

Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microsatélites

Cláudia Haru Suganuma
Zootecnista

Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microssatélites

Cláudia Haru Suganuma

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Calcagnotto

Tese apresentada ao programa de Pós Graduação em AQUICULTURA do centro de Aquicultura da UNESP, campus de Jaboticabal como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Aquicultura – Área de Concentração: Aquicultura em águas continentais.

Suganuma, Cláudia Haru
S947A Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu
(*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal
Matogrossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo
Microssatélites / Cláudia Haru Suganuma. – – Jaboticabal, 2008
x, 105 f. ; il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Centro de
Aquicultura, 2008
Orientador: Fausto Foresti
Banca examinadora: Alexandre Wagner Silva Hilsdorf, Emiko
Kawakami de Resende, Jeffrey Frederico Lui, Claudio de Oliveira
Bibliografia

1. *Piaractus mesopotamicus*. 2. Microssatélites. 3. Pacu-
estruturação genética. I. Título. II. Jaboticabal-Centro de Aquicultura

CDU 639.3(817)

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

*D*EDICATÓRIA

Aos meus pais Jorge e Masako e minha irmã Elianna.

(おとうさん、おかあさん、おねえさんへ)

Quase

Ainda pior que a convicção do não e a incerteza do talvez é a desilusão de um quase. É o quase que me incomoda, que me entristece, que me mata trazendo tudo que poderia ter sido e não foi. Quem quase ganhou ainda joga, quem quase passou ainda estuda, quem quase morreu está vivo, quem quase amou não amou. Basta pensar nas oportunidades que escaparam pelos dedos, nas chances que se perdem por medo, nas idéias que nunca sairão do papel por essa maldita mania de viver no outono.

Pergunto-me, às vezes, o que nos leva a escolher uma vida morna; ou melhor não me pergunto, contesto. A resposta eu sei de cór, está estampada na distância e frieza dos sorrisos, na frouxidão dos abraços, na indiferença dos "Bom dia", quase que sussurrados. Sobra covardia e falta coragem até pra ser feliz. A paixão queima, o amor enlouquece, o desejo trai. Talvez esses fossem bons motivos para decidir entre a alegria e a dor, sentir o nada, mas não são. Se a virtude estivesse mesmo no meio termo, o mar não teria ondas, os dias seriam nublados e o arco-íris em tons de cinza. O nada não ilumina, não inspira, não aflige nem acalma, apenas amplia o vazio que cada um traz dentro de si.

Não é que fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao alcance, para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente

paciência porém, preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de merecer. Pros erros há perdão; pros fracassos, chance; pros amores impossíveis, tempo. De nada adianta cercar um coração vazio ou economizar alma. Um romance cujo fim é instantâneo ou indolor não é romance. Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.

*Sarah Westphal Batista da Silva
(Texto falsamente atribuído a Luis Fernando Veríssimo)*

AGRADECIMENTOS

A Deus, que sempre está e estará ao meu lado em todos os momentos, me guiando, protegendo e abençoando imensamente.

“Porque todo o que é nascido de Deus vence o mundo; e esta é a vitória que vence o mundo, a nossa fé.”

I João 5:4

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, pela orientação, dedicação à pesquisa em genética de peixe, enorme contribuição para a minha formação, apoio e grande incentivo. Um exemplo de pesquisador. Mais uma vez, obrigada por acreditar em mim.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina.”

Cora Coralina

A minha co-orientadora Dra. Daniela Calcagnotto, pela orientação, ajuda e sugestões durante a realização do meu projeto de doutorado.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira, por todas as dicas durante a realização deste.

À Profa. Dra. Lurdes Foresti de Almeida Toledo, por ter me deixado utilizar as dependências do laboratório de Ictiogenética para a realização do meu trabalho de doutorado.

À Dra. Emiko Kawakami de Resende, por ter cedido as amostras de tecido dos pacus utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Alexandre Wagner Silva Hilsdorf por toda ajuda e esclarecimentos que me foram de grande valia.

Ao Prof. Dr. Edson Seizo Mori pelas sugestões que melhoraram bastante finalização deste trabalho.

Ao Centro de Estudos do Genoma Humano, que realizou a genotipagem de microssatélites deste trabalho.

À FAPESP, pela bolsa concedida, que serviu de apoio para a condução do experimento, realização dos trabalhos e aprendizado

Ao curso de Pós Graduação do Centro de Aqüicultura da UNESP, pela possibilidade de realizar meu trabalho de doutorado.

A todos os meus colegas do Departamento de Morfologia: Alex, Ana Paula, Andréia Alves, Andréia Poletto, Adrianinha, Bruno (Guiodai), Cristiane, Daniela, Danilo (Jacu), Elisa, Emanuel, Ernesto, Fabio (Fio), Fernando (Konrado), Gláucia, Glaura, Gleicy, Guilherme (Varvito), Guilherme (Kbelo), Guilherme (Caruncho), Gustavo, Heleno, Igor, Irani, Jefferson, Juju Mazzucks, Kelly, Lessandra, Márcio, Marisa, Marlon, Mahmoud, Natália, Patrícia, Paulo Vênere, Renato, Ricardo Benine, Ricardo Paiva, Ricardo Teixeira, Rosângela, Tatiane, Dona Têra, Vanessa, Welcy, Dona Yolanda, Wanda, Zeca, Zé Eduardo e Zé Luis. À Karina e ao Luiz Henrique um agradecimento especial por terem me ajudado na análise e interpretação dos meus resultados. E à Luciana por todos os favores que requeri, toda ajuda que solicitei, todas as informações que pedi e principalmente ter aturado tudo isso!!!!!!

A amizade não se busca, não se sonha, não se deseja; ela exerce-se: é uma virtude."

[Simone Weil](#)

Ao meu grande amigo, meu "irmãozinho caçula" de pós graduação, Prof. Dr. Celso Benites. Um imenso agradecimento por toda a ajuda, conversas, conselhos e desabafos nos momentos difíceis que nos assombraram nesta fase.

"O homem de muitos amigos deve mostrar-se amigável, mas há um amigo mais chegado do que um irmão."

Provérbios 18:24

Aos meus amigos da USP que me receberam super bem, foram super solícitos, me ajudaram sempre que necessário e deixaram meus dias em Sampa mais alegres. Artur, Bibi, Carlos, Eduardo, Felipe, Marcinha, Marilena, Mateus (Groscof), Karina (Pupi's), Karine, Raquel, Riviane, Thiago e Vânia. Em especial à, Carolzita, Léo Ramalho (que não é da USP, mas participou ativamente de todos os eventos sociais), Keila e Ari por todo carinho, conversas, diversão, Happy Hours e as "poucas" risadas que demos juntos.

“Abençoados os que possuem amigos, os que os têm sem pedir. Porque amigo não se pede, não se compra, nem se vende. Amigo a gente sente!”

Machado de Assis

Aos meus inestimáveis amigos que estiveram sempre presentes e marcaram minha vida de forma indelével. Sílvia (lindona querida), Claudia (Guiga), Eliane (Liloca), Elson, Ritinha, Marina, Juninho (maninho), Galera da Academia: Lúcia, Carlão, Thaís, Cecília, Erick, Keka, Mônia, Fabíola, Guerra, Leandro e André; Fabiano Tenore, Tia Fêfe, Rodrigo e Dedé (e os gêmeos Dante e Nicolas), Paula Miabara, Ana Elisa, Claudia e Isabele Amoroso, Mei, Camila Ítavo, Oswaldo e Ronaldo Conti.

“A glória da amizade não é a mão estendida, nem o sorriso carinhoso, nem mesmo a delícia da companhia. É a inspiração espiritual que vem quando você descobre que alguém acredita e confia em você.”

Ralph Waldo Emerson

À Veralice, pela eficiente ajuda à distância que fizeram diferença e facilitaram minha vida. Você caiu do céu.

“Amigo verdadeiro é aquele que nos quer apesar de nada.”

