGURA 2.- Bacia Hidrográfica do Alto Paraná	8
FIGURA 3 – Exemplar de Pintado <i>Pseudoplatyatoma corruscans</i> .	10
FIGURA 4 – Mapa do Continente Sul Americano.e a Área de Estudo	21
FIGURA 5 – Localização dos pontos de coleta de <i>P. corruscans</i>	22
FIGURA 6 – Análise Bayesiana Estrutura “BAR PLOT”.	33
FIGURA 7 – Resultado da análise Structure 2.2, número de populações	34
FIGURA 8 - Árvore Neigbor-Joining (CAVALLI SFORZA & EDWARDS).	35
FIGURA 9 - Pantanaís Mato-grossense	48
FIGURA 10 - Exemplos de amplificação dos locos microssatélites	72

RESUMO

O gênero *Pseudoplatystoma* pode ser encontrado nas principais bacias hidrográficas da América do Sul e é formado por algumas das espécies de maior porte da família Pimelodidae. O "pintado", *Pseuplatystoma. corruscans*, tem uma função ecológica muito importante em seu habitat, agindo como predador voraz. É uma espécie que é muito apreciada na pesca esportiva e atinge alto valor comercial, pela qualidade de sua carne, o que leva ao desenvolvimento de grandes esforços na elaboração de programas de reprodução em cultivo intensivo, e em escala industrial. Considerando que os microssatélites constituem um dos marcadores moleculares mais importantes e apropriados para o estudo de populações e visando a avaliação e preservação da variabilidade genética da espécie, o presente trabalho teve como objetivos testar esses marcadores moleculares e avaliar a estrutura e os níveis de diversidade genética das populações naturais do pintado. Foram coletas nove populações de pintado pertencentes a rios tributários da Bacia do Paraguai, no Pantanal Mato-grossense e mais três populações da Bacia do Alto Paraná. As amostras tiveram seu DNA total extraído usando a resina Chelex®. Sete *primers* microssatélites desenvolvidos para a espécie foram testados e utilizados nas análises. Os locos foram amplificados por PCR e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6%. Posteriormente foram corados com nitrato de prata e fotodocumentados. O tamanho dos fragmentos foi estimado por comparação com o marcador Ladder de 10 bp (Invitrogen) através do programa computacional Kodak Digital Science 1D. As análises populacionais foram realizadas através dos programas PopGen 1.32, Arlequin 3.11, GeneClass2.0 e Structure 2.2. Os locos microssatélites mostraram-se altamente polimórficos e informativos para as análises populacionais, tendo sido identificados 119 alelos (média de 17 por loco). A heterosigozidade observada (H_O) variou de 0,0370 a 0,9231.

As populações apresentaram significativo desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para a maioria dos locos, para a maioria das populações, o que pode ser devido à presença de alelos nulos e ou problemas na amplificação dos mesmos. Todos os testes para estruturação populacional [F_{st} , R_{st} , AMOVA, as análises Bayesianas e análise do fluxo gênico (Nm)] mostraram-se altamente significativos ($p < 0,05$), evidenciando estruturação populacional para as 11 populações analisadas. A AMOVA mostrou ainda significativa ($p < 0,05$) estruturação em grupos, confirmada também pelo dendograma construído e pela análise de fluxo gênico (Nm), separando as populações em três grupos principais [Alto-Baixo Paraná (Paranapanema, Ivinhema e Foz do Iguaçu); Tributários do rio Paraguai (Taquari 1, Taquari 2, Cuiabá 1, Cuiabá 2 Miranda e Miranda) e Rio Paraguai (Cáceres e Corumbá)]. As análises revelaram forte estruturação populacional para as 11 populações analisadas, demonstrando que cada população deve ser considerada como uma unidade independente de conservação e manejo.

Palavras-chave: *P. corruscans*, mcrosatélites, conservação, estrutura genética, pantanal.

ABSTRACT

The genus *Pseudoplatystoma* can be found in all major river basins of South America and is composed by some of the largest species of fish the family Pimelodidae. The "pintado", *P. corruscans*, has a very important ecological role in their habitat acting mainly as a voracious predator. This species is highly appreciated in sport fishing reaching high commercial value due the quality of their meat, which leads to the development of huge efforts in the preparation and development of reproduction programs in intensive cultivation in industrial scale. Whereas the microsatellites are one of the most usefull molecular markers the populations studies in order to evaluate and conserve the genetic variability of the species, this work aimed to use these molecular markers in evaluating the structure and levels of genetic diversity of natural populations of the pintado. Nine sample belonging to tributaries of the Paraguay River Basin in the Pantanal Region Mato Grosso and three from Parana River Basin were coleted. Total DNA was extracted using the resin Chelex ®. Seven microsatellites primers developed for the species were used in the analyses. The loci were amplified by PCR and submitted to the 6% polyacrylamide gel electrophoresis. Subsequently the gels were stained with silver nitrate and fotodocumented. The size of the fragments were estimated by comparison with the label Ladder of 10 bp (Invitrogen) by the computer program Kodak Digital Science 1D. The analyses were performed with softwares PopGen 1.32, Arlequin 3.11, GeneClass2.0 and Structure 2.2. The microsatellites locis have proved highly polymorphics with the identification of 119 alleles (average of 17 per site). The observed heterozygosity (HO) ranged from 0.0370 to 0.9231. The populations showed significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for most of the loci , which may be due to the presence of null alleles or even to problems in allele amplification. All population tests for structuring (Fst,

Rst, AMOVA, Bayesian analysis and gene flow (Nm)] showed highly significant ($p < 0.05$), highlighting the existence of population structure for the 11 samples studied. The AMOVA showed significant pattern in group in structuring ($p < 0.05$) confirmed also by dendrogram and by the analysis of gene flow (Nm), which permitted to separating the samples into three main groups (Parana Basin (Paranapanema, Ivinhema and Foz do Iguacu); tributaries of the Paraguay River (Taquari 1, Taquari 2, Cuiaba 1, Cuiaba 2, Rio Negro and Miranda) and Paraguay River (Caceres and Corumbá). The analysis revealed strong population structure for the 11 samples tested, demonstrating that each population should be considered as an independent unit of conservation and management. Which may be used in the formulation of conservation programs and species management.

Key word: *P.corruscans*, microsatellite, conservation, genetic structure, pantanal.

1. INTRODUÇÃO GERAL

A espécie *Pseudoplatystoma corruscans*, comumente conhecida como pintado e surubim, tem ampla distribuição geográfica em rios da América do Sul, principalmente no Brasil nas Bacias do Alto Paraguai e Alto Paraná, onde é intensivamente pescada devido ao seu grande valor comercial.

Segundo levantamento feito pelo Plano da Bacia do Alto Paraguai (PCBAP, 1997), o maior esforço de pesca recai sobre as espécies de maior porte nos rios tributários destas bacias. Essas espécies são consideradas nobres, pois representam um troféu para os pescadores esportivos e alcançam melhores preços para os pescadores profissionais.

Embora ocorram mais de 263 espécies de peixes na região, apenas nove espécies responderam por mais de 80% de todo o desembarque pesqueiro oficialmente registrado na BAP (Bacia do Alto Paraguai), no ano de 1995: *Pseudoplatystoma corruscans*, (pintado), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara), *Paulicéia luetkeni* (jáu), *Salminus brasiliensis* (dourado), *Brycon microlepis* (piraputanga), *Prochilodus linneatus* (curimba), *Leporinus macrocephalus* (piavuçu), *Pinirampus pinirampu* (barbado) e *Pygocentrus nattereri* (piranha). No mesmo levantamento, observou-se que 45,6 % de toda a produção recaí sobre as espécies de hábitos carnívoros. Os rios Cuiabá e Paraguai juntos responderam por 67,5% de toda produção pesqueira da Bacia do Alto Paraguai (Kuno, 2003).

Os bagres do gênero *Pseudoplatystoma* como o pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e a cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*), e bagres como a jurupoca (*Hemisorubim platyrhynchos*) e o jurupensen (*Sorubin lima*) são espécies amplamente reproduzidas e criadas em confinamento na região Centro-Oeste. Tal fato decorre das

características de sabor e qualidade que possui a sua carne, isenta de espinhos intra-musculares conferindo às espécies alto valor de mercado .

Existe grande demanda pelo pescado proveniente de ambiente natural, contudo a produção decorrente da pesca não atende a esta demanda. Há ainda a se considerar a existência de legislação ambiental que prestigia a pesca turística, estabelecendo cotas mínimas para todo tipo de pescado extraído da região do pantanal. Fato este decisivo para incrementar o aparecimento de empresários investindo na aqüicultura dessas espécies selvagens. Os animais provenientes de cultivo intensivo abastecem o mercado nacional e internacional, com exportação para países europeus como Suécia e Noruega, na forma de filés e cortes selecionados. Existe, ainda, grande procura, pelos aquarofilistas por exemplares de primeira alevinagem, dessas espécies.

A conservação e uso sustentável dos recursos pesqueiros dependem de estudos da biologia, ecologia, reprodução, genética, estrutura trófica, etc. Nos últimos anos tem ocorrido aumento expressivo de interesse por estudos voltados a esta espécie, não somente devido à sua importância econômica, mas também pelo declínio acentuado que ela vem sofrendo nos rios onde anteriormente habitavam com fartura.

Nas últimas três décadas, a região do Pantanal vem sofrendo agressões pelo homem praticadas principalmente nos planaltos adjacentes. Atualmente os impactos ambientais e sócio-econômicos no Pantanal são bastante evidentes, decorrentes da inexistência de planejamento que garanta a sustentabilidade dos recursos naturais desse importante bioma. Tal fato pode ser exemplificado pelo ocorrido com o pintado dos rios tributários do alto Paraná onde seu habitat foi alterado por ações antrópicas pela construção de barragens para geração de energia elétrica, impedindo a sua migração reprodutiva.

Godinho *et al.* (2006) afirmam que a construção das barragens previstas para rios das Velhas e Abaeté, tributários do São Francisco, irão reduzir muito a abundância do surubim pela mudança da qualidade e

quantidade da água, perturbando a reprodução e eventualmente podendo levar ao desaparecimento das populações neste ambiente.

A diversidade dos recursos genéticos aquáticos, que pode ser entendida pelo conjunto da diversidade de espécies e pela própria diversidade genética dentro e entre espécies, constitui-se num componente importante da biodiversidade como um todo.

Apesar de ser uma das bacias mais importantes em termos da pesca esportiva e comercial, poucos têm sido os estudos sobre o padrão de estruturação genética de populações de peixes na bacia do Alto Paraguai.

Diante do decréscimo dos desembarques pesqueiros, um aumento na conscientização geral sobre a necessidade de conservação da diversidade biológica tem surgido nas últimas décadas (Arias *et al.*, 1995; Avise & Hamrick, 1996). Por outro lado, o aumento de áreas produtivas nos ambientes aquáticos com a expansão da aquicultura, e o futuro das populações selvagens dependem grandemente da variação genética das populações naturais (Ryman, 1991).

Entendemos que é de extrema importância o desenvolvimento de estudos não somente sob a óptica biológica, ecológica e da variabilidade genética das populações, mais entendermos que toda informação científica tem um papel estratégico não somente no manejo e conservação das espécies, como também na sustentabilidade dos ecossistemas estudados.

A variabilidade genética é de fundamental importância nos estudos de biologia básica e aplicada. É na verdade pré-requisito, tanto para o estudo de sistemas naturais como nos programas de cruzamento em organismos vegetais e animais. O estudo da variabilidade genética populacional têm sido possível devido ao desenvolvimento de vários marcadores moleculares, principalmente daqueles baseados no polimorfismo de DNA, que tem permitido o acesso à variabilidade de qualquer organismo.

Entre as técnicas modernas que utilizam os polimorfismos da molécula de DNA para o estudo de indivíduos e populações, a análise de RAPD (polimorfismos de DNA amplificados ao acaso) tem sido utilizada com grande sucesso no estudo de genética de populações de peixes (Nilsson e Schmitz, 1995; Bielawski e Pumo, 1997; Caccone *et al.*, 1997; Dergan *et al.*, 1998; Saitoh, 1998; Kuusipalo, 1999; Hatanaka, 2000; Sekine 2000; Wasko, 2000; Revaldaves, 2001).

Outro tipo de marcador genético molecular são os microssatélites caracterizados como seqüências curtas de DNA, dispersas pelo genoma nuclear de organismos procariotos e eucariotos (Tautz & Renz, 1984; Litt & Luty, 1989; Tautz, 1989). Esses marcadores têm sido amplamente utilizados em estudos populacionais com peixes (Triantafyllidis *et al.*, 2002a; Triantafyllidis *et al.*, 2002b; Chirhart *et al.*, 2005; Salgueiro *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005; Memis & Kohlmann, 2006; Mäkinen *et al.*, 2006). O uso dos microssatélites tem revelado diferenças significativas mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas (Koskinen *et al.*, 2002). Diversos estudos vêm sendo realizados em populações de peixes naturais e/ou cultivados utilizando essa metodologia.

Microssatélites são seqüências com até seis pares de bases repetidas *in tandem*. Estes marcadores têm sido considerados adequados em estudos de variabilidade genética aplicados à pesca e piscicultura por serem abundantes, apresentarem alto grau de polimorfismo, serem marcadores co-dominantes e por poderem ser analisados via PCR (*Polimerase Chain Reaction*) onde quantidades pequenas de DNA são necessárias (Wright e Bentzen, 1995).

Considera-se, assim, que a aplicação de tal metodologia na caracterização das populações do pintado, *Pseudoplatystoma corruscans* na região de ocorrência natural, formada por componentes das Bacias Hidrográficas dos Rios Paraguai e Paraná, poderão resultar em

informações importantes para o estabelecimento de diretrizes de manejo adequado e conservação destas espécies.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Áreas de estudo

2.1.1. Bacia do Alto Paraguai

O Pantanal é a maior área úmida situada na Bacia do rio Paraguai, entre os paralelos 15 e 22° Sul e os meridianos 55 e 58° Oeste, possuindo área no Estado de Mato Grosso do Sul e Mato Grosso. Ocorre a participação de 16 municípios na composição da área fisiográfica do Pantanal, sendo sete municípios no Estado de Mato Grosso, ocupando 35,36% da área do Pantanal, e nove municípios no Estado de Mato Grosso do Sul, ocupando 64,64% da área do Pantanal. Com 350.000 km², aproximadamente 80% de sua extensão encontra-se no território brasileiro, estando o restante distribuído entre a Bolívia e o Paraguai. Segundo Silva & Abdon (1998), o Pantanal Mato-grossense é composto por um cinturão de planalto no entorno de uma planície de 140.000 km² e subdividido em 11 sub-regiões. (Figura 1). O clima se caracteriza como tropical úmido, com uma estação seca bem definida de maio a setembro e uma estação chuvosa de outubro a abril.

O índice pluviométrico anual varia de 1.250 mm no norte do Pantanal, nas proximidades de Cáceres, a 1.089 mm no sul, próximo a Corumbá. A umidade média mensal do ar varia no norte do Pantanal de 84% durante a estação chuvosa a menos de 60% em junho e julho durante o final da estação seca, quando a planície inundável está seca (Tarifa, 1986). A inundação máxima ocorre mais cedo ao norte (fevereiro) e mais tardia no sul (junho), sendo que no Pantanal, o pulso de inundação corresponde a um ciclo hidrológico anual (Junk & Da Silva, 1999).

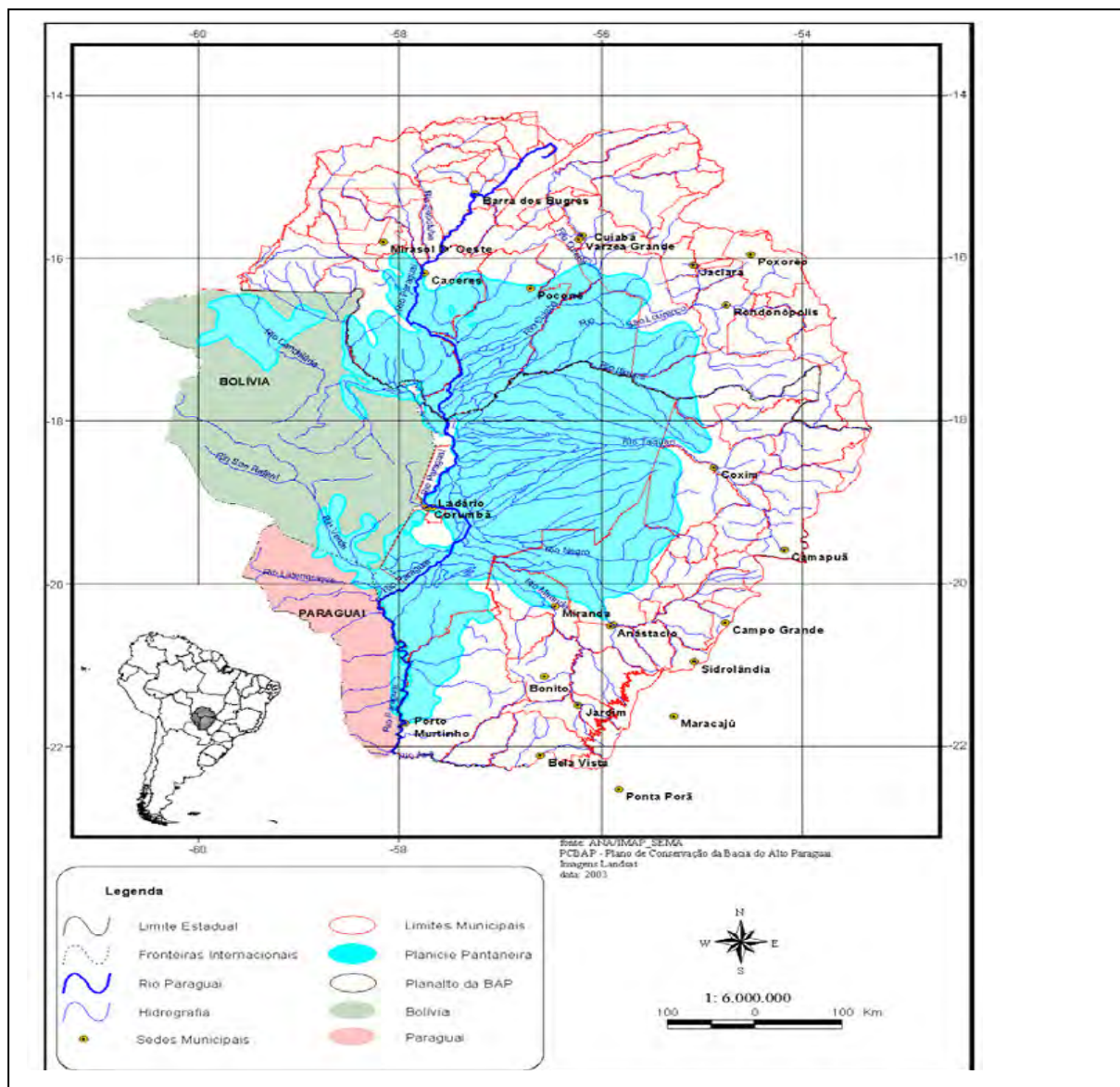


FIGURA 1: Bacia Hidrográfica do Paraguai, Pantanal Mato-grossense
 Fonte: ANA / IMAP –SEMA, PCBAP – Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai, 2003.