Sofocleto

À minha valiosa família de Jaboticabal; William, Naomi e seus lindos e queridos filhos que eu tanto amo Mateus e Tiago. Obrigada por me receberam quando eu precisei de abrigo durante as disciplinas cursadas, pelas conversas e conselhos e pelos muitos momentos de diversão. E à querida Orlanda e sua maravilhosa família que sempre me apoiaram, torceram e acreditaram em mim.

“Todas as grandezas desse mundo não valem um bom amigo.”

Voltaire

À minha amada e abençoada família: papai Jorge, mamãe Masako e mana Elianna, pelo apoio e fé que tiveram em mim. Sem vocês este trabalho não seria possível. À Melzinha, meu amor, que me agraciou com seu olhar meigo, jeito alegre, imensa simpatia e ternura.

“Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a

oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo"

[Hermann Hesse](#)

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se realizasse.

"A gratidão é um fruto de grande cultura; não se encontra entre gente vulgar."

[Samuel Johnson](#)

ありがとうございました

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1) INTRODUÇÃO	3
1.1) Considerações sobre o Pantanal Matogrossense e sua Ictiofauna	3
1.2) O Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887)	8
1.3) Estudos genéticos em peixes	12
2) OBJETIVOS	19
3) MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1) Coleta de amostras de tecido	20
3.2) Isolamento do DNA genômico	23
3.3) Verificação da integridade do material	24
3.4) Amplificação dos locos microsatélites	25
3.5) Genotipagem automática em seqüenciador	30
3.6) Forma de análise dos resultados	32
4) RESULTADOS	35
4.1) Extração e purificação do DNA das amostras	35
4.2) Amplificação dos locos microsatélites	35
4.3) Genotipagem automática em seqüenciador	37
4.4) Análises intrapopulacionais	39
4.5) Análises interpopulacionais	43
5) DISCUSSÃO	54
6) CONCLUSÕES	66
7) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
8) ANEXOS	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Localidades, número de amostras e nomenclatura utilizada para os tecidos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) em estudos realizados no presente trabalho.	21
Tabela 2: Informações sobre os primers (Calcagnotto et al., 2001) utilizados para amplificar os locos microssatélites em pacus (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887).	25
Tabela 3. Representação de um mix de PCR com seus componentes para o <i>primer</i> Pme2	26
Tabela 4. Representação de um mix de PCR com seus componentes para os demais <i>primers</i> .	27
Tabela 5. Número absoluto de alelos por locos nas populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) estudadas. RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	40
Tabela 6. Alelos exclusivos por locos nas populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) estudadas. RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	40
Tabela 7. Análise intrapopulacional de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Pantanal Mato-Grossense. Os parâmetros apresentados são: N = número de indivíduos, Fis = endogamia, PHE = equilíbrio de Hardy Weinberg (e alelos nulos quando significativo), Riqueza = riqueza alélica. RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	41
Tabela 8. Diversidade genética (Fst na diagonal inferior e Rst na diagonal superior) entre pares de populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) para todos os locos estudados. RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	44
Tabela 9. Diferenciação populacional (teste exato de Fisher) alélica (Diagonal inferior) e genotípica (diagonal superior). RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	44
Tabela 10: Distância de chord de Cavalli Sforza & Edwards (1967) entre pares de populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	45
Tabela 11. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando um grupo com todas as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). (Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc, Rio Taquari/Caronal, Rio Taquari/Palmeiras, Rio Negro, Rio Paraguai Mirim, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/ Cáceres).	47
Tabela 12. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) separadas em dois grupos (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc e Rio Paraguai/ Cáceres; Grupo II = Rio Taquari/Caronal, Rio Taquari/Palmeiras, Rio Negro, Rio Paraguai Mirim e Rio Paraguai/Corumbá;).	47
Tabela 13. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) separadas em quatro grupos (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço e Rio Cuiabá/Sesc; Grupo II = Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras; Grupo	48

III = Rio Negro; Grupo IV = Rio Paraguai Mirim, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/ Cáceres).

Tabela 14. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) separadas em cinco grupos (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço e Rio Cuiabá/Sesc; Grupo II = Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras; Grupo III = Rio Negro; Grupo IV = Rio Paraguai Mirim e Rio Paraguai/Corumbá; Grupo V = Rio Paraguai/ Cáceres).	48
Tabela 15. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) separadas em três grupos de acordo com a separação sugerida pelo dendograma de UPGMA (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/ Cáceres; Grupo II = Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras; Grupo III = Rio Negro e Rio Paraguai Mirim).	49
Tabela 16. Resultado do teste de atribuição para as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) utilizadas. RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	52
Tabela 17. Proporção de atribuição correta de cada população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) aos <i>clusters</i> inferidos. RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres).	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa do Pantanal Mato-Grossense com os principais rios formadores e as 11 sub-regiões (Fonte: Silva & Abdon, 1998).	4
Figura 2: Exemplar de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). Fonte: Britski (2007).	10
Figura 3: Mapa representativo do Pantanal Mato–Grossense com os locais de coleta. 1: Rio Cuiabá /Parque Nacional – Foz; 2: Rio São Lourenço; 3: Rio Cuiabá/SESC; 4: Rio Taquari/Caronal; 5: Rio Taquari/Palmeiras; 6: Rio Negro; 7: Rio Paraguai Mirim; 8: Rio Paraguai/Corumbá; 9: Rio Paraguai/Cáceres.	22
Figura 4. Eletroferogramas com os picos de intensidade indicando o tamanho dos alelos em Pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). Resultados de alguns indivíduos amplificados com o <i>primer</i> Pme2.	38
Figura 5: Dendrograma de UPGMA utilizando a distância de <i>chord</i> de Cavalli Sforza & Edwards (1967), representando a relação entre as populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) analisadas.	46
Figura 6. Ln(PD) em relação ao número de populações (K) testadas	50
Figura 7. ΔK em relação ao número de populações (K) testadas.	50
Figura 8. Estrutura <i>bar plot</i> representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam cada população.	51
Figura 9: Mapa do Pantanal Mato–Grossense com o padrão de agrupamento das populações segundo o dendrograma. 1: Rio Cuiabá/Parque Nacional – Foz; 2: Rio São Lourenço; 3: Rio Cuiabá /SESC Pantanal; 4: Rio Taquari Caronal; 5: Rio Taquari Palmeiras; 6: Rio Negro; 7: Rio Paraguai Mirim; 8: Rio Paraguai/Corumbá; 9: Rio Paraguai/Cáceres.	59

ANEXOS

Anexo1. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/Parque Nacional - Foz.	85
Anexo 2. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio São Lourenço.	86
Anexo 3. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio.Taquairi/Caronal.	86
Anexo 4. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/SESC.	87
Anexo 5. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio.Taquari/Palmeiras	88
Anexo 6. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio.Negro.	88
Anexo 7. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Paraguai Mirim.	89
Anexo 8. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio.Paraguai/Corumbá.	89
Anexo 9. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio.Paraguai/Cáceres.	90
Anexo 10. Frequências alélicas dos oito locos microssatélites estudados nas populações de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Pantanal Mato-Grossense estudadas. (RCPN = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; RSLO = Rio São Lourenço; RCSE = Rio Cuiabá/Sesc; RTCA = Rio Taquari/Caronal; RTPA = Rio Taquari/Palmeiras; RNEG = Rio Negro; RPMI = Rio Paraguai Mirim; RPCO = Rio Paraguai/Corumbá; RPCA = Rio Paraguai/ Cáceres)	91
Anexo 11: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz (RCPN).	92
Anexo 12: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio São Lourenço (RSLO)	93
Anexo 13: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/SESC (RCSE).	94
Anexo 14: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Taquari/Caronal (RTCA)	95
Anexo 15: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Taquari/Palmeiras (RTPA)	96
Anexo 16: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Negro (RNEG).	97
Anexo 17: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Paraguai Mirim (RPMI).	98
Anexo 18: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Paraguai/Corumbá (RPCO).	99
Anexo 19: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) do Rio Paraguai/ Cáceres (RPCA).	100
Anexo 20. Gel de agarose corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio São Lourenço.	101

Anexo 21. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio Cuiabá (SESC Pantanal).	101
Anexo 22. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio Cuiabá (Parque Nacional do Pantanal). <i>Ladder 1kb plus</i> .	102
Anexo 23. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio Paraguai. <i>Ladder 1kb plus</i> .	102
Anexo 24. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo com DNA amplificado de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) com o <i>primer</i> Pme2. <i>Ladder</i> de 10 pares de base.	103
Anexo 25. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA amplificado de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) com o <i>primer</i> Pme4. <i>Ladder 1kb plus</i> .	103
Anexo 26. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA amplificado de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) com o <i>primer</i> Pme21.	104
Anexo 27. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata com DNA amplificado de pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) com <i>primer</i> Pme20. <i>Ladder</i> de 10 pares de base (L). 1 a 6: indivíduos escolhidos aleatoriamente para a realização do ensaio. (N): amostra não diluída. (D): amostra diluída na concentração de 10:1	104
Anexo 28. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata com DNA amplificado de <i>Piaractus mesopotamicus</i> Holmberg, 1887) com <i>primer</i> Pme21. <i>Ladder</i> de 10 pares de base (L). 1 a 6: indivíduos escolhidos aleatoriamente para a realização do ensaio. (N): amostra não diluída. (D): amostra diluída na concentração de 5:1.	105

RESUMO

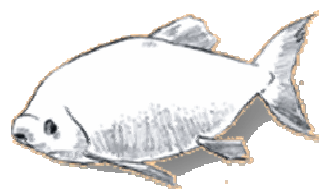
O presente trabalho teve como objetivo principal ampliar o conhecimento sobre a estrutura genética e obter informações para a conservação de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), provenientes de populações selvagens dos rios da Bacia do Alto Paraguai. Esta espécie possui grande valor comercial e imenso potencial para exploração em pisciculturas. Os marcadores moleculares do tipo microssatélite utilizados neste estudo, resultaram em muitas informações sobre a estrutura populacional desta espécie, permitindo uma possível caracterização dos bancos genéticos para esta espécie. Exemplares provenientes de nove sub-bacias do Pantanal Matogrossense foram coletados para a realização da extração de DNA visando à análise do material genômico. Para isto, foram retirados pequenos fragmentos de nadadeira de cada indivíduo. A amplificação dos locos microssatélites foi realizada num termociclador de PCR utilizando oligonucleotídeos marcados com fluorescência, conforme descrito na literatura. A genotipagem foi realizada no seqüenciador automático *MegaBACETM 1000* (Amersham Biosciences), pertencente ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo. Os tamanhos dos alelos obtidos foram organizados para a montagem das matrizes de dados que foram submetidas aos programas computacionais para verificar a variabilidade genética nas populações. Os parâmetros que permitiram a determinação da diversidade genética intra e interpopulacional foram o número de alelos por loco, riqueza alélica, heterozigosidade observada e esperada, equilíbrio de Hardy Weinberg, índices *F_{st}* e *R_{st}*, análise de variância molecular (AMOVA), índice de fixação, desequilíbrio de ligação e o número de migrantes. Também foi feita uma análise bayesiana para verificar a estrutura populacional e um dendrograma foi gerado a partir da matriz de distância baseada nos valores de distância de *chord*. Todas as análises indicaram que as populações apresentaram pequena estruturação e um intenso fluxo gênico se fez presente entre elas. As causas prováveis destes resultados, além das particularidades da biologia e comportamento desta espécie, também a sua alta capacidade migratória e as características climáticas e geográficas da região do Pantanal Matogrossense.

Palavras chaves: *Piaractus mesopotamicus*, microssatélites, estruturação genética, Pantanal Matogrossense.

ABSTRACT

This work aimed to obtain information about the genetic structure of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887), from wild populations of Alto Paraguai Basin Rivers. This specie has a greatly commercial importance, with huge potential for hatcheries. The pacu has a wide distribution in the Prata Basin, formed by Paraguay, Paraná and Uruguay rivers and their tributaries. Microsatellites markers offer relevant information about this specie, allowing the characterization of genetic stocks. Individuals from nine sampling sites in the Pantanal Matogrossense were analysed in this study. DNA extraction methods did not required killing the samples, we used fin clippings from each individual. The amplification of microsatellites loci was carried out *via* polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotide marked with fluorescent labels. The amplified fragments were analysed on the automatic DNA sequencer *MegaBACE™ 1000* (Amersham Biosciences), belonged to Centro de Estudos do Genoma Humano from Universidade de São Paulo. Allele sizes were organized in an input file that was submitted statistical analysis to verify the genetic variability of populations. The parameters used to estimate the genetic diversity intra and interpoulation were number of allele per locus, allele richness, observed and expected heterozygosities, Hardy Weinberg equilibrium, molecular variance analyses (AMOVA), fixation index, linkage disequilibrium and gene flow. Bayesian estimates were used to verify the populacional structure and a dendogram was calculated by the distances matrix based on chord distances values. The results showed no population structuring and intense gene flow. The most probable causes are the hight migratory capacityof this fish and the climatic and geographic characteristics of the Pantanal Matogrossense

Key Words: *Piaractus mesopotamicus*, microsatellites, genetic structure, Pantanal Matogrossense.



Introdução

1) INTRODUÇÃO

1.1) Considerações sobre o Pantanal Matogrossense e sua ictiofauna

A região denominada Pantanal Matogrossense possui aproximadamente 160.000 km² e fica localizada no centro do continente Sul Americano (Junk & Cunha, 2005), ocupando áreas do Brasil, Bolívia e Paraguai (da Silva & Abdon, 1998; Junk & Cunha, 2005). O Brasil possui 85% deste ecossistema (Alho *et al.*, 1998) distribuídos nos Estados do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (Rizzini, 1997). É constituído por uma extensa planície sedimentar, enquadrada entre os paralelos de 16° a 22 ° de latitude sul e os meridianos de 55° a 58° de longitude oeste (da Silva & Abdon, 1995), estando situado em uma região de clima seco onde a pluviosidade de 1100 mm/ano é ultrapassada pela evaporação média que é de 1400 mm/ano (Figura 1). As chuvas são concentradas nos poucos meses de verão e são seguidas por longa seca de inverno. O Pantanal seria semi árido se não fossem as águas trazidas pelos rios que têm sua origem fora desta região (Por *et al.*, 1995).

O Pantanal possui solos predominantemente arenosos revestidos com plantas forrageiras nativas e detém aproximadamente quatro milhões de cabeças de gado (Por *et al.*, 2007) mantidos em grandes propriedades, fazendo da pecuária a principal atividade econômica há mais de 200 anos (Vieira, 2005). A pesca, profissional ou esportiva representa a segunda atividade econômica mais importante. Ocupa mão de obra que vai desde a captura de iscas vivas até a

pesca propriamente dita, seja para fins comerciais ou de subsistência (Vieira, 2005).