Os principais formadores do rio Paraguai são os rios Cuiabá, São Lourenço, Piquiri, Taquari, Miranda e Negro, todos pela margem esquerda. De modo geral o rio Paraguai e seus tributários têm drenagem lenta quando descem do planalto e encontram a planície (Alho *et al.*, 2003). Esses rios, ao entrarem no Pantanal, sofrem drástica redução de

velocidade decorrente da brusca mudança de declividade da linha de água. Em associação a este fenômeno, ocorrem deposição de sedimentos, o assoreamento no leito e perda de poder erosivo que se traduzem por menor seção de rio. Em Cáceres a vazão média do rio Paraguai é maior em março, no final do período chuvoso. Em São Francisco (montante de Corumbá) na jusante a vazão média é maior em abril e maio e pequena nos meses chuvosos. Em Porto Murtinho a vazão média é maior em junho e julho, completamente fora do período chuvoso. O comportamento de montante do rio Paraguai em Cáceres é também observado nos afluentes do rio Paraguai, como o rio Cuiabá, sendo, portanto o escoamento através do Pantanal do rio Paraguai, muito lento, em função da sua capacidade de armazenamento e baixa capacidade de escoamento. (Kawatake 2006).

2.1.2 Bacia do Alto Paraná

O Rio Paraná juntamente com seus tributários forma o maior dos sistemas fluviais que deságuam no estuário do Rio La Plata. Seu curso percorre distancia aproximada de 4.000 Km, sendo o terceiro rio em extensão das Américas, depois do Amazonas e do Mississipi. O Rio Paraná estende-se desde a confluência do Rio Grande e Rio Parnaíba até a sua desembocadura no Rio da Plata. No seu trecho inicial, recebe muitos tributários em ambas as margens e destes, os mais importantes são o Tiete, o Paranapanema e o Iguazu, todos pela margem esquerda. Percorre 877.000 Km em território brasileiro e banha as terras dos Estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Goiás (Almeida, 2002).

O Sistema do Alto Rio Paraná (doravante Alto Paraná) (Figura 2) inclui toda a drenagem do Rio Paraná à montante do antigo Salto de Sete Quedas, agora inundado pelo Reservatório de Itaipu (Bonetto, 1986; Britski & Langeani, 1988). Com aproximadamente 900 mil km², essa porção da bacia faz parte da face sul do Escudo Brasileiro e é

representada por domínios morfoclimáticos que incluem Florestas Estacionais Semidecíduais, Cerrados, Florestas Ombrófilas Mistas, Campos Rupestres e Matas de Galeria (Hueck & Seibert, 1981).

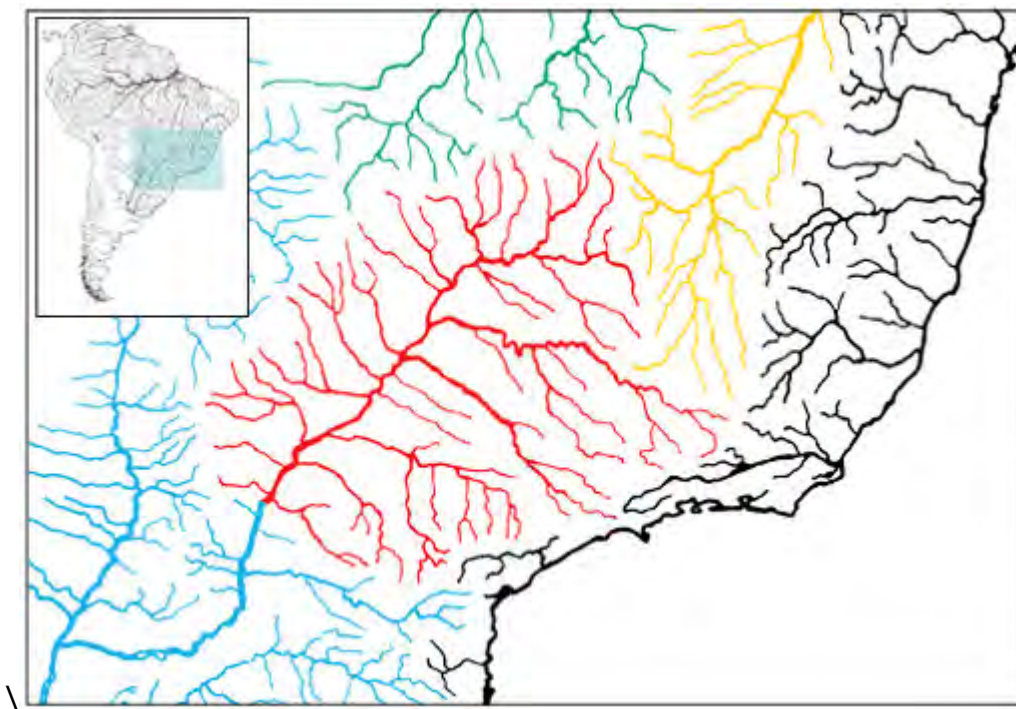


Figura 2: Bacia do Alto Paraná (vermelho) e bacias adjacentes, da região sudeste Brasil.
Fonte: <http://www.biotaneotropica.org.br/v7n3/pt/abstract?article+bn03047032007/2007>

Em razão da ocorrência de rochas cristalinas como base da estrutura geomorfológica atual, o relevo é acidentado na porção leste e sudeste da bacia do Alto Paraná. Nas demais áreas predominam formas tabulares onduladas, com suave inclinação em direção ao rio Paraná, interrompidas pelas escarpas da Serra Geral, formando o que é atualmente chamado de planalto central da bacia do Paraná, com altitudes que variam de 500 a 1.000 metros (Souza Filho & Stevaux, 1997).

2.2 Considerações gerais sobre o gênero *Pseudoplatystoma*

De acordo com Littmann & Lundberg, (2003) a posição taxonômica de *Pseudoplatystoma corruscans* é a seguinte:

CLASSE: Osteichthyes

SUBCLASSE: Actinopterygii

INFRACLASSE: Teleostei

DIVISÃO: Euteleostei

SUPER ORDEM: Ostariophysii

ORDEM: Siluriformes

FAMÍLIA: Pimelodidae

ESPÉCIE: *Pseudoplatystoma corruscans*

Buitrago (2007) fez uma revisão nas espécies do gênero *Pseudoplatystoma* anteriormente constituído por apenas três espécies, *P. fasciatum* (Linnaeus), *P. corruscans* (Spix & Agassix), e *P. tigrinum* (Valenciencis) passando atualmente para oito espécies que incluem as três anteriormente já citadas: *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau), *Pseudoplatystoma reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann) *Pseudoplatystoma orinocense* n. sp, *Pseudoplatystoma magdaleniatum* n. sp e *Pseudoplatystoma metaense* n. sp. As oito espécies formam um grupo monofilético com dois clados e foram confirmados através de sua anatomia esquelética e estudos dos músculos.

O clado (*P. tigrinum* e *P. metaense*) está restrito às Bacias do Orinoco e Amazonas. As demais seis espécies são encontradas nas Guianas, Orinoco, Amazonas e Paraná, sendo que *P. metaense* e *P. orinocense* ocorrem na bacia do Orinoco, *P. corruscans* e *P. reticulatum* são simpátricas na Bacia do Paraná; *P. madalenium* ocorre na Bacia do Madalena e *P. fasciatum* na Bacia das Guianas. No Brasil exemplares desta espécie, pintado, podem ser encontrados nas Bacias Amazônica, do Paraná-Paraguai e São Francisco.

2.3 Características Gerais sobre a espécie

A principal característica morfológica externa das espécies pertencentes à família Pimelodidae é a ausência de escamas, tendo seu corpo revestido por uma pele espessa (peixes de couro). As nadadeiras dorsal e peitoral são bem desenvolvidas, possuindo de cinco a sete raios, sendo o primeiro em forma de acúleo; a nadadeira adiposa está sempre presente. Possuem três pares de barbilhões, sendo um par maxilar e dois pares mandibulares (Santos *et al.*, 1984) (Figura 3).



Figura 3: Exemplar de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Desenho retirado de Britski *et al.* (2007).

Esses bagres raiados alimentam-se geralmente de peixes e migram entre o planalto e as planícies de inundação. Na estação da seca os peixes adultos migram para os rios do planalto durante o processo de reprodução. A água carrega os ovos, larvas e adultos fluem para as áreas rio abaixo e lá eles forrageiam em cada corpo de água que está ligada ao rio, em regiões das lagoas marginais. Se o nível da água diminui depois da estação úmida, os indivíduos já com certo tamanho voltam ao rio e nadam contra a correnteza rio acima até o planalto. Por isso é extremamente importante a conexão entre habitats inundados e o canal do rio.

A hipótese desenvolvida para explicar as inter-relações entre o ambiente dos rios subtropicais e tropicais naturais do Brasil e as populações de peixes é o conceito de pulso de inundação. O pulsar da descarga do rio que se estende deste para a planície aluvionar é a força principal que controla a biota nos rios com planícies de inundação. Tal fenômeno ocorre de forma direta, facilitando a migração dos animais ou indireta aumentando a produção primária na planície de inundação e através da estruturação de habitats (Kuno, 2003)

Em áreas alagáveis, a intensidade e duração das inundações refletem em modificações nos processos limnológicos, que irão afetar a dinâmica das populações de peixes (BARCO *et al.*, 1994). Junk (1980) enfatizou que as mudanças hidrológicas afetam não apenas a quantidade, mas também a qualidade dos alimentos para os peixes. Resende *et al.* (1995) caracterizaram a biologia de três espécies de peixes do rio Miranda, Pantanal-MS, e concluíram que o ciclo de vida foi condicionado pelo regime hidrológico e que as espécies apresentaram diferenças na distribuição espacial associadas às necessidades nutricionais. Angelini & Agostinho (2005) encontraram diferenças no valor de K para espécies sedentárias que habitam a planície de inundação do Alto Rio Paraná e que o regime de água irregular provavelmente afeta as populações destas espécies, *in* (Kawatake, 2006).

Entre os peixes desovadores totais de rios tropicais, o início da estação de cheia é o principal período de desova, permitindo as larvas se alimentarem nas planícies de inundação. A estratégia de realizar migrações entre os locais de alimentação e desova é bastante comum em desovadores totais brasileiros (Goulding, 1980; Ribeiro, 1983; Zaniboni-Filho, 1985), permitindo que algumas espécies de peixes maximizem o aproveitamento do ecossistema, buscando os melhores locais para cada uma das etapas do ciclo de vida (Cyrino J.E.P., 2004).

Em um estudo recente, Godinho *et al.* (2006) sugerem o modelo conceitual de desova e migrações de fêmeas de surubins no Rio São

Francisco. Estes organismos são migrantes dualistas, reproduzindo-se a partir de múltiplas desovas que ocorrem de novembro a março. Migração no estágio de pré-desova ocorre a partir de finais de setembro a dezembro e migrações de pós-desova ocorrem no período de janeiro a março. Migração curta e rápida é utilizada tanto para migrações no período de pré e pós-desova. De modo geral as desovas ocorrem na calha principal apenas a jusante das grandes corredeiras e para isso um afluente é selecionado entre todos os afluentes. Na época não reprodutiva, as fêmeas de surubins tendem a utilizar deslocamentos para rios menores, sendo assim, amplamente distribuídas.

2.4 Genética molecular de peixes

2.4.1 A importância da variabilidade genética

A variabilidade genética é uma condição necessária para a ocorrência das mudanças evolutivas. Novas variações são introduzidas nas populações pela ocorrência de mutações, ou como resultado do fluxo gênico determinado pelo cruzamento entre indivíduos nativos ou imigrantes geneticamente distintos. A presença da variabilidade genética herdável em características adaptativas fornece flexibilidade fenotípica a novas mudanças ambientais, tais como introdução de um predador ou repentina contaminação com patógeno ou poluente.(ALMEIDA, 2002)

A adaptação de um indivíduo em um ambiente pode ser um prognóstico da adaptação em um outro ambiente. Então, torna-se importante a conservação dos componentes herdáveis da variabilidade, responsáveis pela resposta fenotípica às mudanças ambientais, maximizando deste modo as oportunidades de sobrevivência de variedades particulares (Carvalho, 1993).

A variabilidade pode ser observada tanto pela identificação da diversidade alélica quanto pela heterozigose existente. Em populações

pequenas isoladas a variabilidade genética pode ser substancialmente reduzida pelos efeitos da deriva genética e endocruzamento, resultando na perda de alelos e declínio da heterozigose. Tais reduções podem resultar em um decréscimo da capacidade adaptativa (Ferguson *et al.*, 1995).

As espécies não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente mais semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Laikre *et al.*, 2005). Este padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referido como "estrutura genética populacional" de uma espécie (Laikre *et al.*, 2005).

A identificação da estrutura genética de uma população é possível mediante a utilização de marcadores moleculares. Técnicas de genética molecular têm sido amplamente aplicadas em estudos da distribuição da variação genética dentro e entre populações naturais de peixes, os quais têm revelado a existência de populações significativamente diferenciadas mesmo para aquelas espécies que apresentam grande vagilidade, habitando sistemas contínuos, não fragmentados (Wirth & Bernartchez, 2001; Ovenden *et al.*, 2004; Narun *et al.*, 2006; Hatanaka *et al.*, 2006, *in* Sanches (2007)).

Muito conhecimento tem sido acumulado sobre a estrutura genética populacional de espécies marinhas de grande interesse comercial, como os salmonídeos (Danielsdottir *et al.*, 1997; Narum *et al.*, 2006). No Brasil, apesar desta abordagem ainda ser relativamente nova, já existem relatos sobre a existência de estruturação populacional de peixes que habitam nossas diferentes bacias hidrográficas (Sivasundar *et al.*, 2001; Batista & Alves-Gomes, 2006; Sanches 2007).

Os avanços tecnológicos observados nas últimas décadas, na área da biologia molecular, têm possibilitado o desenvolvimento de metodologias para avaliação do DNA de forma eficiente, rápida e cada

vez menos dispendiosa. Os sistemas de detecção das diferenças nas seqüências de DNA por meio de seqüenciamento automático do DNA e de outras técnicas mais simples têm possibilitado a geração de dados importantes sobre a origem e o grau de variação genética nos seres vivos. Este nível de detalhamento tem sido relevante para discutir questões importantes sobre a conservação e o manejo genético de diversas espécies de peixes alvos ou não da pesca. (Hiltsdorf *et.al*, 2006)

Estudos genéticos em populações de peixes têm sido realizados utilizando-se marcadores bioquímicos e moleculares tais como: aloenzimas/isoenzimas, RAPD ("Randomly Amplified Polymorphic DNA" - polimorfismo de DNA amplificado ao acaso), SPAR ("Single Primer Amplification Reaction" - reação de amplificação com *primer* único), RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism" - polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição), AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism" - polimorfismo de comprimento de fragmentos amplificados), VNTR ("Variable Number Of Tandem Repeats" - número variável de repetições em tandem - minissatélites) e STR ("Short Tandem Repeats - repetições curtas em tandem") (Marques, 2002).

2.4.2 Marcadores Microsatélites

Microsatélites ou Sequências Simples Repetidas (SSRs) são as únicas seqüências genômicas repetidas em *tandem*, os quais são amplamente distribuídos no genoma ou segmentos específicos de DNA que podem ou não representar um gene, demonstrando elevado nível de polimorfismo em seus alelos. São marcadores relativamente de tamanho pequeno e facilmente amplificado por PCR (Chistiakov, 2006). Geralmente são marcadores genéticos co-dominantes, promovendo maior quantidade de informação genética por loco. São neutros em relação a efeitos fenotípicos, com mínimo ou nulo efeito epistático ou pleiotrópico; são

utilizados para caracterizar o genótipo de um indivíduo a partir de pequenas amostras ou tecidos (Ferreira & Grattapaglia 1995).

Quanto a sua estrutura molecular, os microssatélites podem ser: perfeitos ou puros, quando não apresentam interrupção em sua seqüência de repetição (ex.: CACACACACACACACA); interrompidos, quando possuem um par de bases ou uma pequena seqüência interrompendo a série de repetição (ex.:CACA CACACACATGCTCACACA); compostos, quando apresentam duas seqüências de repetições distintas lado a lado (ex.: CACACACACACACAGAGAGAGA) (Farro, 2006).

Vários microssatélites têm sido isolados e caracterizados a partir de DNA de algumas espécies de peixes, principalmente em salmonídeos (Estoup et al., 1993; Pfeiffer et al., 1997; Banks et al., 1999; Ostberg e Thorgaard, 1999). E atualmente em diferentes espécies de peixes (Chistiakov et al.2006, Poteaux et al.1999) utilizaram este marcador molecular para investigar o impacto genético da estocagem de truta marrom no mediterrâneo (*Salmo trutta*).

A abundância dos microssatélites nos animais tende a apresentar correlação positiva com o tamanho do genoma, o que parece não ocorrer com as plantas. Essa contrastante distribuição das repetições de microssatélites nos diferentes genomas indica que deve existir variação interespecífica nos mecanismos de mutação ou reparo destas repetições específicas (Ellegren, 2004).

O uso dos microssatélites se deu graças à reação da polimerase em cadeia (PCR – *Polymerase Chain Reaction*), desenvolvida por Saiki et al. (1985) e Mullis & Faloona (1987), que abriu caminho para Bechmann & Soller (1990) desenvolverem a técnica que envolve estes marcadores. Nesta técnica, as regiões contendo seqüências simples repetidas são amplificadas individualmente por meio da PCR, utilizando-se um par de *primer* específicos (de 20 a 30 bases) complementares às seqüências únicas que flanqueiam o microssatélite.

Segundo O'Relly e Wright (1995) e em revisão feita por Chistiakov *et al.*, (2006) os microssatélites exibem características que os tornam particularmente adequados como marcadores genéticos para várias aplicações em aquicultura e pesca.

A grande aplicabilidade de microssatélites em peixes pode ser evidenciada primeiramente pela quantidade de artigos disponíveis na literatura referentes ao isolamento e caracterização desses marcadores nesse grupo (Coulborne *et al.*, 1996; O'connell *et al.*, 1998; Oke *et al.*, 1999; Watts *et al.*, 1999; Iyengar *et al.*, 1999; Englbrecht *et al.*, 1999; Krieg *et al.*, 1999; Wirt *et al.*, 1999; Malloy *et al.*, 1999; Leclerc *et al.*, 1999; Pardini *et al.*, 2000; Ambali *et al.*, 2000; Taylor, 2002; Kamonrat *et al.*, 2002; Palri *et al.*, 2002; Strecker *et al.*, 2003). Apesar da grande quantidade de trabalhos que são publicados referentes ao isolamento e caracterização de seqüências microssatélites, frente à enorme diversidade de espécies de peixes de água doce brasileiras, o número de registros disponíveis ainda é pequeno, dada a diversidade e grande número de espécies que compõem a iciofauna desta região, (Calcagnotto *et al.*, 2001; Barroso *et al.*, 2003; Beheregaray *et al.*, 2004a e 2004b; Beheregaray *et al.*, 2006; Moysés *et al.*, 2005; Revaldaves *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2002 e 2006; Barbosa *et al.*, 2006; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Morelli *et al.*, 2007; Pereira, L.H.G, 2007).

Chistiakov *et al.* (2006) resalta que, no domínio da aquicultura, microssatélites são marcadores fortes, úteis para a caracterização genética de populações, seleção de geração, construção de mapas com densa vinculação, mapeamento de características quantitativas economicamente importantes (QTLs), identificando genes responsáveis por estas características e aplicação de programas de criação assistido por marcadores. Uma metodologia adequada que pode ser escolhida para a análise dos dados de genotipagem reconstrução da estrutura de ascendência e de parentesco em populações selvagens

Martins *et al.* (2006) afirma que vários estudos vem sendo desenvolvidos voltados à aqüicultura e ao cultivo, buscando a caracterização de populações e híbridos, determinação de estruturas populacionais, identificação de linhagens, determinação de variação genética em populações selvagens e cultivadas, avaliação do impacto genético pela introdução de peixes cultivados em populações naturais, determinação de estratégias para fins de criação e repovoamento e (QTLs) localização de marcadores ligados a genes envolvidos com caracteres de interesse econômico

3. OBJETIVOS

Este projeto teve por finalidade caracterizar genética e populacionalmente o pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, espécie de peixe de alto interesse econômico, capturado e explorado nos rios das Bacias do Alto Paraguai e do Paraná. A partir destas informações pretende-se identificar bancos genéticos selvagens e avaliar diferenças entre as populações das diferentes localidades.

O uso das técnicas moleculares na pesquisa pesqueira tem aumentado dramaticamente nos últimos anos devido ao desenvolvimento das técnicas e também a conscientização do valor dos dados genéticos. Nesse sentido a utilização de marcadores moleculares tem permitido avanços no conhecimento da estrutura de estoques naturais e cultivados de peixes e a preservação dos recursos genéticos das espécies será possível por meio do desenvolvimento de programas voltados especificamente com este objetivo, favorecendo subsídios para a elaboração de ações a serem implementadas nas pisciculturas que criam esta espécie, as quais poderiam interromper a degeneração do patrimônio genético existente.

Assim, são objetivos específicos do trabalho:

⇒ Analisar a distribuição da diversidade genética dentro e entre amostras selvagens de *Pseudoplatystoma corruscans*, provenientes dos componentes Bacias Hidrográficas do Alto Paraguai e Alto e Baixo Paraná.

⇒ Acessar a variação genética da espécie com a utilização de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

⇒ Sugerir o estabelecimento de delimitações de freqüências genotípicas para a espécie nestas bacias, proporcionando subsídios para a implantação de programas de manejo, conservação e utilização destes recursos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material

No período entre os anos de 1998 a 2005 foram coletados fragmentos de nadadeira caudal de 270 espécimes de *Pseudoplatystoma corruscans*, compreendendo oito localidades da região do Pantanal Mato-grossense: Rio Paraguai (Corumbá e Cáceres N=80), Negro (N=40), Cuiabá (N=35), São Lourenço (N=30), Taquari 1 e Taquari 2 (N=60), Rio Negro (N= 40) e Miranda (N=30), cujos rios são tributários da Bacia do Alto Paraguai (Figura 5). Amostras de tecidos foram retiradas também de 114 espécimes de pintado em três outras localidades da Bacia do Baixo e Alto Paraná, com o seguinte número de amostras: Paranapanema (N=53), Ivinhema (N=20), rios pertencentes à Bacia do Alto Paraná e Foz do Iguaçu (N=41), pertencente ao trecho do Baixo Paraná (Tabela 1 e Figura 4). A ictiofauna da Bacia do Alto Paraná era anteriormente isolada da fauna de peixes da porção do médio e baixo Paraná e Paraguai pelo Salto de Sete Quedas (Agostinho *et al.*, 1995; Bonetto, 1998), hoje submersos pela represa da usina de Itaipu, construída em 1987. Com a construção do reservatório de Itaipu essa barreira foi deslocada aproximadamente 150 Km à jusante.

Após as coletas, os tecidos foram preservados em etanol 95% e encaminhados ao laboratório de Biologia e Genética de peixes, do Instituto de Biociências da UNESP para as devidas análises.

Tabela 1 Localidades de coleta e número amostral de *Pseudoplatystoma corruscans* com representantes das Bacias Hidrográficas do Rio Paraguai, Alto e Baixo- Paraná.

População	Local de amostragem	Bacia Hidrográfica	Município	N Amostral
Cuiabá 1 (C1)	Rio Cuiabá	BAP	Poconé MT	35
Cuiabá 2 (C2)	Rio S. Lourenço	BAP	Cuiabá MT	30
Taquari 1 (T1)	Rio Taquari	BAP	Coxim MS	30
Taquari 2 (T2)	Rio Taquari	BAP	Corumbá MS	30
Rio Negro (RN)	Rio Negro	BAP	R. Negro MS	40
Corumbá (Co)	Rio Paraguai	BAP	Corumbá MS	40
Cáceres (Ca)	Rio Paraguai	BAP	Cáceres MT	40
Miranda (MR)	Rio Miranda	BAP	Miranda MS	30
Paranapanema (PP)	Rio .Paranapane ma	BABP	Salto Grande SP	53
Ivinhema (IV)	Rio Ivinhema	BABP	Ivinhema MS	20
Foz do Iguaçu (FI)	Rio Iguaçu	BABP	F.Iguaçu PR	41

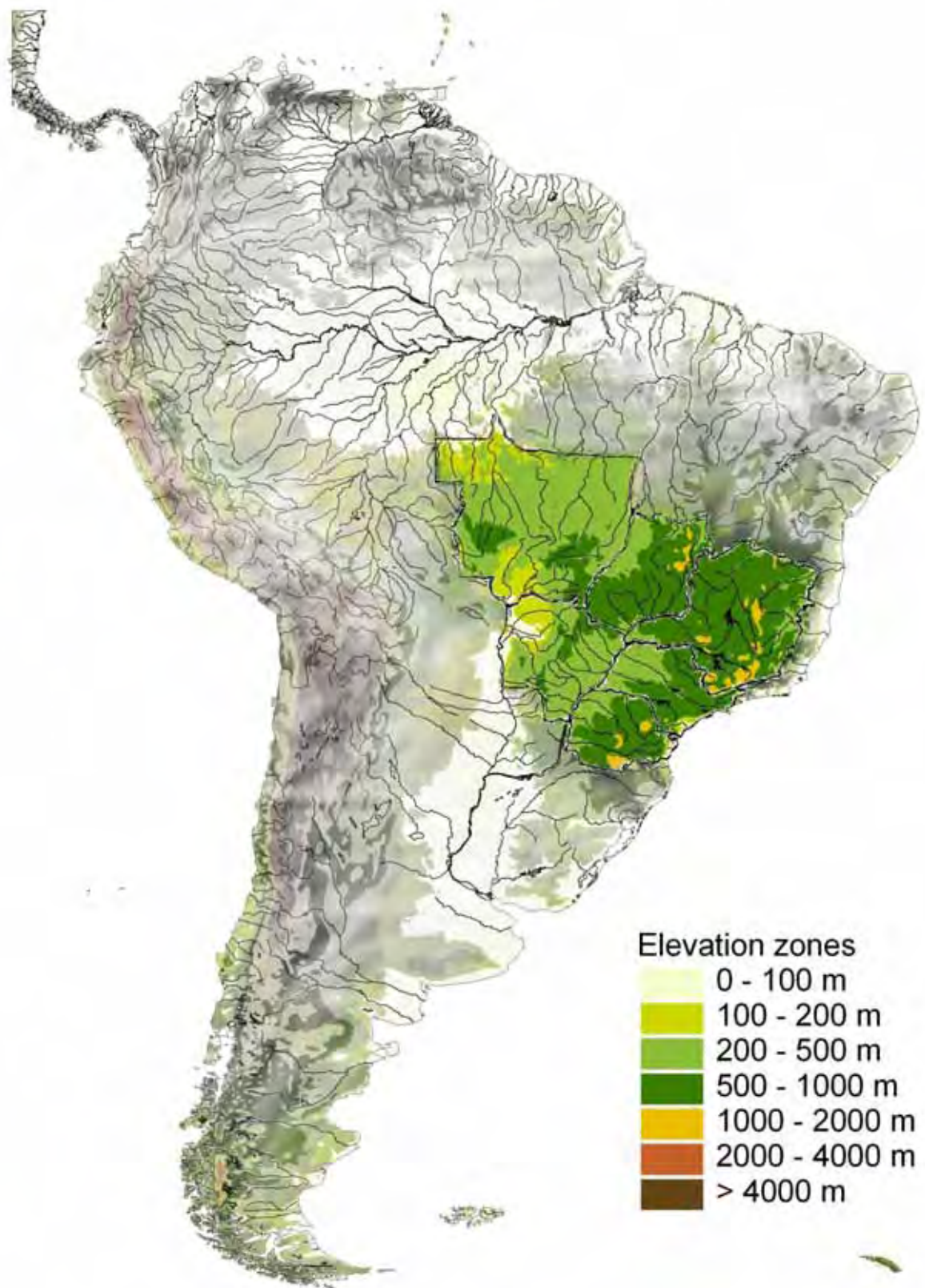


Figura 4: Mapa hidrográfico do continente Sul Americano Bacia Paraná-Paraguai. Fonte: http://silurus.acnatsci.org/ACSI/library/maps/sa_elev_and_rivers_color.jpg, Modificado: Mahmoud Mohanna 2008

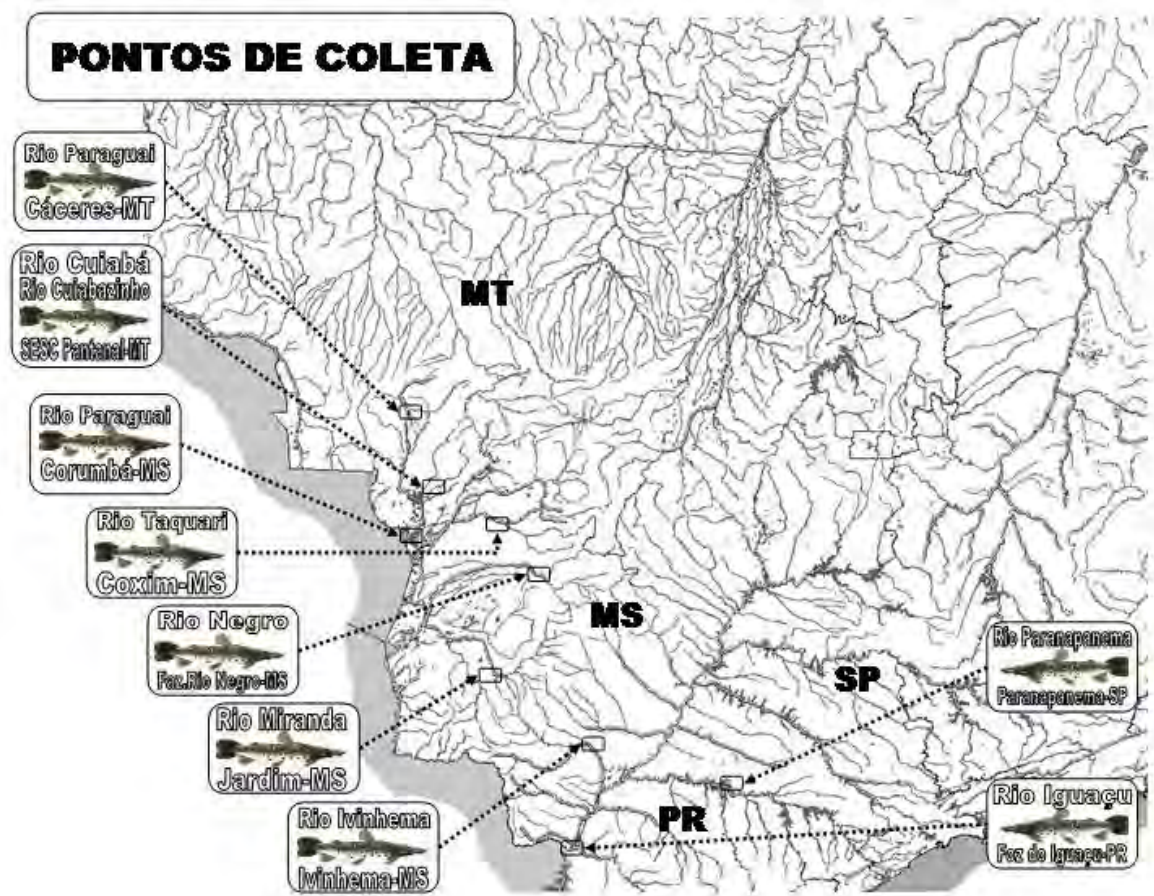


Figura 5: Localização dos pontos de coleta de *P. corruscans* nas Bacias Hidrográficas dos rios Paraná e Paraguai. Fonte: ADReis 2008

4.2 Métodos

4.2.1. Extração de DNA

Para obtenção do DNA total das amostras de pintado foi utilizada a técnica de extração com resina Chelex (*Chelex*® 100 (SIGMA) (Walsh *et al.*, 1991) de acordo com o protocolo a seguir:

- 1- Cortar aproximadamente 0,1 mg da amostra;
- 2- Acrescentar 200 µl de resina 5%;
- 3- Incubar em banho-maria à 65°C *Overnight*;

- 4- Incubar em termociclador à 95°C por 15 minutos para inativar a resina;
- 5- Centrifugar a 14000 RPM por 1 minuto;
- 6- Transferir o sobrenadante para novo tubo.

Desta forma, o DNA ficou pronto para o uso e foi mantido congelado em geladeira e freezer a 4°C.

4.2.2. Amplificação dos microssatélites

Reações em cadeia de polimerase (PCR) foram realizadas para amplificação do DNA com os seguintes reagentes: Tampão (10 X), 1,25 µl; dNTP (8 mMol), 0,3 µl; *Primer Forward* (10 µM), 0,3 µl; *Primer Reverse* (10 µM), 0,3µl; MgCl₂ (50 mM), 0,3 µl; Taq Polimerase (5 U/µl, INVITROGEN), 0,05 µl; DNA (10-30 ng/µl), 1,0 µl; Água Milli-Q Autoclavada 9,0 µl, para um volume final de 12,5 µl.

Foram utilizados sete *primers* de microssatélites específicos para o pintado, *P. corruscans*, dos quais cinco foram descritos por Revaldaves et al. (2005) (Pcor01, Pcor02, Pcor05, Pcor10, Pcor21) e dois desenvolvidos no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes – IBB – UNESP - Botucatu (Pcor23 e Pcor28) (dados ainda não publicados). Os *primers* sintetizados foram diluídos em água Milli-Q autoclavada, primeiramente para concentração 100 µM para obtenção de uma solução estoque. A partir desta solução estoque nova diluição foi realizada para concentração final para o trabalho de 10 µM.

Os fragmentos de DNA dos microssatélites foram amplificados utilizando um Termociclador (MJ Research / Modelo PTC 100™). O programa de amplificação para os quais as reações com os diferentes *primers* apresentaram melhor resultado é mostrado a seguir: para os *primers* Pcor01, Pcor02, Pcor05, Pcor21, Pcor23 e Pcor28 o programa que apresentou melhor resultado consiste em um passo inicial a 95°C por dois minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por cinco segundos, 55°C por dez

segundos, 72°C por dez segundos e um passo final a 72°C por dez minutos.

Para o *primer* Pcor10 o programa que apresentou melhor resultado consiste em um passo inicial a 95°C por cinco minutos, seguido de 30 ciclos de 95°C por trinta segundos, 49°C por trinta segundos, 72°C por trinta segundos e um passo final a 72°C por cinco minutos.

Posteriormente, 5 µl do produto foram aplicados em gel de poliacrilamida 6% com mais 5 µl tampão de carregamento (TC). As corridas foram realizadas em cuba para eletroforese com 35 pocinhos (*Wells*) usando um tampão TBE 1X.

Para a plena visualização da amplificação o gel foi submetido à coloração com nitrato de prata e processado como segue:

- 1 - Misturar as soluções fixadoras e de nitrato de prata e deixar o gel mergulhado nessa solução por 20 minutos;
- 2 - Descartar a solução anterior e lavar levemente o gel em água destilada para retirar o excesso de solução;
- 3 - Acrescentar a solução reveladora sobre o gel e observar o mesmo até chegar à coloração desejada;
- 4 - Descartar o revelador e lavar o gel com água destilada;
- 5 - Prosseguir com a fotodocumentação do gel.

Solução Fixadora

- 15 ml de álcool etílico absoluto;
- 1 ml de ácido acético 100%;
- Completar com água destilada para 150 ml.

Solução de Nitrato de Prata

- 0,3 g de Nitrato de Prata;
- Dissolver em 150 ml de água destilada.

Solução Reveladora

- 10 ml de NaOH 30%;
- 2 ml de formaldeído 100%;
- Completar com água destilada para 150 ml.

Os produtos de amplificação, após coloração com nitrato de prata foram visualizados em um transiluminador e fotografados. O tamanho dos alelos foi determinado por meio da comparação com um marcador de peso molecular conhecido (10pb DNA Ladder - Invitrogen) utilizando o programa computacional Kodak Digital Science 1D versão 3.5.4. Exemplos das amplificações dos locos microssatélites são mostrados na Figura 6.

4.3 Análises estatísticas

4.3.1. Análise intrapopulacional

Foram calculados o número de alelos por loco, a frequência de cada alelo por loco em todas as populações (Anexo 1), a heterozigosidade esperada e observada, o equilíbrio de Hardy-Weinberg, o índice de endogamia (F_{is}) e o fluxo gênico ($Nm = 0,25/(1-F_{st})/F_{st}$) utilizando-se o programa PopGen 1.32 (Yeh *et al.*, 1997). As frequências de alelos nulos para os locos que apresentaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg foram calculadas utilizando-se o programa MICRO-CHECKER 2.2.1 (Van Oosterhout *et al.*, 2004).

4.3.2. Análise Interpopulacional

Para verificar a estruturação genética das populações de *P. corruscans* foram calculados os índices F_{st} , (Weir & Cockerham, 1984), que assume o modelo de mutação de alelos infinitos (IAM) e R_{st} , (Slatkin, 1995) que assume o modelo de mutação *stepwise* (SMM) para todos os locos para todos os pares de populações utilizando-se o programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*, 2005). Sua significância foi testada por 1000 permutações. Análises de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), incorporadas ao programa Arlequin 3.01 (Excoffier *et al.*,

2005), foram utilizadas para checar a existência de grupos naturais de populações e a partição da variação molecular entre os grupos, entre as populações e dentro das populações. Para isso, as 11 populações foram analisadas e agrupadas de três maneiras: todas em um único grupo e separadas em dois e três grupos. Na divisão em dois grupos, as populações foram agrupadas em Grupo I: Cuiabá1, Cuiabá2, Taquari1, Taquari2, Rio Negro, Corumbá, Cáceres e Miranda, pertencentes à bacia do Alto Paraguai; Grupo II: Paranapanema, Ivinhema e Foz do Iguaçu pertencentes a Alto e Médio Paraná. Na divisão em três grupos, as populações foram agrupadas em: Grupo 1: Cuiabá1, Cuiabá2, Taquari 1, Taquari2, Rio Negro e Miranda, tributários do rio Paraguai; Grupo 2: Cáceres e Corumbá, ambas pertencentes à calha principal do rio Paraguai; Grupo 3: Paranapanema, Ivinhema e Foz do Iguaçu pertencentes a Alto e Baixo Paraná.

A análise bayesiana também foi utilizada para avaliar a relação parental entre as populações e seu fluxo gênico, utilizando o programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.*, 2002). O número de populações (K) foi estimado usando o modelo de ancestralidade não misturada ("no admixture") com os alelos correlacionados, para permitir uma resolução máxima na separação das populações com K variando de três a 15. Cinco corridas independentes com 500.000 simulações em Cadeias de Monte Carlo Markov (MCMC) e 100.000 gerações "burn-in" foram usadas para cada valor de K . O número exato de populações é esperado ser o valor K máximo estimado pelo modelo log-likelihood, $\log(P(X/K))$, (Falush *et al.*, 2003).

Adicionalmente, foi calculada a distância corda (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) corrigida para o tamanho das amostras utilizando o programa GENECLASS2 (Piry *et al.*, 2004). Os valores obtidos foram usados para construir uma árvore de Neighbor-Joining (Saitou & Nei 1987) usando o programa NEIGHBOUR no pacote PHILYP (Felsenstein, 2004).