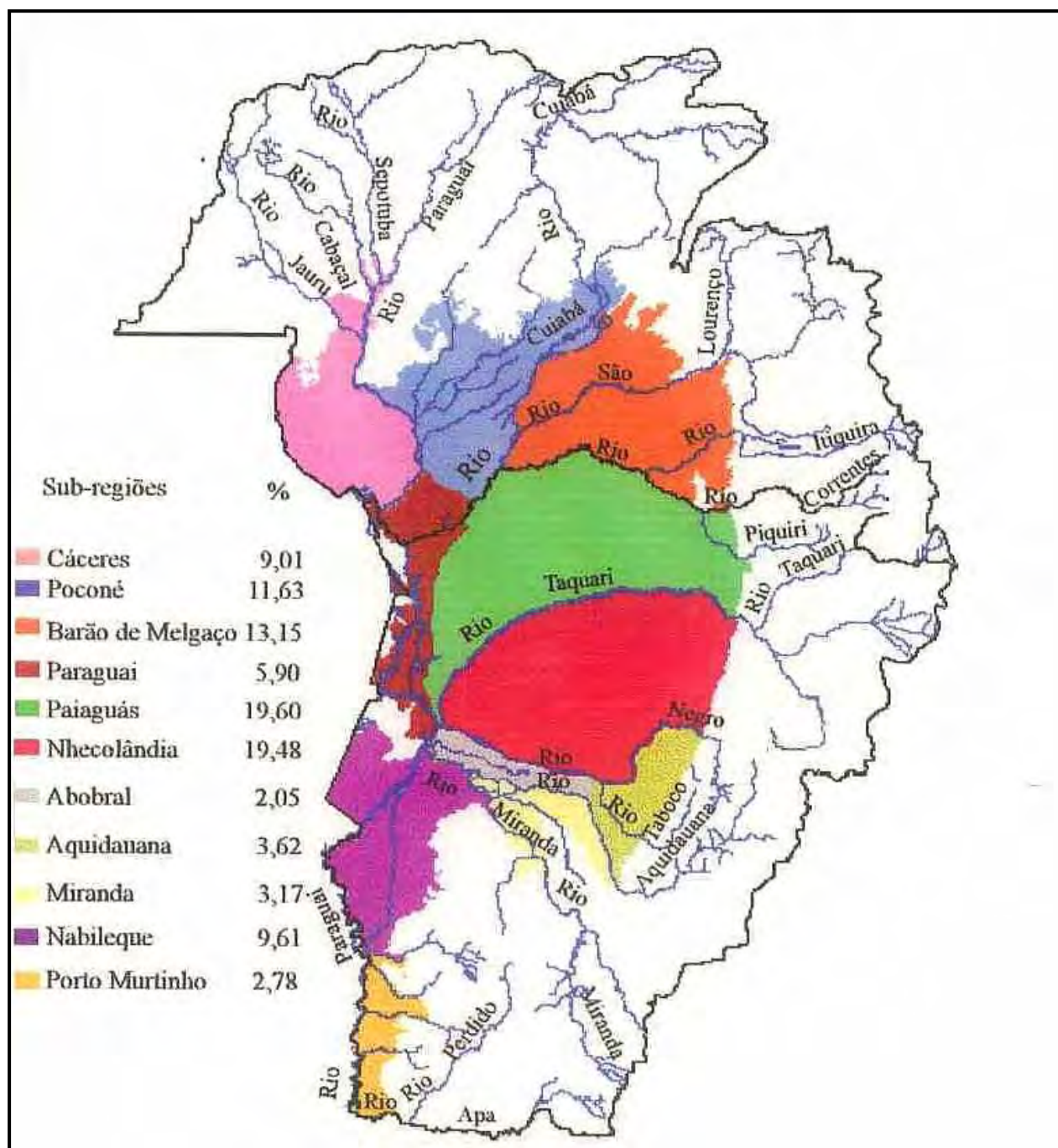


Figura 1: Mapa do Pantanal Mato-Grossense com os principais rios formadores e as 11 sub-regiões (Fonte: Silva & Abdon, 1998).

Hidrograficamente, esta região faz parte da Bacia do Alto Paraguai, sendo percorrida por rica rede hidrográfica formada de inúmeros tributários do rio Paraguai. (Rizzini, 1997). Os principais afluentes desse rio em terras do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, são os rios Jauru, Cuiabá, São Lourenço, Piquiri, Taquari, Negro, Miranda e Apa (Britski *et al.*, 2007).

O rio Paraguai, bem como os outros rios pantaneiros, apresenta uma baixa declividade. A diferença no nível das águas entre as estações de seca e de cheia é em média de quatro metros, e, em decorrência desta baixa declividade, determinadas condições de pluviosidade podem resultar no alagamento de toda a região do Pantanal. Nas grandes cheias, os rios Paraguai, Cuiabá, Taquari, Miranda, São Lourenço e respectivos afluentes extravasam de seus leitos formando uma densa rede de lagoas, baías, baixadas alagadas e varjões ligados por cursos d'água perenes (corixos) ou efêmeros (vazantes). Quando as águas voltam ao normal, inúmeras pequenas baías e lagoas permanecem (Por *et al.*, 1997).

No Pantanal predominam vastas áreas de campo com manchas esparsas de mata que igualmente são inundadas anualmente e onde, nas áreas abertas, há um grande crescimento de macrófitas aquáticas e de perifiton por sobre a vegetação inundada (Resende *et al.*, 1998). Esta região apresenta um regime hidrológico peculiar que se caracteriza pela alteração sazonal dos níveis dos rios chamado pulso de inundação, que está entre os principais fatores que regem o funcionamento do sistema e garantem a biodiversidade, representada por mais de 650 espécies de aves, 80 espécies de mamíferos, 50 espécies de répteis, 2000

espécies de plantas e mais de 260 espécies de peixes (Marques, 2005). É a maior região alagável do mundo e tem extrema importância na América do Sul, tanto ecologicamente, devido à sua biodiversidade, como economicamente, devido aos empreendimentos relacionados ao turismo, à pesca de peixes de água doce, à bovinocultura de corte, à vida selvagem, às plantas forrageiras e à extração de madeira (Heckman, 1998). Em 2000 esta região foi reconhecida como Reserva da Biosfera e Patrimônio Natural da Humanidade pela Organização das Nações Unidas para a Educação, Ciência e Cultura (UNESCO) (Marques, 2005; Vieira, 2005). Projetos de desenvolvimento tendem a melhorar as condições de sustento e estimular o crescimento econômico, com consequências ecológicas e sócio-econômicas (Junk & Cunha, 2005).

A diversidade da ictiofauna do Pantanal existe graças a processos evolutivos, como o desenvolvimento de diferentes estratégias de uso dos recursos ambientais, principalmente quanto à obtenção de energia por meio da alimentação. Assim, nessa região, há peixes detritívoros (alimentam-se de restos de animais e vegetais encontrados no fundo dos rios), herbívoros (alimentam-se de folhas e frutos), piscívoros (que se alimentam de peixes) e suas variações, que apresentam outras formas de alimentação, como por exemplo, os insetívoros, iliófagos (que se alimentam de lama), lepidófagos (que se alimentam de escamas), etc. (Marques, 2005).

Segundo Lévêque *et al.* (2008), a maior diversidade de famílias e espécies de peixes de água doce ocorre nos grupos Ostariophysi (Characiformes, Cypriniformes, Siluriformes e Gymnotiformes), Perciformes (que inclui a família Cichlidae) e os Cyprinodontiformes. Na região Neotropical, cerca de 4.475

espécies estão descritas, podendo chegar a mais de 6.000 incluindo as espécies já reconhecidas porém ainda não descritas pelos pesquisadores (Reis *et al.*, 2003). Sua grande maioria está distribuída em cinco grupos dominantes: Characiformes, com cerca de 1.500 espécies descritas; Siluriformes, com pelo menos 1.400 espécies descritas; Gymnotiformes, com cerca de 180 espécies descritas, Cyprinodontiformes, com cerca de 400 espécies descritas; e ciclídeos, com cerca de 450 espécies descritas (Lévêque *et al.*, 2008).