5. RESULTADOS

5.1. Análise Intrapopulacional e Variação dos Microsatélites

Os microsatélites analisados apresentaram elevado polimorfismo. O número de alelos variou de seis (Pcor28) a 35 (Pcor10). Para todas as amostras foi obtido um total de 119 alelos (média de 17 alelos/loco). Quando analisadas as populações separadamente o número de alelos variou de 2 (Pcor28 – pop. Corumbá e Cáceres) a 18 (Pcor10 – pop Taquari 1 e Corumbá). Considerando todos os locos microsatélites para cada população, o número de alelos variou de 38 (pop. Ivinhema) a 61 (pop. Rio Negro e Corumbá) por população (média de 48,63 alelos/pop) (Tabela 2).

Tabela 2: Números de alelos por loco por população de *P. corruscans* Análise de populações de componentes das Bacias Hidrográficas do Rio Paraguai e do Paraná. C1=Cuiabá 1, C2=Cuiabá 2, T1=Taquari 1, T2=Taquari 2, RN= Rio Negro, CO=Corumbá, CA=Cáceres, MR=Miranda, PP=Paranapanema, IV=Ivinhema e FI=Rio Iguaçu.

	C1	C2	T1	T2	RN	CO	CA	MR	PP	IV	FI
Pcor01	4	3	3	4	6	4	4	7	4	3	4
Pcor02	11	7	4	7	8	5	8	5	10	7	9
Pcor05	7	7	8	7	9	8	9	7	9	6	9
Pcor10	16	16	18	14	12	18	13	7	8	7	17
Pcor21	8	10	8	7	13	7	7	9	11	5	7
Pcor23	8	6	8	8	10	7	9	6	10	6	9
Pcor28	3	4	5	3	3	2	2	4	6	4	4
Total	57	47	52	43	61	61	54	45	60	38	59

A heterosigozidade esperada (H_E) variou de 0,0370 (Pcor28 – pop. Cáceres) a 0,9304 (Pcor10 – pop. Corumbá) e a heterosigozidade observada (H_O) variou de 0,0370 (Pcor28 – pop. Cáceres) a 0,9231 (Pcor10 – pop. Taquari 1) (Tabela 3). As populações se apresentaram em desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para a maioria dos locos em todas as populações (Tabela II). O índice de endogamia F_{is} sugere a existência de déficit de heterozigotos para a maioria dos locos nas 11 populações analisadas (Tabela 3).

Paralelamente, foram calculadas as possíveis frequências de alelos nulos para os locos que se apresentaram em desequilíbrio de Hardy-Weinberg para cada população. As frequências variaram de 8,30% (Pcor05 – pop. Corumbá) a 34,75% (Pcor02 – pop. Cuiabá 1) (Tabela 3). A presença de alelos nulos é uma das possíveis causas da deficiência de heterozigotos na população que leva ao desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Considera-se como uma das possíveis causas da ocorrência de alelos nulos a baixa eficiência de hibridação do *primer* utilizado para amplificar o loco microssatélite devido à variação na seqüência de nucleotídeos (como mutações de ponto) em um ou em ambos os sítios de ligação desse *primer* (Callen *et al.*, 1993; Dakin & Avise, 2004). Outra possível causa da ocorrência de alelos nulos seria a amplificação diferencial dos alelos de tamanhos diferentes (Wattier *et al.*, 1998), pois, devido à competição nas reações de PCR, alelos de tamanhos menores apresentam maior eficiência de amplificação do que os maiores, de modo que somente o alelo menor seria detectado no heterozigoto. Por fim, uma terceira causa da presença de alelos nulos poderia ser atribuída à baixa qualidade do DNA molde ou quantidade insuficiente de DNA na reação.

Os resultados das análises intrapopulacionais realizadas com as onze populações de *P. corruscans*, que foram utilizados nas análises interpopulacionais são apresentados na Tabela 3 para fins comparativos.

Tabela 3: Análise intrapopulacional de frequência de alelos para marcadores do tipo microsatélites em *P. corruscans*. **n**, número de espécimes; **A**, número de alelos; **H_o**, heterozigiosidade observada; **H_e**, heterozigiosidade esperada; **F_{is}**, índice de endogamia. No equilíbrio de Hardy-Weinberg (**HWE**), **NS**, não significativo, *, significativo (P<0.05), **, significativo (P<0.01) e **r**, frequência de alelos nulos por loco.

Locos	CUIABÁ 1	CUIABÁ 2	TAQUARI 1	TAQUARI 2	RIO NEGRO	CORUMBÁ	CÁCERES	MIRANDA	PARANAPANEMA	IVINHEMA	FOZ IGUAÇU
Pcor01											
N	20	30	26	25	31	25	28	24	53	19	41
A	4	3	3	4	6	4	4	7	4	3	4
H _o	0,2500	0,0333	0,1538	0,2000	0,2903	0,2800	0,2500	0,4167	0,3774	0,5789	0,0732
H _e	0,3910	0,5418	0,4555	0,4114	0,6605	0,3486	0,5279	0,8378	0,4936	0,5391	0,3213
F _{is}	0,3443	0,9374	0,6556	0,5040	0,5532	0,1803	0,5178	0,4921	0,2282	-0,1029	0,7694
HWE (r)	** (-)	** (0,3258)	** (0,2025)	NS (0,1448)	** (0,2179)	** (-)	** (0,1768)	** (0,2217)	NS (-)	NS (-)	** (0,1854)
Pcor02											
N	28	29	26	24	23	25	28	20	51	19	38
A	11	7	4	7	8	5	8	5	10	7	9
H _o	0,1786	0,4138	0,6538	0,3333	0,3913	0,4400	0,4286	0,4000	0,6863	0,7895	0,7105
H _e	0,8208	0,8421	0,6674	0,6516	0,7894	0,6841	0,8273	0,6731	0,8410	0,7696	0,8137
F _{is}	0,7785	0,5000	0,0011	0,4776	0,4933	0,3437	0,4725	0,3905	0,1759	-0,0536	0,1151
HWE (r)	** (0,3475)	** (0,2264)	** (-)	** (0,1860)	** (0,2149)	** (0,1379)	** (0,2118)	** (0,1547)	NS (-)	NS (-)	** (-)
Pcor05											
N	29	30	30	29	27	30	30	23	52	19	38
A	7	7	8	7	9	8	9	7	9	6	9
H _o	0,7931	0,8000	0,6667	0,7586	0,7407	0,4667	0,5333	0,6522	0,6731	0,6316	0,6053
H _e	0,7689	0,7808	0,7746	0,7308	0,7421	0,6096	0,7910	0,7304	0,7758	0,6316	0,8344
F _{is}	-0,0496	-0,0420	0,1247	-0,0563	-0,0169	0,2215	0,3143	0,0873	0,1239	-0,0270	0,2649
HWE (r)	NS (-)	NS (-)	* (-)	NS (-)	** (-)	NS (0,0830)	** (0,1375)	** (NS)	** (-)	NS (-)	** (0,1196)
Pcor10											
N	27	30	26	30	25	23	27	17	44	19	27
A	12	16	18	14	12	18	13	7	8	7	17
H _o	0,5556	0,8000	0,9231	0,7000	0,4800	0,6087	0,5185	0,4706	0,2955	0,5263	0,2593
H _e	0,8896	0,9119	0,9080	0,8836	0,8653	0,9304	0,8665	0,8627	0,4598	0,7781	0,8833
F _{is}	0,3637	0,1078	-0,365	0,1944	0,4340	0,3313	0,3903	0,4380	0,3500	0,3053	0,7009
HWE (r)	** (0,1695)	NS (-)	* (-)	** (0,0904)	** (0,1991)	** (0,1578)	** (0,1794)	** (0,1996)	** (0,1094)	** (0,1316)	** (0,3255)

Continuação

Locos	CUIABÁ 1	CUIABÁ 2	TAQUARI 1	TAQUARI 2	RIO NEGRO	CORUMBÁ	CÁCERES	MIRANDA	PARANAPANEMA	IVINHEIMA	FOZ IGUAÇU
Pcor21											
N	24	28	24	28	24	24	32	29	51	19	41
A	8	10	8	7	13	7	7	9	11	5	7
Ho	0,3750	0,8214	0,4583	0,4286	0,8333	0,5833	0,5938	0,7586	0,9216	0,6316	0,6585
He	0,7739	0,8325	0,7730	0,7961	0,8892	0,7926	0,8343	0,8500	0,8226	0,7681	0,8314
Fis	0,5052	-0,0047	0,3945	0,4519	0,0429	0,2483	0,2771	0,0918	-0,1315	0,1556	0,1981
HWE (r)	** (0,2178)	* (-)	* (0,1700)	** (0,1983)	** (-)	NS (0,1085)	** (0,1320)	** (-)	** (-)	** (-)	** (0,0893)
Pcor23											
N	25	27	24	24	26	24	30	23	47	19	41
A	8	6	8	8	10	7	9	6	10	6	9
Ho	0,6400	0,3333	0,8750	0,6250	0,8462	0,4583	0,8333	0,5217	0,7021	0,5263	0,7561
He	0,7935	0,5730	0,8174	0,8236	0,8703	0,7926	0,8198	0,8019	0,7692	0,7610	0,8458
Fis	0,1770	0,4073	-0,0933	0,2250	0,0087	0,4094	-0,0338	0,3349	0,0773	0,2813	0,0951
HWE (r)	* (-)	** (0,1466)	** (-)	* (0,1004)	** (-)	NS (0,1789)	** (-)	** (0,1472)	** (-)	* (0,1233)	** (-)
Pcor28											
N	25	26	26	22	29	25	27	29	50	19	41
A	3	4	5	3	3	2	2	4	6	4	4
Ho	0,2400	0,3462	0,3077	0,2273	0,2414	0,2000	0,0370	0,3103	0,3800	0,4211	0,2439
He	0,2196	0,4457	0,6192	0,4133	0,4168	0,3502	0,0370	0,3575	0,3329	0,6017	0,3107
Fis	-0,1152	0,2081	0,4993	0,4373	0,4107	0,4172	-0,0189	0,1168	-0,1529	0,2813	0,2054
HWE (r)	NS (-)	* (-)	** (0,1864)	** (0,1258)	** (0,1194)	* (-)	NS (-)	NS (-)	*NS (-)	** (-)	NS (-)

5.2 Análise Interpopulacional

O índice F_{st} que assume o modelo de mutação de alelos nulos para as comparações de populações, apresentou valores variando de 0,01387 na comparação das populações Miranda e Cuiabá², a 0,25994 na comparação das populações Paranapanema e Corumbá, estatisticamente significativos ($p < 0,05$) (Tabela 4), revelando estruturação genética nas 11 populações de *P. corruscans* analisadas. O índice R_{st} que assume o modelo *stepwise* para todos os locos dos pares de populações consideradas, apresentou valores variando de -0,00635 a 0,29808, os quais foram estatisticamente significativos ($p < 0,05$) para 23 das 55 comparações realizadas (Tabela 5).

Tabela 4: Diferenciação genética entre pares de populações de *Pseudoplatystoma corruscans* das Bacias Hidrográficas do Rio Paraguai e do Rio Paraná para todos os locos utilizando-se o índice **F_{st}**.

	Cuiabá 1	Cuiabá 2	Taquari 1	Taquari 2	Rio Negro	Corumbá	Cáceres	Miranda	Parapanema	Ivinhema
Cuiabá 1	-									
Cuiabá 2	0,03220 *	-								
Taquari 1	0,04341 *	0,03048 *	-							
Taquari 2	0,04877 *	0,03092 *	0,03875 *	-						
Rio Negro	0,02899 *	0,03904	0,04356 *	0,02533 *	-					
Corumbá	0,15300 *	0,13577 *	0,11793 *	0,11575 *	0,14258 *	-				
Cáceres	0,16299 *	0,12978 *	0,12163 *	0,11842 *	0,12411 *	0,12296 *	-			
Miranda	0,02394 *	0,01387	0,03225 *	0,03862 *	0,03080 *	0,17747 *	0,15349 *	-		
Parapanema	0,15857 *	0,13963 *	0,15988 *	0,14059 *	0,14047 *	0,25994 *	0,22268 *	0,12181 *	-	
Ivinhema	0,11694 *	0,08270 *	0,10767 *	0,08645 *	0,09122 *	0,18725 *	0,16545 *	0,08799 *	0,10065 *	-
Foz Iguaçu	0,03402 *	0,04746 *	0,03918 *	0,02218 *	0,03306 *	0,15670 *	0,13653 *	0,06160 *	0,13073 *	0,08806 *

* significa $p < 0,05$, 1023 permutações.**Tabela 5:** Diferenciação genética entre pares de populações *Pseudoplatystoma corruscans* das Bacias Hidrográficas do Rio Paraguai e do Rio Paraná para todos os locos utilizando-se o índice **R_{st}**.

	Cuiabá 1	Cuiabá 2	Taquari 1	Taquari 2	Rio Negro	Corumbá	Cáceres	Miranda	Parapanema	Ivinhema
Cuiabá 1	-									
Cuiabá 2	0,03657	-								
Taquari 1	-0,00635	0,01100	-							
Taquari 2	0,10316 *	0,02860	0,08217 *	-						
Rio Negro	0,07079 *	-0,00678	0,08494 *	-0,02537	-					
Corumbá	-0,02882	0,00492	0,01940	-0,00245	0,05874	-				
Cáceres	0,12024 *	0,04507	0,07745 *	0,00203	0,02376	-0,00519	-			
Miranda	-0,05938	-0,18368	-0,06985	-0,20694	-0,01470	-0,05280	-0,12655	-		
Parapanema	0,29808 *	0,15399 *	0,27526 *	0,05796 *	0,13123 *	0,21209 *	0,11840 *	0,16943 *	-	
Ivinhema	0,25534 *	0,14248 *	0,23348 *	0,06064	0,10155 *	0,14812 *	0,08729 *	0,03870	-0,03777	-
Foz Iguaçu	0,14770 *	-0,03346	0,10406 *	-0,14661	0,03016	0,04698	-0,07893	0,06219	0,09375 *	-0,05992

* significa $p < 0,05$, 1023 permutações.

A análise Bayesiana realizada para avaliar os níveis de relação entre populações e a ocorrência de fluxo gênico entre elas também confirma a existência de estruturação populacional nas 11 populações de *P. corruscans* analisadas, como mostra a Figura 6.

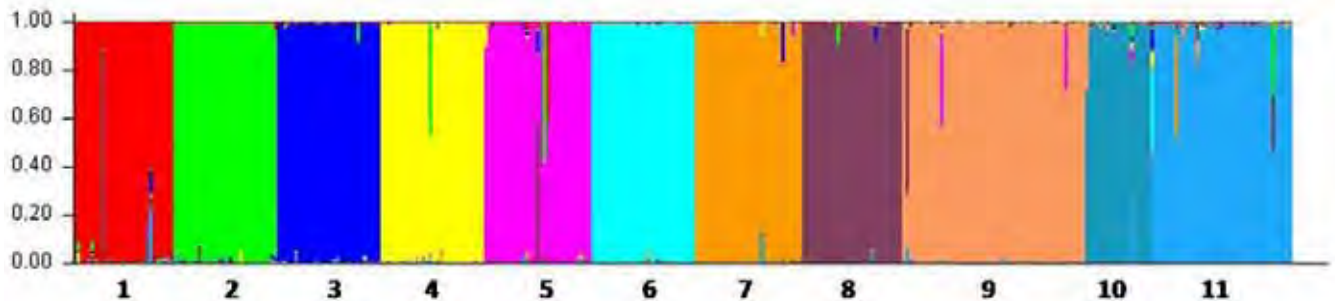


Figura 6: Estrutura "bar plot" representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam as atribuições assumindo 11 populações. 1 – Cuiabá 1; 2 – Cuiabá 2; 3 – Taquari 1; 4 – Taquari 2; 5 – Rio Negro; 6 – Corumbá; 7 – Cáceres; 8 – Miranda; 9 – Paranapanema; 10 – Ivinhema; 11 – Foz do Iguçu.

A análise da estrutura populacional obtida com o parâmetro "admixture", implementado no programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.*, 2002) também mostrou que as 11 populações são distintas, com K=11 populações estimado pelo modelo de log-likelihood (Figura 8).

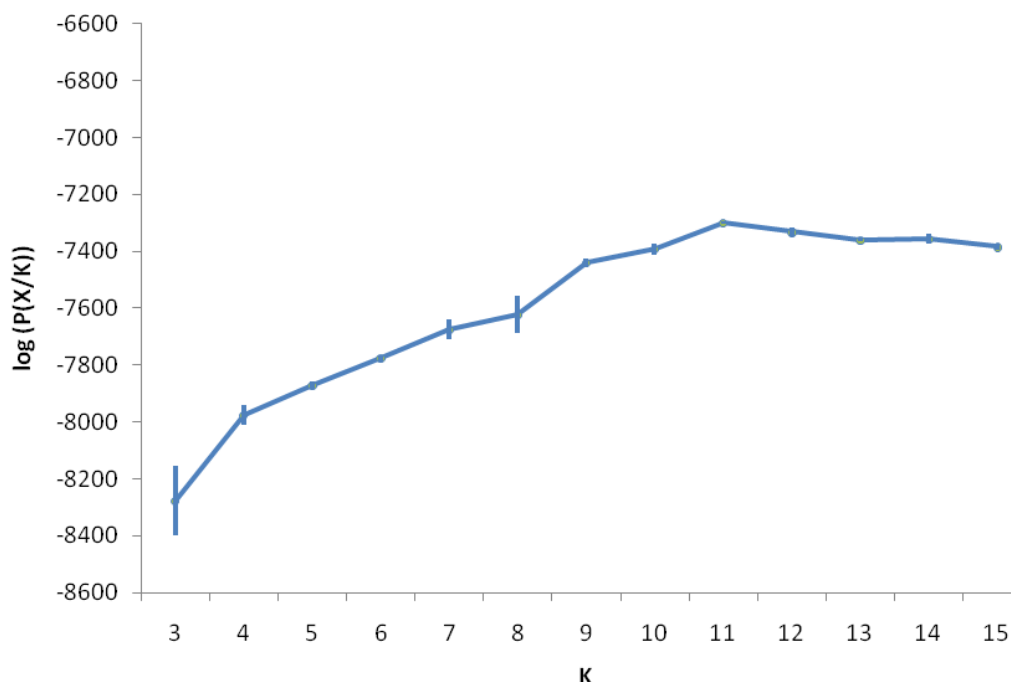


Figura 7 – Resultados da análise com Structure 2.2 da estimativa do log likelihood para o modelo log (P(X/K)) vs. O número de populações, K. Os pontos são as medias de três corridas independentes com 100.000 gerações de "burn-in" seguidas por 500.000 gerações MCMC.

Os genótipos multilocos de cada indivíduo foram utilizados em teste de atribuição, onde era calculada a probabilidade de cada indivíduo pertencer a sua população de origem (Tabela 6). Os valores de atribuição correta variaram de 92,4% (pop. Rio Negro) a 99,0% (pop. Corumbá) (Tabela 6).

Tabela 6: - Proporção de atribuição correta de cada local amostrado para cada um dos *clusters* (K=11 populações de) usando o programa Structure 2.2.

Populações	Clusters inferidos											N
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1 - Cuiabá 1	0.940	0.004	0.004	0.003	0.001	0.001	0.001	0.037	0.000	0.001	0.008	29
2 - Cuiabá 2	0.002	0.981	0.003	0.003	0.001	0.001	0.001	0.004	0.000	0.001	0.003	30
3 - Taquari 1	0.002	0.006	0.982	0.001	0.002	0.001	0.001	0.001	0.000	0.002	0.002	30
4 - Taquari 2	0.001	0.018	0.001	0.969	0.001	0.001	0.003	0.001	0.001	0.001	0.002	30
5 – Rio Negro	0.017	0.020	0.006	0.004	0.924	0.001	0.002	0.022	0.001	0.001	0.002	31
6 – Corumbá	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.990	0.002	0.002	0.000	0.001	0.001	30
7 – Cáceres	0.001	0.001	0.006	0.003	0.002	0.001	0.978	0.001	0.001	0.003	0.002	31
8 – Miranda	0.001	0.004	0.003	0.001	0.002	0.000	0.001	0.983	0.001	0.002	0.001	29
9 - Paranapanema	0.001	0.002	0.001	0.001	0.011	0.001	0.001	0.013	0.965	0.002	0.003	53
10 – Ivinhema	0.001	0.003	0.003	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001	0.019	0.949	0.016	19
11 - Foz do Iguaçu	0.002	0.009	0.004	0.004	0.001	0.009	0.011	0.008	0.005	0.003	0.944	41

O dendograma construído a partir da distância corda (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) mostra forte evidência da existência de grupos de populações, dentro dos quais as populações são geneticamente mais relacionadas (Figura 9). Assim, pode-se observar a subdivisão dos grupos Paranapanema, Ivinhema, Foz do Iguaçu (Bacia do Alto e Baixo Paraná) e Corumbá, Cáceres, Taquari 1, Taquari 2, Cuiabá 1, Cuiabá 2, Rio Negro, Miranda na análise dos componentes da Bacia do rio Paraguai. Dentro deste último ainda é possível verificar uma subdivisão em Corumbá , Cáceres , considerado como Grupo Rio Paraguai e Taquari 1, Taquari 2, Cuiabá 1, Cuiabá 2, Rio Negro , Miranda considerados como Grupo Tributários do rio do Paraguai. Como Grupo Alto-Baixo Paraná, foram agrupados os dados das populações Paranapanema, Ivinhema e Foz do Iguaçu.

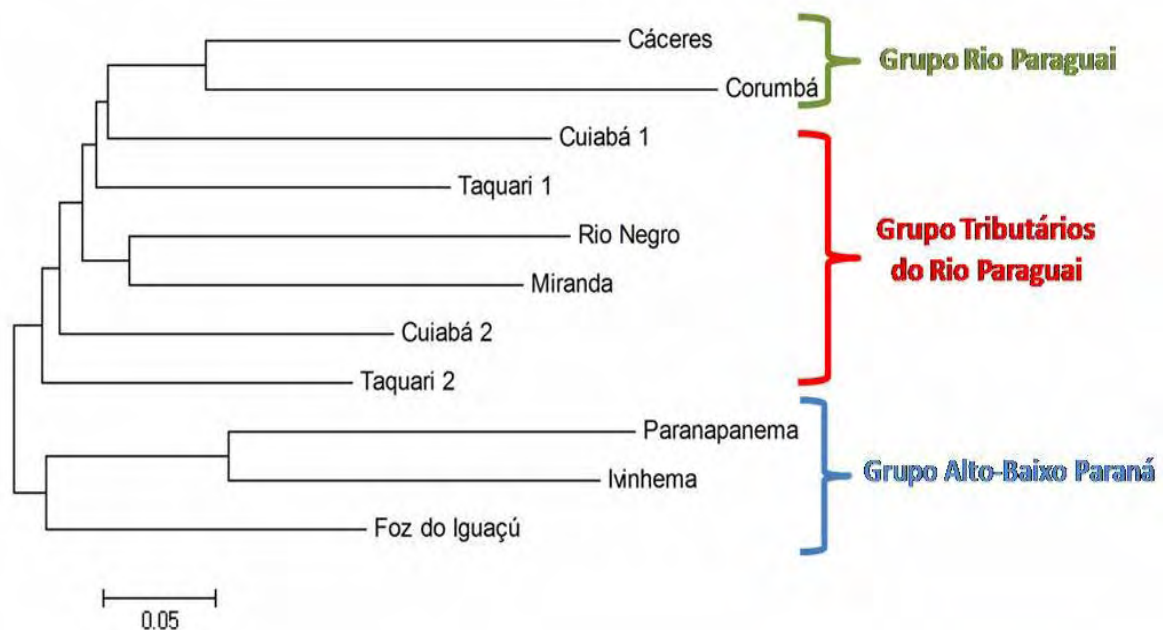


Figura 9: Árvore de neighbor-joining mostrando as relações entre as 11 populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, com base na distância corda (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967). Os grupos de populações são identificados.

A análise estatística para caracterizar grupos naturais de populações bem como a distribuição da variação molecular entre os grupos de populações, entre populações e dentro das populações. Foram consideradas todas as populações em um mesmo grupo e a subdivisão em dois e três grupos, de acordo com o evidenciado no dendograma. Quando consideradas todas as populações em um único grupo, a AMOVA revelou que a maior parte da variabilidade se encontra dentro das populações $F_{st} = 89,24\%$ e $R_{st} = 93,24\%$ (Tabelas 7 e 8, respectivamente). Os valores de variabilidade entre as populações foram $F_{st} = 10,76\%$ e $R_{st} = 6,76\%$ (Tabelas 7 e 8, respectivamente). Esses valores foram altamente significativos ($p < 0,0001$), mostrando uma forte estruturação genética nas populações de *P. corruscans*. Quando considerada a existência de dois grupos (Bacia do Alto-Baixo Paraná e Bacia do Paraguai), novamente a maior parte da variabilidade observada na AMOVA encontra-se dentro das populações, $F_{st}=87,57\%$ ($p < 0,0001$) e $R_{st}=88,55\%$ ($p < 0,0001$) (Tabelas 9 e 10). A variabilidade observada entre as populações dentro de cada grupo foi de $F_{st}=8,82\%$ ($p < 0,0001$) e $R_{st}=de 1,75\%$ ($p < 0,0001$), revelando forte estruturação genética nas populações. A variabilidade entre os grupos foi de $F_{st} = 3,61$ ($p > 0,05$) e $R_{st} = 9,71\%$ ($p < 0,01$) (Tabela 9 e 10). Esses valores mostram que além da estruturação populacional encontrada nas análises realizadas existe forte estruturação em grupos nas populações de *P. corruscans* analisadas. Quando considerada a existência de três grupos (Bacia do Alto-Baixo Paraná; Rio Paraguai e Tributários do rio Paraguai) mais uma vez a maior parte da variabilidade genética se encontra dentro das populações, com valores de $F_{st} = 87,52\%$ ($p < 0,01$) e $R_{st} = 90,74\%$ ($p < 0,01$) (Tabelas 11 e 12).

Entre as populações dentro de cada grupo os valores obtidos foram $F_{st} = 6,54\%$ ($p < 0,01$) e $R_{st} = 0,99\%$ ($p < 0,01$) (Tabelas 11 e 12), mais uma vez altamente significativos, confirmando a estruturação populacional. Os valores de AMOVA obtidos entre os grupos foram de $F_{st}=5,94\%$ ($p < 0,001$) e $R_{st}=8,28\%$ ($p < 0,05$) (Tabelas 11 e 12). Esses

valores confirmam a estruturação das populações de *P. corruscans* em três grupos distintos, como evidenciado pelo dendograma (Figura 9).

Tabela.7: Análise AMOVA considerando todas as populações de *Pseudoplatystoma corruscans* em um mesmo grupo utilizando o índice F_{st} .

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	10	169,369	0,23505 Va	10,76 *
Dentro das populações	695	1354,631	1, 94911 Vb	89,24
Total	705	1524,000	2,18414	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0,10761$				

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

Tabela 8: Análise AMOVA considerando todas as populações de *Pseudoplatystoma corruscans* em um mesmo grupo utilizando o índice R_{st} .

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre populações	10	14608,701	18,83700 Va	6,76 *
Dentro das populações	695	180446,426	259,63515 Vb	93,24
Total	705	195055,127	278,47215	
Índice de $R_{st} = 0,06764$				

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

Tabela 9: Análise AMOVA considerando dois grupos de populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, utilizando o índice F_{st} : Grupo 1: Cuiabá1, Cuiabá2, Taquari1, Taquari2, Rio Negro, Corumbá, Cáceres e Miranda (Bacia do Paraguai); Grupo 2: Paranapanema, Ivinhema e Foz Iguaçu (Bacia do Alto-Baixo Paraná).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	41,336	0,08027 Va	3,61 **
Entre populações dentro de grupos	9	127,517	0,19635 Vb	8,82 *
Dentro das populações	695	1354,631	1,94911 Vc	87,57 *
Total	705	1524,000	2,22573	

Índice de Fixação $F_{ST} = 0,12428$

*significa $p < 0,0001$; ** significa $p < 0,05$.

Tabela 10: Análise AMOVA considerando dois grupos de populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, utilizando o índice R_{st} : Grupo 1: Cuiabá1, Cuiabá2, Taquari1, Taquari2, Rio Negro, Corumbá, Cáceres e Miranda (Bacia do Paraguai); Grupo 2: Paranapanema, Ivinhema e Foz Iguaçu (Bacia do Alto-Baixo Paraná).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	1	9402,382	28,45745 Va	9,71 *
Entre populações dentro de grupos	9	5206,319	5,12330 Vb	1,75
Dentro Das populações	695	180446,426	259,63515 Vc	88,55 *
Total	705	195055,127	293,21584	

Índice de Fixação $R_{ST} = 0,11453$

* significa $p < 0,01$.

Tabela 11: Análise AMOVA considerando três grupos de populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, utilizando o índice F_{st} : Grupo 1: Cuiabá1, Cuiabá2, Taquari1, Taquari2, Rio Negro e Miranda (Tributários do Rio Paraguai); Grupo 2: Corumbá e Cáceres (Rio Paraguai); Grupo 3: Paranapanema, Ivinhema e Foz Iguazu (Alto-Baixo Paraná).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	81,049	0,13227 Va	5,94 *
Entre populações dentro de grupos	8	88,320	0,14562 Vb	6,54 *
Dentro das populações	695	1354,631	1,94911 Vc	87,52 *
Total	705	1524,000	2,22700	
Índice de Fixação $F_{ST} = 0,12478$				

* significa $p < 0,01$.

Tabela 12: Análise AMOVA considerando três grupos de populações de *Pseudoplatystoma corruscans*, utilizando o índice R_{st} : Grupo 1: Cuiabá1, Cuiabá2, Taquari1, Taquari2, Rio Negro e Miranda (Tributários do Rio Paraguai); Grupo 2: Corumbá e Cáceres (Rio Paraguai); Grupo 3: Paranapanema, Ivinhema e Foz Iguazu (Alto-Médio Paraná).

Fonte da variação	Grau de Liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variação	Porcentagem de variação
Entre grupos	2	11117,402	23,67915 Va	8,28 *
Entre populações dentro de grupos	8	3491,300	2,83168 Vb	0,99 *
Dentro das populações	695	180446,426	259,63515 Vc	90,74 *
Total	705	195055,127	286,14598	
Índice de Fixação $R_{ST} = 0,09265$				

* significa $p < 0,01$.

Os valores de fluxo gênico histórico (Nm) foram obtidos a partir do valor médio de F_{st} . O fluxo gênico médio obtido foi de $Nm=1,8719$ indicando que alguns alelos estão distribuídos em todas as populações amostradas. Os valores encontrados nas análises do fluxo gênico dentro de cada grupo (Bacia do Alto e Baixo Paraná; Rio Paraguai e Tributários do rio Paraguai) foram de $Nm=2,6008$; $Nm=2,7674$ e $Nm=4,1138$, respectivamente, indicando que o compartilhamento de alelos é maior dentro de cada área amostrada (Tabela 13).

Tabela 13: Fluxo gênico obtido a partir do valor de F_{st} ($0,25(1 - F_{st})/F_{st}$) para os grupamentos de populações para todas as populações de *Pseudoplatystoma corruscans*.

Grupamentos	Fluxo Gênico
Grupo 1: Cuiabá 1, Cuiabá 2, Taquari 1, Taquari 2, Rio Negro e Miranda (Tributários do Paraguai).	4,1138
Grupo 2: Corumbá e Cáceres (Rio Paraguai)	2,7674
Grupo 3: Paranapanema, Ivinhema e Foz do Iguaçu (Alto-Médio Paraná).	2,6008
Total: Para todas as populações	1,8719

6 DISCUSSÃO

6.1 Análise Intrapopulacional e Variação dos Microssatélites

Os locos microssatélites utilizados nas análises das populações naturais de *P. corruscans* mostraram um alto grau de polimorfismo (média de alelos = 17) consistente com a média de número de alelos observados em outras espécies de peixes (DeWoody & Avise, 2000). O desvio significativo ($p < 0,05$) do equilíbrio de HWE apresentado pela maioria dos locos nas 11 populações de *Pseudoplatystoma corruscans* analisadas (Tabela 3) pode ser devido ao déficit de heterozigotos revelados pelo índice de endogamia F_{is} , no qual os valores variam de -1 a +1, onde valores negativos indicam que há déficit de heterozigotos (Wright's, 1978) (Tabela 11). Algumas das possíveis causas do déficit de heterozigotos, conforme podem ser devido a presença entre os indivíduos das populações analisadas e a de alelos nulos. A existência de alelos nulos, parece ser problema comum em locos microssatélites (Callen *et al.*, 1993; O'Connell & Wright, 1997).

A baixa eficiência de hibridação do *primer* utilizado para amplificar o microssatélite pode ser um dos responsáveis pela detecção desses alelos, devido a uma mutação simples em um ou em ambos os sítios de ligação desse *primer* (Callen *et al.*, 1993; Dakin & Avise, 2004).

Por outra lado, fatores como a amplificação da ocorrência diferencial dos alelos de tamanhos diferentes, também poderiam ser apontados para explicar o aparecimento de tais alelos nas análises (Wattier *et al.*, 1998), pois devido à competição nas reações de PCR, alelos de tamanho menor apresentam maior eficiência de amplificação do que os de tamanho maior, de tal forma, que somente os alelos menores seriam detectados no heterozigoto. Além disso, a presença dos alelos nulos também poderia ser atribuída à baixa qualidade do DNA molde ou a quantidade insuficiente de DNA na reação.

As estimativas da presença de alelos nulos mostraram-se positivas para a maioria dos casos em que houve desvio do HWE (8,30 a 34,75% -

Tabela 3). Contudo, para alguns locos que apresentaram desvio do HWE não foram detectados, possíveis alelos nulos, indicando que as causas do déficit de heterozigotos e o conseqüente desvio do HWE poderia ser determinado por outras variáveis, tais como endogamia ou seleção positiva atuando sobre alguns alelos dos locos analisados, resultando em decréscimo na riqueza alélica.

No entanto, esse resultado é apenas uma suposição das possíveis causas dos desvios do HWE. A comprovação da existência de alelos nulos exigiria análise mais detalhada sobre os indivíduos com suspeitas de possuírem tais alelos.

6.2 Análises Interpopulacionais

Os marcadores moleculares tipo microssatélites utilizados no presente estudo revelaram a existência de estruturação genética significativa nas 11 populações analisadas, considerando-se os diferentes testes utilizados.

Os dados obtidos pelo índice de F_{ST} (0,01387 a 0,25994) (Tabela 4) demonstraram estruturação genética nas 11 populações analisadas. Segundo Writh (1978) e Hartl & Clark (1997) valores de F_{ST} entre 0 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 indicam estruturação genética moderada, valores entre 0,15 e 0,25 estruturação genética alta e valores acima de 0,25 indicam uma forte estruturação genética. Assim, esses resultados mostram estruturação genética que varia de baixa a muito alta dentro dos pares de populações analisados (Tabela 4). O índice R_{ST} apresentou valores variando de -0,00635 a 0,29808 (Tabela 5), os quais foram estatisticamente significativos para 23 das 55 comparações realizadas.

As diferenças nos resultados dos índices F_{ST} e R_{ST} se dão devido aos diferentes modelos de mutação nos quais são baseados. Enquanto o índice F_{ST} baseia-se no Modelo de Alelos Infinitivos (IAM), o índice R_{ST} baseia-se no modelo *passo a passo* SMM (Stepwise Mutation Model), o mais indicado para comparações utilizando dados de marcadores microssatélites. Assim,

espera-se que os valores de R_{ST} sob um estricto SMM, sejam maiores que os valores de F_{ST} (Slatikin, 1995).

Nos resultados apresentados observa-se que os valores de F_{ST} (Tabela 4) em sua maioria são superiores ou equivalentes aos valores de R_{ST} (Tabela 5) e este não se mostrou significativo para 32 das comparações realizadas. Tal fato pode ser explicado pela improbabilidade de que todos os locos de microssatélites pudessem ser estruturados estritamente sob o modelo de mutação SMM (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Assim, o padrão de mutação dos marcadores utilizados poderiam não seguir o modelo de mutação *stepwise*. Tal observação pode ser reforçada pelo fato de três dos locos testados possuírem repetições imperfeitas (Pcor01 $-(TC)_9GC(TC)_9-$; Pcor05 $-(TC)_8CC(TC)_{15}-$ e Pcor10 $-(GTCTG)_{15}(GT)_9(CC-)$) e dois apresentarem grandes *gaps* entre os alelos (Pcor21, que varia de 2 em 2 (unidade repetitiva) do alelo 113 ao 131 e também possui os alelos 135, 139, 141, 149, 151, 153, 157, 161. e Pcor23, que possui o alelo 94, varia de 2 em 2 (unidade repetitiva) do alelo 100 ao 120 e também possui os alelos 126, 132, 138, 140, 146). Tal padrão é ainda mais evidente para o loco Pcor10, que apresentou a maior riqueza alélica e o maior índice de alelos nulos (Tabela 3).

O loco apresenta-se altamente complexo com repetições do tipo tetra e dinucleotídica. Este loco provavelmente não obedece ao modelo de mutação do tipo *stepwise*, justificando o alto percentual de alelos nulos estimado. Tais fatos levam o índice R_{St} a apresentar fraco desempenho para detectar estruturação populacional em relação ao índice F_{St} .

Muitas pesquisas descrevem diferenciações genéticas significativas entre populações de peixes, porém com baixos valores de F_{ST} (Wirth & Bernatchez, 2001; Hatanaka *et al.*, 2006;). Geralmente, esta "fraca" diferenciação é detectada para espécies de peixes potencialmente vágéis, que apresentam grande abundância, com ampla distribuição e que não possuem barreiras visíveis ao fluxo gênico (Jorgensen *et al.*, 2006), como

ocorreu em *Brycon hilarii* da Sub-Bacia do Miranda , encontrado por Sanches, (2007)

Ultimamente, tem-se discutido muito sobre qual seria a magnitude de F_{st} que deveria refletir uma diferenciação significativa entre populações (Laikre *et al.*, 2005; Jorgensen *et al.*, 2005). Neste contexto, Laikre *et al.* (2005) alertam que, sob o contexto da conservação, é mais aconselhável considerar a existência de subdivisões populacionais do que tratar uma série de populações distintas como uma única população panmítica, o que poderia resultar em depleção da variação genética.

O dendograma construído a partir da distância corda (Cavalli-Sforza & Edwards, 1967) (Figura 9), revela forte evidência da existência de grupos de populações, dentro dos quais as populações são geneticamente mais relacionadas. Esse dado permite realizar a subdivisão em três grupos: Bacia do Alto-Baixo Paraná, Rio Paraguai e Tributários do rio Paraguai.

Para verificar a existência desses grupos de populações, a análise hierárquica de variação molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) foi realizada considerando todas as populações em um mesmo grupo e subdividida em dois e três grupos, de acordo com o evidenciado no dendograma (Figura 9).