No Pantanal, Britski *et al.* (2007) assinalaram 110 espécies de Characiformes, 105 de Siluriformes, 15 de Gymnotiformes, 17 de Cichlidae, 11 de Cyprinodontiformes e 11 espécies pertencentes a outros grupos, totalizando 269 espécies, a maior parte delas redescritas sucintamente. Os peixes do Pantanal são grandes migradores (Por *et al.*, 1995) e sua migração sazonal, denominada piracema, é um fenômeno do qual participam os diversos grupos de peixes. Os indivíduos adultos migram rio acima de maio a outubro/novembro, durante o período das secas. De novembro a fevereiro/março, quando se iniciam as chuvas mais intensas, ocorre o processo de reprodução nas cabeceiras. Posteriormente alevinos e adultos carregados pelas cheias penetram nas baías alagadas onde há produtos resultantes da decomposição de plantas e outros elementos que podem se converter em alimentos. No Pantanal Norte, cessando as chuvas entre final de março e meados de abril, os peixes bem alimentados voltam ao leito dos rios (Ferraz de Lima, 1986/87). No Pantanal Sul, devido à defasagem da frente de inundação, como consequência da baixa declividade, a cheia ocorre de maio a junho, com a vazante nos meses de agosto a outubro.

Na medida em que a utilização econômica dos peixes do Pantanal aumenta, mais e mais espécies são incluídas no rol das pescáveis, havendo uma tendência para que os peixes da base da cadeia alimentar sejam aproveitados não somente pelos grandes carnívoros. Essa situação já vem acontecendo no Pantanal e pode ser evidenciada pelo fato de que, na década 70, as espécies mais pescadas eram os grandes bagres, representados pelo pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e pela cachara (*Pseudoplatystoma reticulatum*). Mais recentemente, o pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) tornou-se a mais pescada (Resende *et al.*, 1998). Assim, considerando-se que a conservação e uso sustentável dos recursos pesqueiros dependem de estudos da biologia, ecologia, reprodução, genética, estrutura trófica, etc., os resultados do presente estudo poderão oferecer as ferramentas para a realização de um planejamento de exploração racional e de manejo adequado, garantindo a sustentabilidade neste ambiente.

1.2) O Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887)

A espécie conhecida como pacu, pacu-caranha, caranha, pacu-guaçu, era, anteriormente, identificada como *Colossoma mitrei*. Posteriormente, verificou-se que a mesma espécie já havia sido descrita por Holmberg alguns anos antes (Britski *et al.*, 2007), passando então à denominação atual, *Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887.

Esta espécie caracteriza-se como um serrasalmideo de grande importância comercial (Severi *et al.*, 1999) que apresenta ampla distribuição na bacia do

Paraná/Paraguai formada pelos rios Paraguai e Paraná; e do Prata formada pelos rios do Prata, Uruguai e seus afluentes (Fowler, 1850; Resende, 2003). Possui corpo ovalado e robusto, com dorso cinza escuro e ventre amarelado (Britski *et al.*, 2007) (Figura 2). Assim como a maioria das espécies de peixe de interesse comercial do Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, o pacu é um peixe de ambientes lóticos e semi-lóticos (Agostinho *et al.*, 2004) que desova após longa distância de migração percorrida. A maturidade sexual é alcançada com cerca de três anos (Ferraz de Lima *et al.*, 1984) e aproximadamente 34 cm do comprimento total (Vazzoler *et al.*, 1997) e a maturação dos ovos leva quatro meses para se completar (entre julho a outubro). A desova geralmente acontece em novembro (Ferraz de Lima *et al.*, 1984).

É considerada como uma das espécies de grande valor comercial e de grande potencial para a piscicultura nacional (Castagnolli & Zuim, 1985; Calcagnoto, 1998; Jomori *et al.*, 2003; Resende, 2003; Catella, 2001 *apud* Peixer & Petrere, 2007) e até internacional (Pullela, 1997) e chega a alcançar 5 kg (Catella *et al.*, 1996) e 60 a 82 cm de comprimento (Vazzoler *et al.*, 1997, Britski, *et al.*, 2007). Ocupa atualmente posição de destaque na pesca comercial e esportiva na região, sendo a primeira espécie em captura (Catella *et al.*, 1996; Resende, 2003) Seus estoques tem diminuído nas últimas décadas devido principalmente à sobrepesca (Resende, 2003) e também devido às grandes alterações em seu habitat (Smith *et al.*, 2003 *apud* Makrakis *et al.*, 2007). Sua dieta é predominantemente vegetariana, alimentando-se, também de alguns insetos (Hahn *et al.*, 2004). Possui uma dentição particular na forma de dentes molariformes grandes multicuspidados, especialmente adaptada para quebrar e

esmagar frutos e sementes que compõem a sua alimentação na fase adulta (Resende *et al.*, 1998). Durante as enchentes, os pacus costumam ficar embaixo das palmeiras carandás (*Copernicia Alba*) aguardando a queda dos seus frutos para se alimentarem (Resende *et al.*, 1998). Devido ao seu rápido desenvolvimento e facilidade de manejo, além da sua grande rusticidade e adaptação à alimentação artificial (Carneiro *et al.*, 1995), o pacu é utilizado extensivamente em programas de aquicultura, juntamente com o tambaqui e seus híbridos recíprocos (Saint-Paul, 1985).

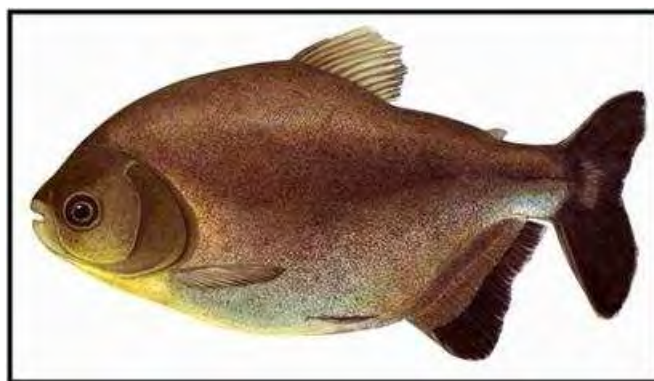


Figura 2: Exemplar de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Fonte: Britski *et al.* (2007).

Embora de interesse bastante evidente, ainda são poucos os estudos relacionados a esta espécie, principalmente estudos genéticos. Zamparetti (1996) estudou quatro populações de pacu oriundos de estoques selvagens utilizando marcadores citogenéticos (coloração convencional, bandeamento C e NOR, biometria cromossômica) e moleculares (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso). O autor verificou que as análises

citogenéticas de coloração convencional, de bandeamento NOR e de biometria cromossômica não apresentaram diferenças entre as populações. No bandeamento C, alguns cromossomos mantiveram-se sem variação e outros apresentaram variações nas marcações dos blocos de heterocromatina constitutiva, tornando possível uma caracterização populacional com base nesta característica. Nas análises moleculares com o uso da técnica de RAPD e utilizando 160 *primers*, o autor não encontrou marcador populacional discriminativo entre as quatro populações estudadas.

Calcagnotto *et al.* (2001) isolaram locos microssatélites em pacu. Os oito locos isolados foram polimórficos apresentando média de 6,5 alelos por loco. Cinco locos exibiram heterozigosidade maior que 60%. Os autores também encontraram alto nível de amplificação destes *primers* em outras espécies do gênero Serrasalminae.

Calcagnotto (1998) utilizou bancos genéticos selvagens de pacu para realizar a caracterização das populações através da análise do DNA mitocondrial. Este marcador caracteriza-se como uma molécula circular pequena, fechada covalentemente, cujo tamanho varia de 14 a 26 kb (Bilington & Hebert, 1991). Apresenta um conteúdo gênico altamente conservado, representado por dois genes que codificam RNAs ribossômicos (rRNAs 12S e 16 s), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP segundo Moysés (2005). Os resultados obtidos indicaram uma baixa variabilidade genética nos estoques selvagens de pacu analisados.

A caracterização de um número mais representativo de estoques de pacu da região do Pantanal Matogrossense poderia, pois, envolver implicações práticas para o cultivo desta espécie e para o estabelecimento de estratégias relacionadas à sua conservação (Calcagnotto *et al.*, 2001).