A análise hierárquica de variação molecular (AMOVA, Excoffier *et al.*, 1992) mostrou diferenciação significativa entre as populações de *P. corruscans* quando utilizados ambos os índices (F_{ST} - IAM e R_{ST} SMM) e ambos o testes com agrupamentos (um único grupo, dois e três grupos de populações (Tabelas 7 a 12), demonstrando e confirmando a forte estruturação genética nas 11 populações analisadas. Como dito anteriormente, a AMOVA revelou a estruturação das populações em três grupos distintos, com valores de 5,94% (F_{st}) e 8,28% (R_{st}) (Tabelas 11 e 12, respectivamente).

Assim, torna-se evidente que o grupo constituído pelas populações Paranapanema, Ivinhema (Bacia do Alto Paraná) e Foz do Iguaçu (Bacia do Baixo Paraná) diferenciam-se fortemente das populações da Bacia do

rio Paraguai, como já evidenciado pelo dendograma (Figura 9) reforçado pelos índices F_{st} e R_{st} (Tabelas 4 e 5).

No período Terciário, entre o Mioceno e o Plioceno, os rios Paraná, Paraguai e Uruguai formavam uma grande bacia; no Plioceno médio ocorreu a separação entre as bacias do Paraná/Paraguai e a do Paraná, pela formação da Serra de Maracaju. Esse evento resultou na formação de um terceiro domínio hidrográfico a Bacia do Alto Paraná (Fulfaro & Suguio, 1974).

No extremo sul da Bacia do Alto Paraná encontrava-se, até recentemente, o salto de Sete Quedas, que isolava a ictiofauna do Alto Paraná e do Baixo Paraná. Esta barreira geográfica foi eliminada com o enchimento do reservatório da barragem de Itaipu, em 1982, permitindo a partir de então a miscigenação das faunas do baixo e médio Paraná para o alto Paraná e vice-versa.

Segundo Agostinho *et al.* (1994) após a inundação deste trecho do rio Paraná, pela formação do lago de Itaipu, essa barreira foi deslocada 150 Km a jusante. Além disso, algumas espécies encontradas somente no Baixo e médio Paraná (abaixo do Salto de Sete Quedas), são agora também encontradas no Alto Paraná (Agostinho *et al.*, 2003) desde a construção de uma passagem artificial de peixes junto à Represa de Itaipu (canal de piracema).

A população de *Pseudoplatystoma corruscans* estudada em Foz do Iguaçu (Rio Paraná), representa amostra de indivíduos coletados logo abaixo da barreira da Usina Hidrelétrica de Itaipu (Baixo Paraná), estando assim por esta separada das populações pertencentes a Bacia do Alto Paraná (Paranapanema e Ivinhema). As análises realizadas mostram uma relação de alta proximidade genética entre essas populações (Figura 9, Tabelas 4 e 5).

A relação entre populações de *P. corruscans* localizadas acima e abaixo do reservatório de Itaipu foi demonstrada anteriormente em um trabalho realizado por Sekine *et al.*, (2002) por meio do uso de marcadores RAPD, onde não foi verificada diferenciação entre tais

populações, indicando a possível existência de fluxo gênico entre elas. Como Itaipu constitui uma barreira efetiva para a subida de peixes do Médio ao Alto Paraná, no entanto, como discutido por Sekine *et al.* (2002), apontam para a possibilidade da existência de fluxo gênico unidirecional entre essas populações com movimentação de indivíduos do Alto para o Médio e Baixo Paraná, contribuindo assim para o estabelecimento de similaridade entre elas. Contudo, considera-se que seria necessária a realização de estudos mais detalhados, utilizando-se amostras localizadas logo abaixo do reservatório de Itaipu e com os locos microssatélites, para confirmar e estabelecer essas relações, como verificado para os dados com RAPD (Sekine *et al.*, 2002).

Os dados obtidos pelo dendograma (Figura 9) e pela AMOVA (Tabela 11 e 12) permitiram ainda verificar a ocorrência de uma subdivisão das populações da Bacia do Alto Paraguai, onde as populações de Corumbá e Cáceres formaram um grupo exclusivo da calha principal do Rio Paraguai e as populações Cuiabá 1 e 2, Taquari 1 e 2, Rio Negro e Miranda formaram um grupo de rios tributários do Rio Paraguai, sem a existência de qualquer barreira física que viesse a impedir a movimentação dos indivíduos ao longo de todo o trecho ocupado pelas águas dos rios, corixos e baías do Pantanal Mato-grossense. Esta situação é "sui generis" e passível de ocorrer, devido à existência de pulsos de inundações observados ao longo de décadas (Rezende, 1995)

O fluxo gênico médio obtido entre todas as populações analisadas foi de $N_m=1,8719$, indicando que alguns alelos ocorrem no genoma de todas as populações amostradas. O fluxo gênico dentro de cada grupo (Bacia do Alto-Baixo Paraná; Rio Paraguai e Tributários do rio Paraguai) medidos pelos valores de N_m foi de 2,6008; 2,7674 e 4,1138, respectivamente (Tabela 14), indicando que o fluxo gênico é maior dentro de cada área amostrada e confirmando, mais uma vez, a estruturação genética das populações em grupos.

Considerando que, o *P. corruscans* realiza grandes migrações durante seu ciclo de vida, a ocorrência de fluxo gênico é possível mesmo

entre populações geograficamente distantes. No entanto, embora sendo espécie migratória com grande poder de deslocamento, existe uma capacidade máxima de migração determinada para a espécie, o que pode fazer com que populações provenientes de localidades geograficamente distantes não se encontrem no período apropriado à reprodução. Além disso, deve-se levar em consideração que os períodos de migração das diferentes populações nem sempre coincidem, uma vez que as espécies necessitam de estímulos ambientais adequados para dar início à sua migração e tais condições ambientais podem variar no tempo para cada sub-região.

Tal interpretação poderia explicar o complexo contexto encontrado na região da Bacia do Paraguai, onde as nove regiões que constituem o Pantanal Mato-grossense, identificadas como diferentes pantanais têm períodos de vazantes e cheias diferentes. Devido à baixa declividade desta planície no sentido norte-sul e leste-oeste, a água que cai nas cabeceiras do rio Paraguai leva cerca de quatro meses ou mais para atravessar todo Pantanal (Figura 10).

Assim, fatores específicos regionais podem contribuir para que as diferentes populações de *P. corruscans* não tenham períodos coincidentes de desova, favorecendo a diferenciação genética entre elas. Tal postulação parece confirmada pelos resultados apresentados e que mostram forte estruturação genética entre todas as populações analisadas. No entanto, nenhum estudo específico foi realizado até o momento para determinar o poder máximo de migração que a espécie apresenta nesta região o qual poderia reforçar essa hipótese.

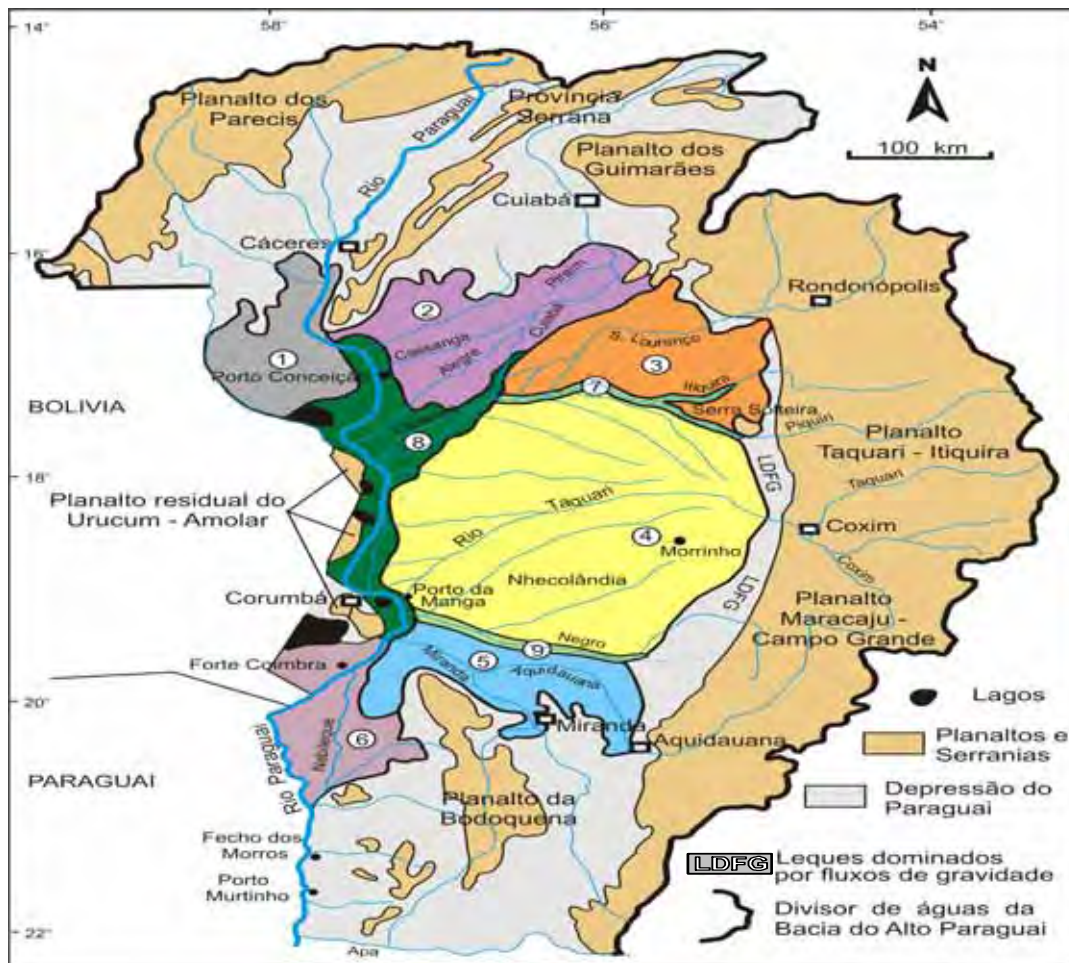


Figura 10: Pantanais Mato-grossense, 1= Corixo Grande-Paraguai, 2= Cuiabá- Bento Gonçalves, 3= São Lourenço, 4= Taquari, 5= Miranda-Aquidauana, 6= Jacadigo-Nabileque, 7= Piquiri-Itiquira, 8= Paraguai-Paiaguas e 9= Negro. Fonte: ADAMOLI, J Modificado por ADReis (2008).

Além disso, Barthem & Goulding (1997) e Resende (2003) discutem a existência de dois fluxos migratórios ao longo do ano para *P. corruscans*, tal como acontece com outros grandes bagres. Adultos de *P. corruscans* geralmente são encontrados no leito principal dos rios de janeiro a setembro (temporada de alimentação) e migram rio acima durante a sua época reprodutiva, geralmente seguindo cardumes de *Prochilodus lineatus*, que formam a sua principal fonte de alimentos, a partir de outubro a dezembro (Resende, 2003). Após a reprodução, os adultos são encontrados migrando rio abaixo no canal principal para as áreas de alimentação, enquanto que os juvenis permanecem durante algum tempo

em lagos e regiões marginais alagadas, antes de migrarem (Resende, 2003).

Cordiviola (1966), no entanto, relata que esta espécie migra rio acima no Médio Paraná, a partir de março, com a migração dos machos ocorrendo antes das fêmeas, enquanto o movimento rio abaixo ocorreria na primavera (dezembro).

Antes e depois do período reprodutivo, os peixes de uma determinada população local podem ocupar outros territórios, o que não tem relevância para a estrutura genética da população. Porém, o conhecimento do padrão de distribuição espacial dos peixes durante a fase de forrageamento pode ter grande importância, por fornecer importantes informações para o entendimento da biologia das espécies e para o desenvolvimento de programas de manejo.

Embora peixes de rios sejam geralmente sedentários (Rodríguez, 2002), várias espécies apresentam forte fidelidade ao local de origem e tendem a regressar ao local de seu nascimento após intervalos de deslocamento (Crook, 2004). Utilizando recursos de radio telemetria com marcação de 24 fêmeas de surubins, Godinho *et al.* (2006) estudaram a reprodução de *P. corruscans* no Rio São Francisco, observaram que a migração nos estágios de pré-desova ocorre durante curtas visitas. Algumas fêmeas encontradas no local de pré-desova repetidamente regressam ao mesmo local de reprodução enquanto a maioria das fêmeas no período de pós-desova deixa o local e se deslocam para cima ou para jusante. As múltiplas visitas ao sitio de desova sugerem que o surubim apresenta desovas múltiplas aumentando a possibilidade de fluxo gênico entre indivíduos e populações.

Comportamento de "homing" tem sido demonstrado em várias espécies, principalmente salmonídeos (Dittman & Quinn, 1996; Minakawa & Kraft 2005; Neville *et al.*, 2006). Recentemente, "homing" também tem sido sugerido para algumas espécies marinhas, como o tubarão blacktip (Keeney *et al.*, 2005) e de recife cardinalfish (Døving *et al.*, 2006).

Estudos envolvendo espécies migratórias na América do Sul são

escassos (Carosfeld *et al.*, 2003), especialmente os que utilizam ferramentas genéticas como marcadores e identificadores do processo de movimentação dos indivíduos. Batista e Alves-Gomes (2006), em um estudo realizado com filogeografia de *Brachyplatystoma rousseauxii* (uma das duas espécies de bagres mais importantes da pesca na Amazônia), não encontraram segregação genética associada à localização no canal principal, como seria esperado ocorrer em espécie migradora. No entanto, segundo os autores, o decréscimo significativo da diversidade genética encontrada no sentido da parte ocidental da Amazônia poderia ser explicado por escolha não aleatória de afluentes para desovar, o que sugere a ocorrência de "homing" para esta espécie.

Sanches (2007) analisando amostras de *Brycon hilarii* da sub-bacia do Rio Miranda conclui que os locos de microssatélites isolados produziram uma considerável variação genética dentro das populações e sugere que a estruturação genética da piraputanga pode estar sendo mantida por um fenômeno similar às ondas reprodutivas referidas por Jorgensen *et al.* (2005) ou por um comportamento de *homing* frequentemente observado em salmonídeos (Ryman, 1983).

Considerando os documentados movimentos de longa distância realizados pelos grandes bagres durante os períodos de alimentação e de reprodução (Barthem & Goulding 1997; Carosfeld *et al.*, 2003), principalmente de *Pseudoplatystoma corruscans* (Agostinho *et al.*, 2003; Resende, 2003), a magnitude e a escala geográfica da diferenciação genética encontradas no presente estudo indicam forte tendência de que os peixes desta espécie utilizam as suas regiões "berçários" para a reprodução.

Katawake (2006) estudando o *P. corruscans* também no Pantanal Mato-grossense, Bacia do Alto Paraguai (Rio Cuiabá e Rio Paraguai em Corumbá e Cáceres) utilizou os parâmetros de crescimento obtidos por meio de distribuições de freqüências de comprimento furcal, usando para análise a equação de Von Bertalanfy onde os resultados obtidos permitiram inferir que as amostras de Cáceres e Cuiabá eram similares e

que Corumbá apresentava diferenças na curva de crescimento, podendo representar estoques distintos e sob ameaça de sobrepesca.

O teste de atribuição (Tabela 6) realizado foi muito positivo, como demonstrado na literatura para outros grupos de peixes. O presente estudo, envolvendo a análise genética com o uso de sete locos microssatélites, demonstrou que 92,40 a 99,0% de todos os indivíduos analisados foram corretamente atribuídos as suas respectivas populações.

Em estudo realizado com populações de *Silurus glanis* envolvendo 10 locos microssatélites (F_{st} total=0,338), os autores obtiveram 98,32% de atribuições corretas (Triantafyllidis *et al.*, 2002).

Cornuet *et al.* (1999) mostrou por simulações que 100% de atribuições corretas podem ser obtidas na aplicação do método Bayesiano com o uso de 10 locos microssatélites e 10 indivíduos de cada população, quando as populações estão suficientemente estruturadas ($F_{st} \sim 0,1$).

Esses dados corroboram e estão comprovados também nos dados obtidos no presente trabalho com a apresentação do alto percentual de atribuições corretas para todas as populações.

A análise Bayesiana também confirma a estruturação populacional nas 11 populações de *P. corruscans* analisadas como mostra a Figura 7, sendo que na análise da estrutura populacional os valores obtidos para o parâmetro "admixture", implementado no programa Structure 2.2 (Pritchard *et al.* 2002) também mostrou que as 11 populações são distintas, com $K = 11$ populações estimado pelo modelo de log-likelihood (Figura 8).

A capacidade de identificar e definir biologicamente "população" é crucial para a tomada de decisões relativas à conservação e de gestão de recursos biológicos naturais (Waples & Gaggiotti 2006).

Portanto, neste estudo foram utilizados 7 locos de microssatélites polimórficos de *Pseudoplatystoma corruscans* que produziram ampliações bastante consistentes, podendo ser analisados em gel de poliacrilamida, sem que se necessite de grandes demandas financeiras. Estas características os tornam ferramentas potencialmente úteis para

estudos de populações naturais ou de cultivo intensivo tanto para a espécie quanto para outras espécies do gênero.

Considerando a importância ecológica e econômica de *Pseudoplatystoma corruscans*, os dados apresentados são particularmente importantes para serem considerados na implantação de programas de gestão e conservação e destacam a necessidade de preservação dos diferentes "habitats" desta espécie para garantir a diversidade genética ainda existente.

É fundamental, que as políticas de preservação das espécies se preocupem com a variabilidade genética como um todo para que não preservemos apenas espécies "aleijadas geneticamente", que permanecerão indefinidamente sob custódia de nossa espécie. A ciência tem sido usada mais freqüentemente no estudo de espécies com populações já muito reduzidas, muitas vezes em fase terminal. Portanto consideramos que seria um uso muito mais inteligente dos recursos a prevenção do processo de extinção através da prevenção ambiental. E este trabalho pode dar esta contribuição, mostrando a estruturação genética existente ao longo do bioma das duas Bacias Hidrográficas estudadas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:



Os marcadores moleculares do tipo microssatélite mostraram-se ferramentas eficientes para a análise da diversidade e estruturação genética em populações selvagens de *Pseudoplatystoma corruscans* das Bacias dos Rios Paraguai e Paraná (Regiões Alto e Baixo Paraná).



Os caracteres moleculares utilizados mostraram-se altamente informativos contribuindo para interpretações evolutivas e para patentear a existência de populações definidas bem estruturadas e não panmíticas nos dois sistemas hidrográficos estudados.



Os resultados obtidos podem fornecer subsídios para o estabelecimento de políticas e programas de conservação desta espécie por possuírem características próprias.



Esses resultados podem ser disponibilizados para estudos relacionados a manejo da pesca contribuindo com a genética das espécies exploradas comercialmente, na piscicultura. contribuir para a formação de bancos genéticos naturais e pela possibilidade da diferenciação entre espécies selvagens e híbridos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS *

AGOSTINHO, A. A.; VAZZOLER, A.E.A.M.; THOMAZ, S.M. The High River Paraná Basin: limnological and ichthyological aspects. In: TUNDISI, J.G.; BICUDO, C.E.M.; TUNDISI, T.M. (Eds). **Limnology in Brazil**. Rio de Janeiro:ABC/SBL, p.59-103, 1995.

AGOSTINHO, A. A., *et al.* Migratory fishes of upper Paraná river basin Brazil. In: Carosfeld, J., *et al.* eds **Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status**. Victoria: World Fisheries Trust, pp. 19-98. 2003.

ALHO, C.; STRÜSMANN, C.; VOLPE, M. SONODA, F.; MARQUES, A.A.B.; SCHNEIDER, M.; JUNIOR, T.S.S.; MARQUE, S.R. 2003. **Conservação da biodiversidade da Bacia do Alto Paraguai**. Coordenação de Cleber Alho, Ed. UNIDERP, 449p.--Campo Grande—MS.

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

ARIAS, J.; SANCHEZ L.; MARTINEZ P. Low stocking incidence in brown trout populations from northwestern Spain monitored by LDH-5* diagnostic marker. **Journal of Fish Biology**, 47, p.170-176, 1995.

AVISE, J. C.; HAMRICK J. L. **Conservation Genetics. Case Histories from Nature**. New York : Chapman & Hall, 1996.

BALLOUX, F. *et al.* Microsatellite scan be misleading: an empirical and simulation study. **Evolution**, 54, p.1414-1422, 2000a.

BALLOUX, F.; Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology**, 11, p.155-165, 2002.

BARBOSA, A. C. D. R. *et al.* Thirteen polymorphic microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Molecular Ecology Notes**, 6 (3): 936-938. 2006.

BARCO, M.V.; PETRERE-JUNIOR, M. 1994. Crescimento del Bocachio *Prochilodus magdalene* Steindachner 1878 (Prochilodontidae), y su relacio com el regimen hidrológico em la parte baja de la cueca del rio Magdalena (Colômbia). **Boletim Científico INPA**, n.2, v.27, p. 136-152.
BARMAN, H. K. *et al.* Genetic variation between four species of Indian major carps as revealed by random amplified polymorphic DNA assay. **Aquaculture**, 217, p.115-123, 2003.

BARTHEM, R. & GOULDING, M. **The catfish connection: ecology, migration, and conservation of Amazon predators.** New York: Columbia University Press. 144 pp. 1997.

BÁRTFAI, R. *et al.* Genetic analysis of two common carp broodstocks by RAPD and microsatellite markers. **Aquaculture**, 219, p.157-167, 2003.

BONETTO, A. A. Panorama sinóptico sobre la ictiofauna, la pesca y piscicultura en los ríos de la cuenca del Plata, con especial referencia al Paraná. **Revista de Ictiología** 6:3-16, 1996.

BARROSO R. M. *et al.* Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. **Aquaculture**, 247, p.51-65, 2005.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S. *et al.* Identification and characterization of microsatellites loci in *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) **Mol. Ecol. Notes**, v.3, p.297-298, 2003.

BATISTA, J. S.; ALVES-GOMES, J. A. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of "homing" for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, 5(4): 723-740. 2006.

BEACHAM, T. D.; DEMPSON, J.B. Population structure of Atlantic salmon from the Conne River, Newfoundland as determined from microsatellite DNA. **Journal of Fish Biology**, 52, p.665-676, 1998.

BUITRAGO-SUÁREZ, U.A.; BROOKS M. B. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriformes: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v.1512, p.1-38, 2007. Disponível em: "<http://www.mapress.com/zootaxa/2007/pdf>". Acesso em: 30/01/2008.

BUITRAGO-SUÁREZ, U.A. Anatomia comparada y evolución de las especies de *Pseudoplatystoma* Bleeker 1762. **Revista Academia Colombiana de Ciencias**, Vol. XXX, N. 114, 117-141. Burgess, W.E. (1989) An Atlas of Freshwater and Marine Catfishes: a Preliminary Survey of the Siluriformes. T. F. H. 2006.

CALLEN, D. F. *et al.* Incidence and origin of "null" alleles in the (AC)_n microsatellite markers. **American Journal of Human Genetics**, 52, p.922-927, 1993.

CAROLSFELD, J., HARVEY, B., B., ROSS, C & BAER, A.. Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status. Victoria: World Fisheries Trust. 388 pp. 2003.

CARVALHO, G. R. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. **J. Fish Biol.**, v.43 (Suppl.A), p.53-73, 1993.

CASTILLO, A. G. F.; ALVAREZ, P.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Population structure of *Merluccius merluccius* along the Iberian Peninsula coast. **Journal of Marine Science**, 62, p.1699-1704, 2005.

CHAMBERS, G. K.; MACAVOY, E. S. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, 126, p.455-476, 2000.

CHIRHART, S. E.; HONEYCUTT, R. L.; GREENBAUM, I. F. Microsatellite variation and evolution in the *Peromyscus maniculatus* species group. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 34, p. 408-415, 2005.

CHISTIYAKOV D, A.;HELLEMANS, B.; VOLCKAERT F A.M.; Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special references to fish genetics. **Aquaculture** 255. 1- 29. 2006.

CRANDALL, K. A. *et al.* Considering evolutionary processes in conservation biology. **Tree**, 15, p.290-295, 2000.

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

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

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.;QUATTRO, J. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131, p.479-491, 1992.

EXCOFFIER; LAVAL, L. G.; SCHNEIDER, S. Arlequin version: 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bio informatics** Online, 1, p.47-50, 2005.

FERNANDEZ, D. R. **Grau de seletividade da escada de peixes do projeto experimental canal de migração da Itaipu binacional.** Tese (Doutorado) - 152 f. Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2000.

FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA, D.. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética.** EMBRAPA - CENARGEM, 2ª edição, Brasília (DF). 1996.

FERGUSON, A. *et al.*, The application of molecular markers to the study and conservation of fish population, with special reference to Salmo. J. **Fish Biol.**, 47 (Suppl. A):102-126. 1995.

FINK, S. V.; FINK, W. L. Interrelation ships of the ostariophysan fishes (Teleostei). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 72, p.297-353, 1981.

GODINHO. A.L.; KYNARD B.; GODINHO, H.P.; Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*) in São Francisco river,

Brazil. **Environ Biol Fish Springer Science – Business Media B.V.** 2006.

GODINHO H.P. et al. Fish ladder efficiency in a southeastern Brazilian river. **Ciência e Cultura.**, 43, p.63-67, 1991.

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

HARTL, D. L.; CLARK, A.G. **Principles of population genetics.** 3. ed. Canadá: Sinauer, 542 p. 1997.

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

HEGGENES, J. et al. Microsatellite diversity assessment of brown trout *Salmo trutta*, population structure indicate limited genetic impact of stocking in a Norwegian alpine lake. **Ecology of Freshwater Fish**, 11, p.93- 100, 2002.

HERWERDEN, L. et al. Development and application of microsatellite markers for *Scomberomorus commerson* (Perciformes; Teleostei) to a population genetic study of Arabian Peninsula stocks. **Fisheries Research**, 79, p.258-266, 2006.

HILSDORF, A W S, MARQUES, D K S, REZENDE, E K de **Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas.**– Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 43p.;(Documentos)

JUNK, W.J. & DA SILVA, C.J. Neotropical floodplains: a comparison between the Pantanal of Mato Grosso and large Amazonian river floodplains. In: TUNDISI, J.G. et al. (Ed.). **Limnology in Brazil.** Rio de Janeiro: ABC/SBL, p.195-217. 1995.

KARLSSON, S.; MORIK, J. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. **Journal of Marine Science**, 62, p.1588-1596, 2005.

KAWATAKE, H. S. **Variação espacial na dinâmica das populações do pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*- Agassiz, 1829) na Bacia do Alto Paraguai**. Dissertação. Universidade Federal do Mato Grosso. 41 p. 2006.

KOSKINEN M. T. *et al.* Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. **Heredity** ,88, p.391-401, 2002.

KUNO, R. **Avaliação da contaminação por mercúrio em peixes do Alto Pantanal**. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Saúde Pública, USP. 99 p. 2003

LAIKRE, L.; PALM, S.; RYMAN, N.. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. **Ambio** 34 (2): 111- 119. 2005

LITT, M.; LUTY, J. A. A hypervariable microsatelliterevealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, 44, p.397-401, 1989.

LIU, Y. *et al.* Genetic diversity in three Japanese flounder (*Paralichthys livaceus*) populations revealed by ISSR markers. **Aquaculture**, 255, p.565-572, 2006.

LUNDBERG, J. G. & LITTMANN, M.W. Family Pimelodidae (Long-whiskered catfishes). In: Reis, R., Kullander, S.O. & Ferraris, C.J. Jr. (Eds.). **Check list of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Edipucrs, Porto Alegre, pp 432-455. 2003.

MÄKINEN H. S.; CANO J. M.; MERILÄ J. Genetic relationships among marine and freshwater populations of the European three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) revealed by microsatellites. **Molecular Ecology**, 15, p.1519-1534, 2006.

MARQUES, D.K.S. **Aplicação da Biologia Molecular em Programas de Conservação de Recursos Pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002. 22 p. (Embrapa Pantanal. Documento, 36).

MARTÍNEZ, A. M. et al. Analysis of the genetic structure of the canary goat populations using microsatellites. **Livestock Science**, 102, p.140-145,2006.

MARTINS, C. et al. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, 28, p.12-15, 2002.

MELO, D. C. et al. Caracterização genética de seis plantéis comerciais de tilápia (*Oreochromis*) utilizando marcadores microsatélites. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, p.87-93, 2006.

MEMIS D.; KOHLMANN K. Genetic characterization of wild common carp (*Cyprinus carpio* L.) from Turkey. **Aquaculture**, 258, p.257-262, 2006.

MIRANDA, O. T. **Características zootécnicas e rendimento de carcaça do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) do rio São Francisco**, 98f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2000

MIRANDA M. O. T. **Surubim**. IBAMA, Belo Horizonte, 1997.

MOYSÉS, C. B. **Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes)**. Tese (Doutorado) 192 f. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

MORELLI, K. A.;REVALDAVES, E.; OLIVEIRA, C.; FORESTI,F. Isolation and characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes, Anostomidae)and cross-species amplification. **Molecular Ecology** Notes, 7 (1): 32-34. 2007

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, 89, p.583-590, 1978.

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

OHTA, T. Linkage disequilibrium with the island model. **Genetics**, 101, p.139- 155, 1982.

PEREIRA,L.H.G.; **Diversidade e Estrutura Genéticas em populações naturais de *Pseudoplatystoma corruscans* (SILURIFORMES:**

PIMELODIDAE). Monografia, Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Campus Botucatu, SP. 2007.

PÉREZ-RUZAFÁ, A. *et al.* Effects of fishing protection on the genetic structure of fish populations. **Biological Conservation**, 129, p.244-255, 2006.

PETREIRE JR M. Pesca de água doce no Brasil. **Ciência Hoje**, 19, p.29-33, 1995.

PETREIRE JR., M., AGOSTINHO, A.A., OKADA, E.K. & JÚLIO-JR., H.F. 2002. **Review of the fisheries in the Brazilian portion of the Paraná/Pantanal basin.** In: Cowx, I.G., Ed. Management and Ecology of Lake and Reservoir Fisheries London: Fishing News Book, pp 123-143.

PRITCHARD JK, WEN W. Documentation for structure software: Version 2.1, 2004. Disponível: <http://pritch.bsd.uchicago.edu>

PRITCHARD JK, STEPHENS M, DONNELLY P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155 (2): 945-959

PORTO-FORESTI F. *et al.* The karyotype of *Pseudoplatystoma fasciatum* (Teleostei, Siluriformes) from the Rio Paraguay basin. **Chromosome Science**, 4, p.99-102, 2000.

REIS, R. E., KULLANDER, S. O., FERRARIS, C. **CheckList of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA).** Edipucrs, Porto Alegre, 2003.

RENGMARK, A. H. *et al.* Genetic variability in wild and farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) strains estimated by SNP and microsatellites. **Aquaculture**, 253, p.229-237, 2006.

RESENDE, E.K. Migratory fishes of Paraguay-Paraná Basin excluding the Upper Paraná Basin. In: Carolsfeld, J., Harvey. B., B., Ross, Camp; Baer, A. **Migratory Fishes of South America. Biology, Fisheries and Conservation Status.** Victoria: World Fisheries Trust. pp. 99-156. 2003.

RESENDE, E.K. de; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L.; PALMEIRA, S.da S.; PEREIRA, R.A.C.; LIMA, M. de S.; ALMEIDA, V.L.L., 1995. **Biologia do curimatã (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma coruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá, MS: EMBRAPA-CPAP. 75p. (EMBRAPACAP. Boletim de Pesquisa, 02).

REVALDAVES, E. **Variabilidade genética e estruturapopulacional de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares**. Tese (Doutorado) 190 f, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2001.

REVALDAVES, E.; PEREIRA, L.H.G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Isolation and characterization of microsatellite loci in (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification *Pseudoplatystoma coruscans*. **Molecular Ecology Notes**, 463-465. 2005.

RYMAN N. Conservation genetic considerations in fishery management. **Journal of Fish Biology**, 39, p.211-224, 1991.

SALGUEIRO P. *et al.* Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered cyprinid *Anaocypris hispanica* in Portugal: implications for conservation. **Biological Conservation**, 109, p.47-56, 2003.

SANCHES, A.; **Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação** 113 f. Tese (Doutorado) São Carlos : UFSCar, 2007.

SATO, Y; CARDOSO, E. L.; SALLUM, W. B. **Reprodução induzida do surubim (*Pseudoplatystoma coruscans*) da bacia do rio São Francisco**. In: ENCONTRO ANUAL DE AQUICULTURA, 6, p 20. Anais. 1988, Associação Mineira de Aquicultura, Belo Horizonte.

SCHAEFER, S. A. **Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of the Neotropical cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae)**. in: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Eds.

Malabarba, L. R.; Reis, R. E.; Vari, R. P.; Lucena, Z. M. S.; Lucena, C. A. S. Edipucrs, Porto Alegre, p. 375-400, 1998.

SEKINE E. S. et al. Genetic differentiation among populations of *Pseudoplatystoma corruscans* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Pimelodidae) isolated by the Guaíra Falls in the Paraná River. **Acta Scientiarum**, 24, p.507-512, 2002.

SIMMONS, M. et al. Comparison of domestic and wild channel catfish (*Ictalurus punctatus*) populations provides no evidence for genetic impact. **Aquaculture**, 252, p.133-146, 2006.

SKAALA, Ø.; TAGGART, J. B. ; GUNNES, K. Genetic differences between five major domesticated strains of Atlantic salmon and wild salmon. **Journal of Fish Biology**, 67, p.118-128, 2005.

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

TRIANAFYLLIDIS A. et al. Genetic structure and phylogeography of European catfish *Silurus glandis* populations. **Molecular Ecology**, 11, p.1039-1055, 2002a.

TRIANAFYLLIDIS, A. et al. Microsatellite analysis of the genetic population structure of native and translocated Aristotle's catfish *Silurus aristotelis*. **Aquatic Living Resources**, 15, p.351-359, 2002b.

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

VARI, R. P., MALABARBA, L.R. Neotropical Ichthyology: an overview. in: **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Eds. Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S.. Edipucrs, Porto Alegre, p.1-11, 1998.

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

WATTIER, R. *et al.* Short allele dominance as a source of heterozygote deficiency at microsatellite loci: experimental evidence at the dinucleotide locus Gv1CT in *Gracilaria gracilis* (Rhodophyta). **Molecular Ecology**, 7, p.1569-1573, 1998.

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

WELCOME R. L. **River fisheries**. Food and Organization of the United Nations-FAO, Roma, 1985.

WRIGHT J. M.; BENTZEN P. **Microsatellites: Genetic Markers for the Future**. in: Molecular genetics in fisheries (eds. Carvalho GR, Pitcher TJ). Chapman & Hall. TJ Press (Padstow) Ltd, Padstow, Cornwall, Great Britain, 1995.

WRIGHT, S. **Variability within and among natural populations** .V.4. The University of Chicago Press, Chicago, 1978.

YEH F.C; BOYLE T.J.B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. **Belgian Journal of Botany**, 129, 157. 1997.

ZANIBONI-FILHO. E, NUÑES, A.P.O de. **Fisiologia da reprodução e propagação artificial dos peixes** In: José Eurico Possidon Cyrino. et al. Tópicos Especiais em Piscicultura de Água Doce Tropical Intensiva Tec Art pp 45-74:II. 2004.

ZHU, Z. Y. *et al.* Genetic analysis of Asian sea bass stocks using novel polymorphic microsatellites. **Aquaculture**, 256, p.167-173, 2006.

*ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação - Referências - Elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 22p.

Anexos

Anexo 1 - Freqüências alélicas para cada loco em cada uma das 11 populações analisadas.

População: Cuiabá 1

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A		0.3393	0.1379				
Allele B	0.0750	0.1607	0.0172	0.1481	0.0417	0.0400	0.0200
Allele C		0.0357			0.3542	0.1800	
Allele D		0.0179	0.1379	0.0370	0.1458	0.2000	0.1000
Allele E	0.7750	0.1607	0.3966		0.2917	0.3600	0.8800
Allele F	0.1000	0.0536	0.0690		0.0625	0.0600	
Allele G			0.2069	0.0556			
Allele H	0.0500			0.0926	0.0625	0.1200	
Allele I			0.0345	0.0185	0.0208		
Allele J						0.0200	
Allele K						0.0200	
Allele L							
Allele M		0.0179		0.1667			
Allele N		0.0179		0.0370			
Allele O		0.0357					
Allele P		0.1429					
Allele Q		0.0179					
Allele R							
Allele S				0.1852			
Allele T							
Allele U							
Allele V				0.0185			
Allele W							
Allele X				0.1481	0.0208		
Allele Y							
Allele Z							
Allele a				0.0741			
Allele b							
Allele c							
Allele d							
Allele e							
Allele f							
Allele g							
Allele h							
Allele i							
Allele j				0.0185			
Allele k							

População: Cuiabá 2

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A			0.1333	0.0500	0.0179	0.0185	0.0385
Allele B	0.0667	0.2069		0.2000	0.0893		
Allele C		0.1552			0.0714	0.1667	0.1346
Allele D		0.0862	0.1500		0.1250	0.0556	
Allele E	0.5833	0.2414	0.4000		0.3393	0.6296	0.7308
Allele F	0.3500	0.1724	0.0833	0.0500	0.0357		0.0962
Allele G		0.0862	0.1333	0.0333	0.0893	0.0370	
Allele H				0.0500	0.1607	0.0926	
Allele I			0.0833		0.0536		
Allele J				0.0167	0.0179		
Allele K				0.0167			
Allele L			0.0167				
Allele M				0.1333			
Allele N				0.0833			

Allele O	
Allele P	0.0517
Allele Q	
Allele R	0.1333
Allele S	0.0667
Allele T	
Allele U	
Allele V	
Allele W	0.0333
Allele X	0.0333
Allele Y	0.0167
Allele Z	0.0667
Allele a	
Allele b	
Allele c	0.0167
Allele d	
Allele e	
Allele f	
Allele g	
Allele h	
Allele i	
Allele j	
Allele k	

População: Taquari 1

Allelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A			0.0833			0.1042	0.1923
Allele B	0.0385	0.5000	0.0667	0.0769	0.1042		
Allele C		0.0962		0.0192	0.4167	0.1875	0.0577
Allele D			0.2500	0.0385	0.1667	0.0833	0.0385
Allele E	0.6923	0.2500	0.3833		0.1458	0.3333	0.5769
Allele F	0.2692	0.1538	0.0833	0.0192	0.0833	0.0833	0.1346
Allele G			0.1000	0.0192		0.0208	
Allele H				0.1731	0.0208	0.1667	
Allele I			0.0167	0.0192			
Allele J				0.0192	0.0417		
Allele K							
Allele L							
Allele M				0.2115			
Allele N							
Allele O							
Allele P							
Allele Q			0.0167				
Allele R				0.0577		0.0208	
Allele S							
Allele T					0.0208		
Allele U				0.1154			
Allele V							
Allele W				0.0192			
Allele X				0.0385			
Allele Y				0.0385			
Allele Z							
Allele a							
Allele b				0.0577			
Allele c				0.0192			
Allele d							
Allele e							
Allele f				0.0192			
Allele g							
Allele h							
Allele i				0.0385			
Allele j							
Allele k							