1.3) Estudos Genéticos em Peixes

Muitas espécies aquáticas têm sofrido risco de extinção devido às atividades humanas que modificam e afetam a estrutura e manutenção das espécies na natureza, como alterações de gradientes dos leitos dos rios, criações e/ou interrupções de fronteiras entre habitats, introdução de espécies de peixes exóticos em ambientes naturais e de peixes nativos, sem o estabelecimento de programas de manejo e de monitoramento genético (Futuyma, 1992; Toledo-Filho *et al.*, 1992, Hurt & Hedrick, 2004). Torna-se, então, importante conservar os recursos genéticos de peixes, para garantir e manter a diversidade genética intra e interespecífica, identificando maneiras de conservação e criando o estabelecimento de programas de manejo e monitoramento (Zamparete, 1996). Além disso, o incremento da investigação sobre a genética de peixes pode gerar informações de grande importância em programas de melhoramento genético das espécies de interesse zootécnico, promovendo o desenvolvimento da aquicultura. A contribuição da genética para a piscicultura abrange tanto a aplicação de metodologia clássica como seleção, hibridação e análises dos níveis de endocruzamento como o emprego de técnicas utilizadas em biotecnologia e

engenharia genética como manipulação cromossômica, reversão sexual, utilização de marcadores moleculares e transgenia (Toledo-Filho *et al.*, 1996).

As pesquisas em genética de populações de peixes têm contribuído para elucidação de várias questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, da sua origem e suas características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas entre populações, migração, tamanhos da população, seleção natural e eventos históricos (Sunnucks, 2000). A citogenética de peixes neotropicais tem contribuído na separação de espécies próximas e, muitas vezes, na elucidação da história evolutiva de espécies e populações, auxiliando na compreensão das relações de parentesco entre ou dentro de diferentes ordens, famílias ou gêneros. Entretanto, tais técnicas, quando aplicadas isoladamente, não são totalmente eficazes para a elucidação de todas as questões evolutivas. Os marcadores moleculares, portanto, podem constituir-se em ferramentas úteis na separação de espécies e populações, quando as características morfológicas e citogenéticas não forem suficientes (Marques, 2002). São identificados como qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso ou de um segmento específico de DNA.

O incremento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido. A tecnologia de DNA recombinante e o desenvolvimento da amplificação de segmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou reação em cadeia da polimerase), abriram caminho para uma mudança no paradigma genético básico da inferência do genótipo a partir do fenótipo, no qual Mendel foi pioneiro, para a análise genética da variação na seqüência de DNA (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados na identificação de populações de peixes, na verificação de relações filogenéticas entre espécies e na verificação da segregação reprodutiva entre populações isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (Bernatchez *et al.*, 1998). Também podem auxiliar na caracterização dos estoques nos programas de melhoramento genético de peixes. Suas aplicações em quaisquer organismos são inúmeras e envolvem, também, a estimativa da variabilidade genética de estoques, que é de fundamental importância para estudos de biologia básica e aplicada. Os marcadores genéticos podem ser utilizados para estimar inúmeros parâmetros de interesse ecológico como taxas de migração, tamanho da população, efeito gargalo, relação de parentesco e outros (Salkoe & Toonen, 2006). Diversas técnicas de biologia molecular estão hoje disponíveis para a detecção de variabilidade genética ao nível de seqüências de DNA, ou seja, para a detecção de polimorfismos genéticos, para uso tanto nos estoques em cativeiro como em populações naturais. O RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* ou Polimorfismos de DNA Amplificados ao Acaso), por exemplo, tem sido utilizado satisfatoriamente em estudos de genética populacional de peixes (Saitoh, 1998; Revaldaves, 2001; Shikano & Taniguchi, 2002).

Os locos microssatélites, também conhecidos como SSR (*simple sequence repeats*) ou STR (*short tandem repeats*), consistem em seqüências curtas de DNA com um a seis nucleotídeos de comprimento repetidos em *tandem* e dispersas pelo genoma nuclear de organismos procariotos e eucariotos (Litt & Luty, 1989). A técnica utilizada para a análise do polimorfismo dos microssatélites se baseia na

técnica de PCR, na qual se utiliza *primers* específicos (de 20 a 30 bases) para a amplificação de um determinado segmento de DNA, os quais são complementares a seqüências únicas que, nesse caso, flanqueiam um microssatélite. Segmentos amplificados a partir destes sítios quase que invariavelmente apresentam um polimorfismo extensivo, resultante da presença de diferentes números de elementos simples repetidos. Assim, cada "ilha" microssatélite, independentemente do elemento repetido (CA, TG, ATG, etc), constitui um loco genético altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo (Ferreira & Grattapaglia, 1998).

Para usufruir do grande potencial dos microssatélites torna-se necessário entender como estes evoluem dentro e entre espécies. A identificação de um ancestral comum pode ser prejudicada devido às altas taxas de mutação que também pode resultar numa convergência excessiva de estados alélicos, subestimando a divergência alélica entre populações (Fitzsimmons *et al.*, 1995).

Dois modelos foram propostos para explicar o papel das mutações na evolução dos microssatélites: o modelo dos alelos infinitos (IAM, *Infinite Allele Model*) (Kimura & Crow, 1965 *apud* Moysés, 2005) e o modelo *stepwise* (SMM, *Stepwise Mutation Model*) (Kimura & Ohta, 1978 *apud* Moysés, 2005). No modelo IAM, cada mutação cria um novo alelo a uma dada taxa (u), não permitindo homoplasia. Alelos idênticos compartilham o mesmo ancestral e são idênticos por descendência. O modelo SMM considera que cada mutação cria um novo alelo através de ganho ou perda de uma repetição com probabilidade igual a $u/2$ em ambas as direções. Assim, os alelos de tamanhos muito diferentes são considerados menos relacionados que aqueles de tamanhos similares,

caracterizando uma memória em relação ao tamanho do alelo, ao contrário do modelo IAM (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

Os microssatélites possuem características que os tornam excelentes marcadores como abundância no genoma nuclear, alto polimorfismo, exibem níveis de alelismo e de heterozigosidade, são marcadores codominantes e apresentam herança Mendeliana. E sendo esta metodologia baseada em PCR, pequenas quantidades de DNA são suficientes para as análises (Wright & Bentzen, 1994). Devido a essas características, os microssatélites são rotineiramente utilizados para investigar a estrutura genética de populações naturais e padrões de fluxo gênico e podem ser utilizados como uma ferramenta na seleção de linhagens para acasalamentos geneticamente controlados. Sua aplicação é ampla, como se pode observar em alguns relatos como no trabalho de Ward *et al.* (2003), que examinaram polimorfismos em 10 locos microssatélites em populações de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) de pisciculturas para verificar a variabilidade genética. Hara & Sekino (2003) determinaram a paternidade da progênie de um estoque de criação de *Paralichthys olivaceus* usando locos microssatélites. Cnaani *et al.* (2003) pesquisaram a ligação genética entre marcadores microssatélite e QTL (*Quantitative trait loci* ou locos de características quantitativas) para tolerância ao frio e tamanho de peixe em híbridos interespecíficos de tilápia (*Oreochromis niloticus*).

Uma vez identificados os marcadores genéticos associados a caracteres de importância zootécnica, estes poderiam ser utilizados para orientar programas de seleção, auxiliando no aumento de freqüências de alelos favoráveis ou assistindo à introgressão de genes candidatos em linhagens divergentes. O uso da

metodologia molecular na pesquisa pesqueira tem aumentado devido ao desenvolvimento de técnicas e também pela conscientização do valor dos dados genéticos. Nesse sentido, os marcadores moleculares têm permitido avanços nos estudos sobre a análise de estrutura de estoques, aquicultura e taxonomia/sistemática (Ward & Grewe, 1995).

Os microssatélites tem se tornado o mais popular e versátil marcador para aplicações ecológicas, pois fornecem estimativas contemporâneas de migração, podem identificar relações de parentesco entre os indivíduos e distinguir taxas relativamente altas de desvios da panmixia (Salkoe & Toonen, 2006).