População: Taquari 2

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A			0.1897	0.1500			
Allele B	0.0200	0.4792		0.0833	0.1250	0.0625	
Allele C		0.0208			0.0893	0.1042	0.1591
Allele D		0.0208	0.0690		0.1786	0.3125	
Allele E	0.7400	0.0625	0.4483	0.0333	0.3750	0.2292	0.7500
Allele F	0.2200	0.3542	0.0517	0.0167	0.0357	0.0417	0.0909
Allele G		0.0208	0.1897	0.2167	0.0714	0.1458	
Allele H	0.0200		0.0172		0.1250	0.0417	
Allele I			0.0345				
Allele J						0.0625	
Allele K							
Allele L							
Allele M				0.2000			
Allele N		0.0417					
Allele O							
Allele P							
Allele Q				0.0167			
Allele R				0.0500			
Allele S							
Allele T							
Allele U							
Allele V				0.0667			
Allele W				0.0500			
Allele X							
Allele Y							
Allele Z							
Allele a				0.0333			
Allele b				0.0167			
Allele c							
Allele d							
Allele e							
Allele f				0.0333			
Allele g							
Allele h				0.0333			
Allele i							
Allele j							
Allele k							

População: Rio Negro

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A		0.0217	0.1111			0.0192	
Allele B		0.2609	0.0741	0.2000	0.0208	0.0192	
Allele C		0.0217	0.0556		0.2083	0.1346	0.1897
Allele D	0.2258		0.0370		0.0208	0.2115	
Allele E	0.5323	0.1957	0.4815	0.1000	0.1875	0.1923	0.7414
Allele F	0.0645	0.3261	0.0556		0.1458	0.0962	0.0690
Allele G	0.0323		0.0741		0.0625	0.1538	
Allele H	0.0645	0.0435		0.0400	0.0833	0.0962	
Allele I	0.0806		0.0185		0.0625	0.0192	
Allele J				0.2600	0.1042		
Allele K					0.0208		
Allele L		0.1087					
Allele M				0.1400			
Allele N		0.0217			0.0208		
Allele O				0.0600			
Allele P			0.0926				
Allele Q							
Allele R				0.0800		0.0577	
Allele S							
Allele T					0.0417		
Allele U				0.0200			
Allele V					0.0208		
Allele W							
Allele X				0.0200			
Allele Y							
Allele Z							
Allele a				0.0200			
Allele b				0.0400			
Allele c							
Allele d							

Allele e
 Allele f
 Allele g
 Allele h 0.0200
 Allele i
 Allele j
 Allele k
 =====

População: Corumbá

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A			0.1500				
Allele B		0.5000	0.0167		0.1667	0.0417	
Allele C		0.1400		0.1739	0.3542	0.0208	0.2200
Allele D	0.0600		0.0500	0.0217		0.3333	0.7800
Allele E	0.8000	0.2200	0.6000		0.2292	0.2708	
Allele F	0.1200	0.1000	0.0167		0.0833		
Allele G			0.1167	0.1522		0.1042	
Allele H		0.0400	0.0167		0.0833	0.1250	
Allele I			0.0333	0.0217			
Allele J				0.0870		0.1042	
Allele K	0.0200			0.0435			
Allele L							
Allele M							
Allele N				0.0435			
Allele O							
Allele P				0.0435			
Allele Q				0.0217			
Allele R				0.0652			
Allele S				0.0652	0.0625		
Allele T							
Allele U				0.0217	0.0208		
Allele V							
Allele W				0.0870			
Allele X							
Allele Y							
Allele Z							
Allele a				0.0217			
Allele b							
Allele c				0.0217			
Allele d							
Allele e							
Allele f				0.0435			
Allele g				0.0435			
Allele h							
Allele i				0.0217			
Allele j							
Allele k							

População: Cáceres

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A		0.0536	0.0833			0.0333	
Allele B	0.0893	0.3214	0.0833		0.1562	0.0333	
Allele C		0.0893	0.0833		0.2500	0.1167	0.9815
Allele D		0.0536	0.1167	0.0926	0.2188	0.2167	
Allele E	0.6607	0.1786	0.4167	0.0926	0.1094	0.2833	0.0185
Allele F	0.1786	0.1607	0.0667		0.1094	0.0333	
Allele G		0.0357	0.0833	0.0556		0.2167	
Allele H	0.0714	0.1071	0.0167		0.1406	0.0500	
Allele I			0.0500				
Allele J					0.0156	0.0167	
Allele K				0.2593			
Allele L							

Allele M	
Allele N	0.0370
Allele O	
Allele P	
Allele Q	
Allele R	0.0370
Allele S	0.0556
Allele T	
Allele U	
Allele V	0.0185
Allele W	
Allele X	0.0741
Allele Y	
Allele Z	
Allele a	
Allele b	0.0185
Allele c	
Allele d	
Allele e	0.0185
Allele f	
Allele g	
Allele h	0.2222
Allele i	
Allele j	
Allele k	0.0185

População: Miranda

Allelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A			0.1087				0.0690
Allele B		0.5000		0.2059	0.0517	0.1304	
Allele C	0.1458	0.0500			0.2241	0.1957	0.1207
Allele D			0.1087		0.0690	0.1087	
Allele E	0.1875	0.2000	0.4783		0.1897	0.3478	0.7931
Allele F	0.2708	0.2250	0.0870		0.2241		0.0172
Allele G	0.0625		0.1522			0.0652	
Allele H	0.1875			0.1176	0.1207	0.1522	
Allele I	0.0625	0.0250	0.0435	0.1471	0.0345		
Allele J	0.0833			0.0588	0.0690		
Allele K							
Allele L							
Allele M							
Allele N				0.2059			
Allele O			0.0217				
Allele P							
Allele Q							
Allele R				0.1765			
Allele S							
Allele T					0.0172		
Allele U				0.0882			
Allele V							
Allele W							
Allele X							
Allele Y							
Allele Z							
Allele a							
Allele b							
Allele c							
Allele d							
Allele e							
Allele f							
Allele g							
Allele h							
Allele i							
Allele j							
Allele k							

População: Paranapanema

Allelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
----------------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------

Allele A							0.0200
Allele B		0.0588			0.3039	0.3404	0.0100
Allele C		0.0980			0.1078	0.0851	0.1100
Allele D	0.0189	0.0490			0.1961	0.3085	0.0100
Allele E	0.2925	0.1176	0.1058	0.7273	0.1471	0.1170	0.8100
Allele F	0.6509	0.2353	0.4135		0.0686	0.0745	0.0400
Allele G	0.0377	0.2255	0.1058	0.0114	0.1275	0.0319	
Allele H		0.1765	0.0385		0.0098		
Allele I		0.0098	0.1154			0.0106	
Allele J			0.1442		0.0098		
Allele K		0.0196	0.0192	0.0114		0.0106	
Allele L				0.1023	0.0098		
Allele M		0.0098	0.0481			0.0106	
Allele N			0.0096	0.0227	0.0098		
Allele O				0.0455		0.0106	
Allele P					0.0098		
Allele Q				0.0341			
Allele R							
Allele S							
Allele T							
Allele U				0.0455			
Allele V							
Allele W							
Allele X							
Allele Y							
Allele Z							
Allele a							
Allele b							
Allele c							
Allele d							
Allele e							
Allele f							
Allele g							
Allele h							
Allele i							
Allele j							
Allele k							

População: Ivinhema

Alelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A							0.0263
Allele B		0.0263		0.4211	0.3947	0.3947	
Allele C		0.0263		0.1053	0.1316		0.1842
Allele D		0.2368	0.0263		0.2105	0.2368	
Allele E	0.4737	0.0789	0.4737	0.0526	0.1316	0.1842	0.5789
Allele F	0.5000	0.3421	0.0526			0.0789	0.2105
Allele G	0.0263	0.2632	0.0263		0.1316	0.0263	
Allele H						0.0789	
Allele I			0.3947				
Allele J		0.0263	0.0263				
Allele K							
Allele L				0.1316			
Allele M				0.0526			
Allele N							
Allele O							
Allele P							
Allele Q				0.1579			
Allele R							
Allele S							
Allele T							
Allele U				0.0789			
Allele V							
Allele W							
Allele X							
Allele Y							
Allele Z							
Allele a							
Allele b							
Allele c							
Allele d							

Allele e
 Allele f
 Allele g
 Allele h
 Allele i
 Allele j
 Allele k

=====

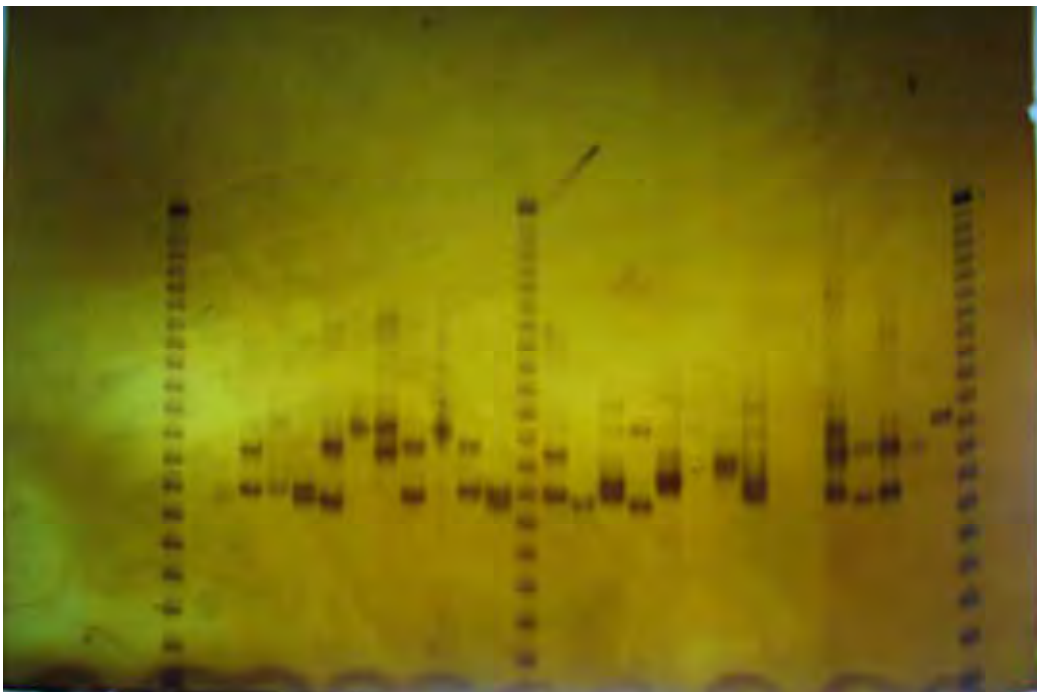
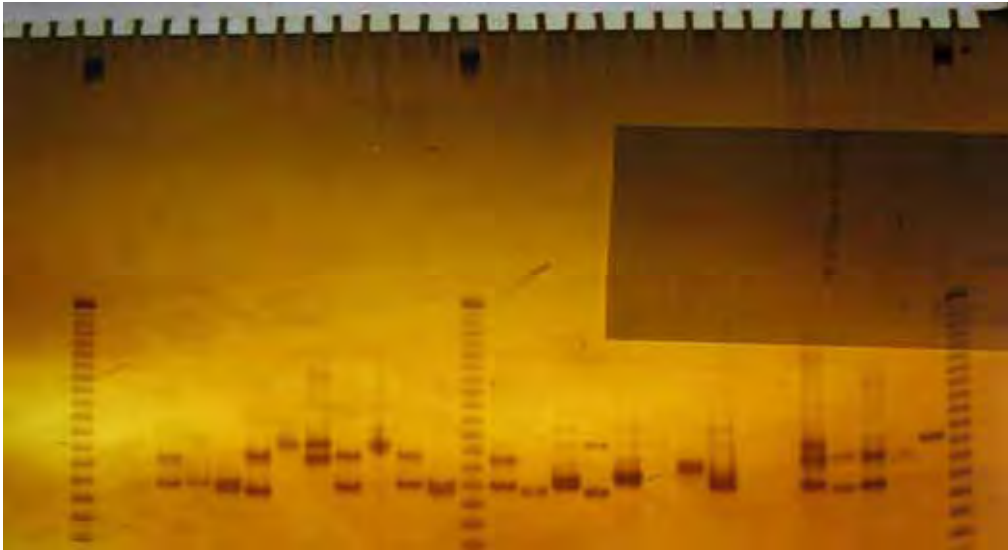
População: Foz do Iguaçu (Rio Paraná)

=====

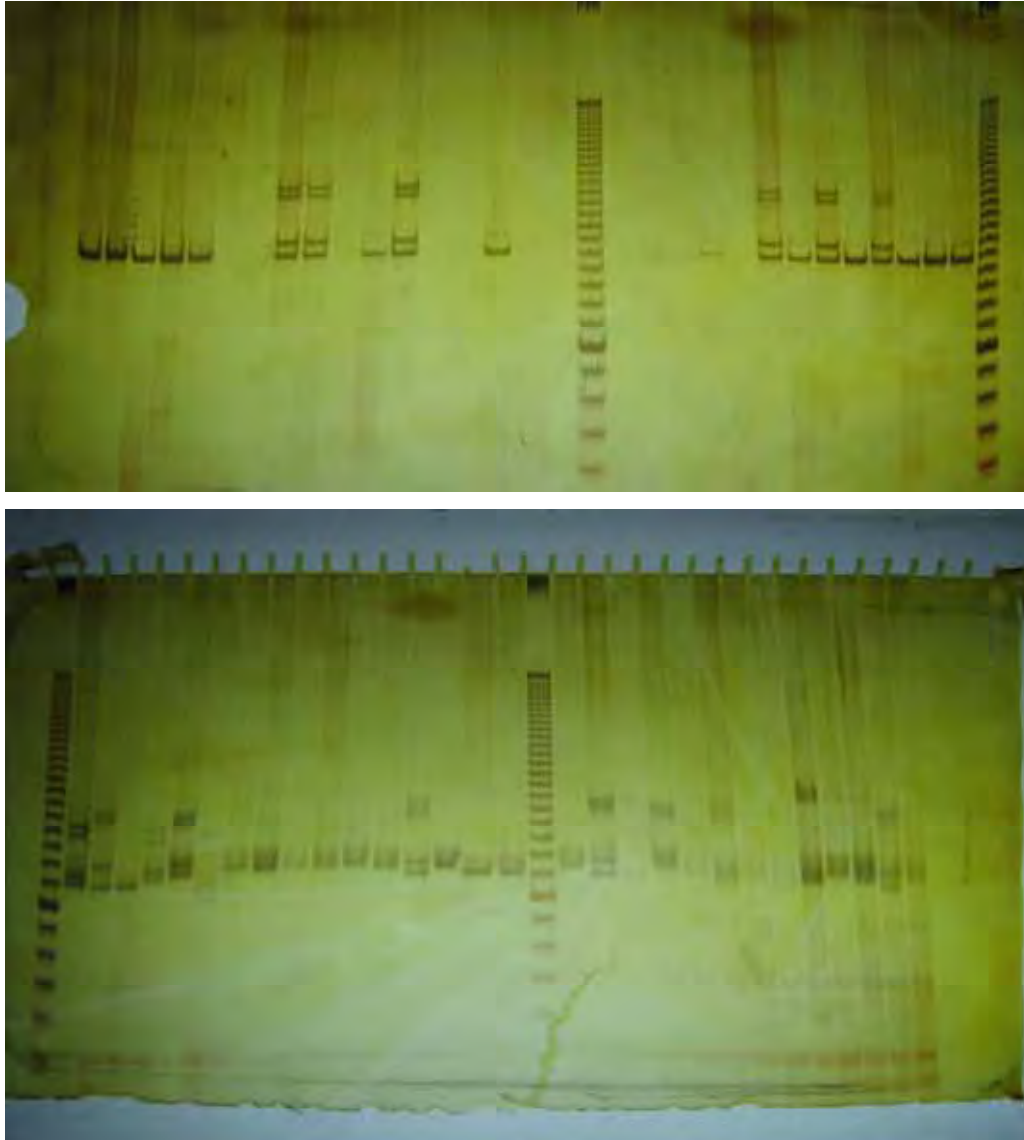
Allelo \ Locos	Pcor01	Pcor02	Pcor05	Pcor10	Pcor21	Pcor23	Pcor28
Allele A			0.0789				0.0122
Allele B	0.0122	0.3158	0.0526	0.2963	0.0976	0.1707	
Allele C		0.0395	0.0132	0.0741	0.2439	0.1585	0.1585
Allele D		0.0263	0.1316	0.0370	0.2439	0.2073	
Allele E	0.8171	0.0658	0.2500		0.0610	0.1951	0.8171
Allele F	0.0976	0.2237	0.2632	0.0556	0.1707	0.0122	0.0122
Allele G	0.0732	0.1711	0.1184	0.0370	0.0732	0.1463	
Allele H			0.0526		0.1098	0.0854	
Allele I		0.0921	0.0395	0.0185			
Allele J		0.0132		0.0370		0.0122	
Allele K		0.0526		0.1111			
Allele L				0.1111			
Allele M				0.0370			
Allele N				0.0556			
Allele O				0.0185			
Allele P							
Allele Q				0.0185		0.0122	
Allele R				0.0185			
Allele S				0.0185			
Allele T							
Allele U							
Allele V				0.0370			
Allele W							
Allele X				0.0185			
Allele Y							
Allele Z							
Allele a							
Allele b							
Allele c							
Allele d							
Allele e							
Allele f							
Allele g							
Allele h							
Allele i							
Allele j							
Allele k							

=====

Anexo 2 – Géis de poliacrilamida mostrando a distribuição de alelos dos vários microssatélites em *Pseudoplatystoma corruscans* usando marcador molecular com 10 pares de bases em 30 indivíduos analisados pertencentes às Bacias Paraguai-Paraná.



Anexo 3 – Géis de poliacrilamida mostrando a distribuição de alelos dos vários microssatélites em *Pseudoplatystoma corruscans* usando marcador molecular com 10 pares de bases em 30 indivíduos analisados pertencentes às Bacias do Paraguai-Paraná.



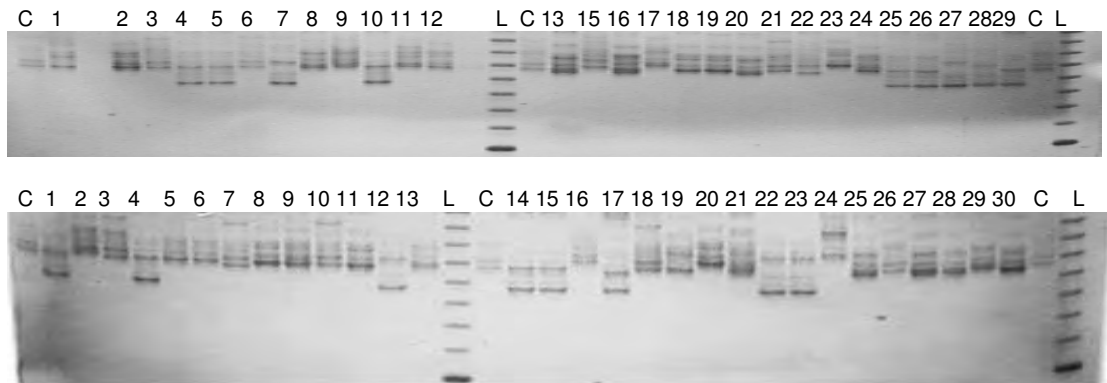


Figura 10 – Exemplos de amplificação dos locos microssatélites visualizados em gel de poliacrilamida 6%. Amostra pop. Taquari 1 com Pcor05. C= clone (individuo com tamanho de alelo conhecido); L= Ladder 10 pb; números= indivíduos.