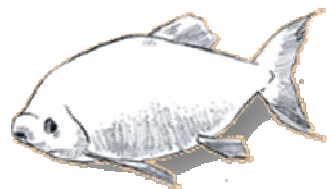
Feldheim *et al.* (2001) utilizaram marcadores microssatélites para caracterizar a estrutura genética de populações de tubarão (*Negaprion brevirostris*) do oeste do Atlântico. As análises mostraram uma leve estruturação genética em apenas uma população e a ocorrência de fluxo gênico nas demais. Morelli *et al.* (2007) verificaram, através do uso de marcadores microssatélites e DNA mitocondrial, que populações de *Prochilodus lineatus* apresentaram leve estruturação entre os animais residentes e migrantes, do rio Mogi-Guaçu.

López (2006) utilizou seis locos microssatélites isolados para pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) para verificar a variabilidade genética de populações de *Brycon sinuensis*. Os resultados mostraram que as populações não se encontravam em equilíbrio de Hardy Weinberg e apresentaram baixa estruturação. Pampoulie *et al.* (2006) utilizaram nove locos microssatélites e o loco *Pan I* para verificar a existência de estrutura genética nas populações de bacalhau (*Gadus morhua*) da Islândia. Os estudos voltados para a conservação de populações ou espécies de importância econômica ou em risco de extinção

fornece dados que constituem uma base essencial na tomada de medidas de manejo de populações selvagens ou cultivadas (Marques, 2002).

O conhecimento de como a variabilidade genética é partilhada entre as populações tem grande importância não apenas nas áreas de biologia evolutiva e ecologia como também na biologia da conservação (Balloux & Lugon-Moulin, 2002) e as informações sobre a estrutura de populações podem fornecer valiosas diretrizes para estratégias de conservação e manejo (Eizirik *et al.*, 2001). Entender o processo de fluxo gênico e seus efeitos torna-se importante para vários campos de pesquisa incluindo a genética e ecologia de populações, epidemiologia e conservação biológica. Estimativas confiáveis da diferenciação populacional são primordiais na biologia da conservação no qual se considera continuamente necessário entender se as populações são geneticamente isoladas de outras ou se constituem uma única população panmítica (Balloux & Lugon-Moulin, 2002).

O conhecimento da estrutura de populações pode fornecer valiosas diretrizes para estratégias de conservação e manejo.



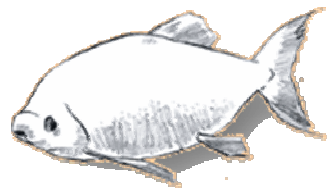
Objetivos

2) OBJETIVOS

Considerando que os microssatélites constituem uma das mais importantes classes de marcadores moleculares utilizados atualmente para estudos populacionais, o presente projeto teve como objetivo principal caracterizar a diversidade genética de populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) da Bacia do Alto Paraguai utilizando estes marcadores. A partir destas informações tornar-se-á possível estabelecer a ocorrência de bancos genéticos selvagens para esta espécie e avaliar a existência de diferenças entre populações de diferentes localidades.

De forma específica, pretende-se:

- a) Estudar, com uso de marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite, a variabilidade genética do pacu da Bacia Hidrográfica do Alto Paraguai,
- b) Identificar geneticamente as populações e caracterizar possíveis bancos genéticos para esta espécie naquele complexo hidrográfico,
- c) Investigar a ocorrência e intensidade do fluxo gênico entre as populações,
- d) Avaliar as implicações das condições ambientais na composição genética das populações de pacu e seu significado biológico.



Material e Métodos

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Coleta de amostras de tecido

O mapeamento das populações selvagens de pacu da região do Pantanal Matogrossense já está em andamento, sendo desenvolvido pela EMBRAPA–Pantanal. Esta instituição possui uma coleção de peixes que foram disponibilizados para a realização deste trabalho. Todo material biológico amostrado foi devidamente identificado segundo seu local de coleta para que se iniciassem as análises moleculares. Estipulou-se, inicialmente, que fossem coletados pelo menos 30 indivíduos de cada uma das localidades escolhidas para este projeto. Porém nem todas as localidades puderam apresentar esse número amostral determinado devido a disponibilidade de peixes da região.

Na Tabela 1 estão os dados de localidade, número amostral e nomenclatura utilizada e a Figura 3 ilustra os locais de coleta na região do Pantanal Matogrossense.

Tabela 1: Localidades, número de amostras e nomenclatura utilizada para os tecidos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) nos estudos realizados.

Sub- bacias	Localidade	Amostras	Nomenclatura
3	Rio Cuiabá (Parque Nacional – Foz)	34	RPCN
	Rio São Lourenço	31	RSLO
	Rio Cuiabá (SESC Pantanal)	40	RCSE
4	Rio Taquari Caronal	11	RTCA
	Rio Taquari Palmeiras	35	RTPA
5	Rio Negro	13	RNEG
Rio Paraguai	Rio Paraguai Mirim	16	RPMI
	Rio Paraguai Corumbá	19	RPCO
	Rio Paraguai Cáceres	25	RPCA
TOTAL		224	

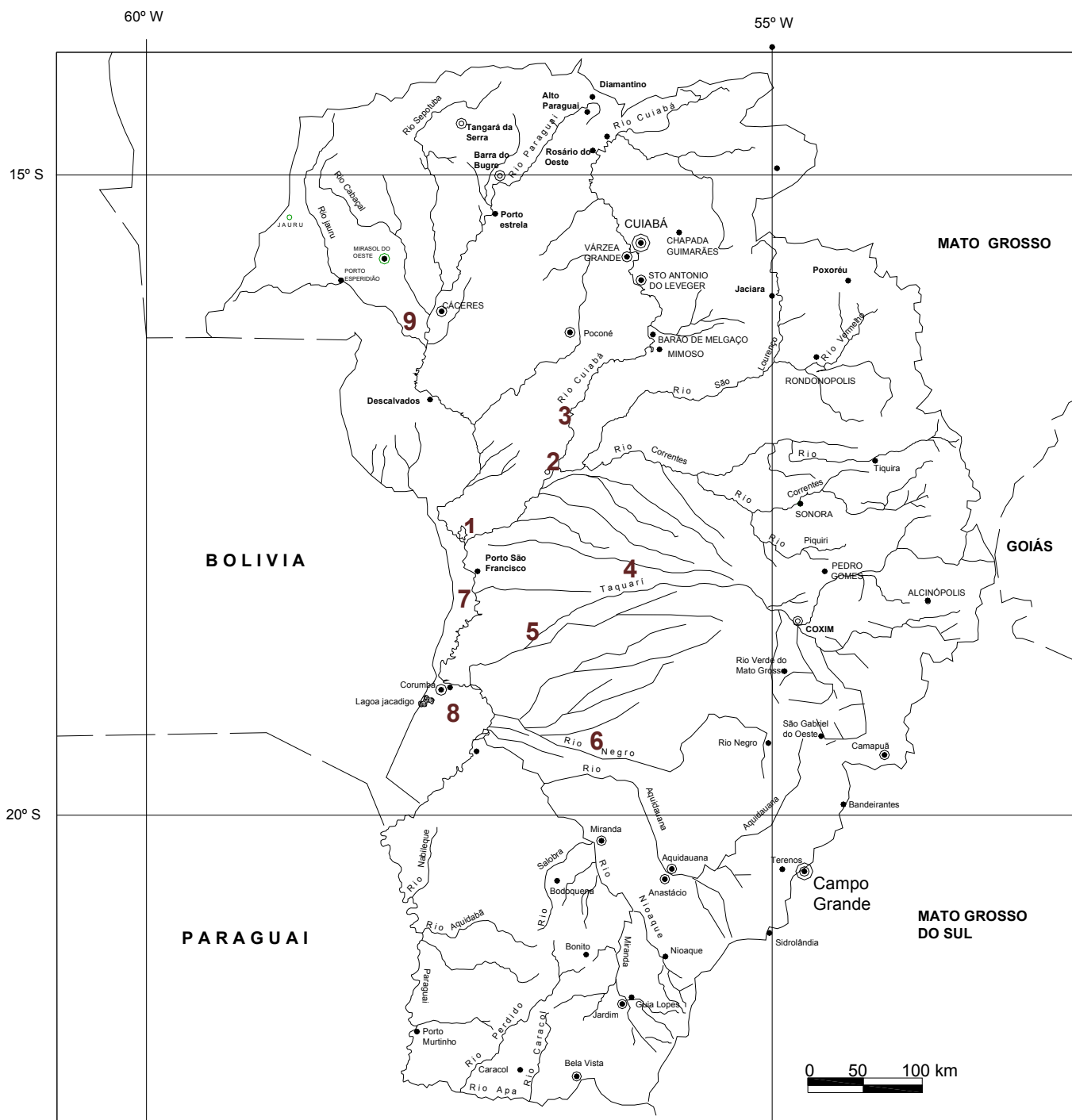


Figura 3: Mapa representativo do Pantanal Mato-Grossense com os locais de coleta. 1: Rio Cuiabá/Parque Nacional – Foz; 2: Rio São Lourenço; 3: Rio Cuiabá/SESC Pantanal; 4: Rio Taquari/Caronal; 5: Rio Taquari/Palmeiras; 6: Rio Negro; 7: Rio Paraguai Mirim; 8: Rio Paraguai/Corumbá; 9: Rio Paraguai/Cáceres.

3.2) Isolamento do DNA genômico

A extração do DNA genômico a partir das amostras de nadadeiras de cada indivíduo coletado foi feita segundo Aljanabi e Martinez (1997).

Os procedimentos desta técnica foram:

- Colocar 290 µl de tampão de extração (30 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% SDS) mais 10 µl de Proteinase K (10 mg/mL) e um fragmento de tecido (cerca de 10,5 mg);
- Incubar em banho maria à 55°C por 2 a 3 horas ou até que a amostra esteja digerida. Agitar o tubo periodicamente;
- Retirar do banho e acrescentar 100 µl de solução de NaCl 5M e misturar bem invertendo o tubo vagarosamente;
- Centrifugar a 10000 RPM por 10 minutos em temperatura ambiente;
- Remover o sobrenadante e transferir para outro tubo de 1,5 mL. O tubo com o resíduo decantado pela centrifugação pode ser descartado;
- Adicionar 600 µl de etanol 100% gelado sobre o sobrenadante e misturar o conteúdo do tubo invertendo-o gentilmente até que os filamentos brancos de DNA formem uma massa visível. A não formação dessa massa não significa a não existência de DNA;
- Colocar no freezer -70°C por 20 minutos para que o DNA se precipite;
- Centrifugar a 14000 RPM por 30 minutos à 4°C;
- Descartar o etanol;
- Adicionar 1000 µl de etanol 70% gelado e inverter o tubo;

- Centrifugar a 14000 RPM por 5 minutos à 4°C;
- Descartar o etanol
- Secar em estufa à 37°C por 20 a 30 minutos. Certificar-se de que o etanol tenha evaporado todo;
- Adicionar 200 µl de água Milli Q autoclavada;
- Deixar hidratando a temperatura ambiente por 24 horas.

3.3) Verificação da integridade do material

Após o isolamento do DNA genômico, as amostras obtidas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1%, que foi preparado fundindo-se 0,15 g de agarose no volume de 150 ml de tampão TAE (Tris/Acetato/EDTA) 1X em forno de microondas. Esta solução foi resfriada até temperatura próxima a 60°C e vertida em suporte adequado para cuba de eletroforese. Deixou-se solidificar, completou-se a cuba com tampão de corrida (o mesmo utilizado para preparar o gel) e as amostras contendo 3 µl de material e 1 µl de corante azul de bromofenol foram aplicadas nos poços do gel. Este corante serviu de indicador para localização dos fragmentos de DNA no decorrer da eletroforese. As amostras aplicadas foram submetidas a uma voltagem constante de 100 V e amperagem de 250 mA por uma hora. Após a corrida, as moléculas de DNA foram coradas submergindo-se o gel em solução de brometo de etídeo (0,05 mg/ml) e fotografados utilizando-se o *Kodak Digital Science 1D*.

Esta eletroforese permitiu verificar a integridade do DNA das amostras indicadas para serem utilizados nas reações de amplificação.

3.4) Amplificação dos locos microssatélites

As análises dos polimorfismos de microssatélite procederam-se a partir das amostras de DNA de cada animal, realizando a amplificação da região com as seqüências simples repetidas em um termociclador (PTC-100™ *Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc.*). Para verificar a composição da estrutura genética de populações de pacu, foram utilizados *primers* desenhados especificamente para esta espécie, descritos no trabalho de Calcagnotto *et al.* (2001). Na Tabela 2 estão relacionadas as informações sobre os *primers* utilizados para a avaliação da diversidade genética das populações de pacu do Pantanal Matogrossense.

Tabela 2: Informações sobre os *primers* (Calcagnotto *et al.*, 2001) utilizados para amplificar os locos microssatélites em pacus (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887).

Loco	Nº acesso no "GenBank"	Varição do tamanho dos alelos	Tipo de repetição	Primer (5'-3')
Pme2	AF362445	195 – 213	(GT)18	F: TGGGTGCACAGCACAGTAAC R: TTTGCATTCTGGTGCAAAG
Pme4	AF362446	191 – 213	(GT)14	F: CATGCTGCTGCAGATTAGAC R: CGCTTGCAATTTAACGCAGT
Pme5	AF362447	182 – 200	(GA)10gggagctggta (GT)10C(GT)12	F: CAGAGCATCTGGAGGGACAT R: TCTGAGACACTGATATCTAAACACACA
Pme14	AF362448	195 – 208	(CTG)7	F: ACCGTTATGCCCTACCCCTTC R: GCGTTCTAGACAGAACTCATGG
Pme20	AF362449	213 – 215	(GT)15	F: CAGAGCTTTGAGGAACACGA R: CCCATCAGTTACGGGTCATT
Pme21	AF362450	260 – 268	(GT)15	F: ATAATGCTGGCGTCAGTGGT R: GGACAGCTGGTCTCAAGCTC
Pme28	AF362451	209 – 227	(GT)15	F: CCCAGAAGAGTGGAAGCTGT R: TGGTGGGAATTGACAAGAAA
Pme32	AF362452	242 – 247	(CTG)7	F: GCGAGGAAATCTGCCTGTGAC R: AGGAGGGCATCATGGAGAA

A amplificação das regiões com os microssatélites foi realizada seguindo as orientações citadas por Calcagnotto *et al.* (2001). Com relação à padronização da técnica do PCR, foram realizados ensaios variando-se as quantidades de

alguns reagentes da reação, temperatura de anelamento dos *primers* e tempos nos ciclos de amplificação no termociclador, na tentativa de otimizar a técnica. Porém, resultados mais significativos foram alcançados com a realização das reações e dos programas de PCR segundo Calcagnotto (comunicação pessoal), seguindo os protocolos desenvolvidos pela autora (Tabelas 3 e 4).

Tabela 3. Representação de um mix de PCR com seus componentes para o *primer* Pme2

Componente Básico	Reação (µl)
H ₂ O Milli Q autoclavada	7,00
Tampão 10X	1,25
dNTPs 8 Mm	1,25
MgCl ₂ 25 µM	0,37
<i>Taq</i> DNA polimerase 5 U/µl	0,10
<i>Primer Forward</i> 10 µM	0,4
<i>Primer Reverse</i> 10 µM	0,4
BSA (Soro Albumina Bovina)	1,25
DNA	1,0
Volume final	13,02

Tabela 4. Representação de um mix de PCR com seus componentes para os demais *primers*.

Componente Básico	Reação (µl)
H ₂ O Milli Q autoclavada	6,10
Tampão 10X	1,25
dNTPs 8 Mm	1,25
MgCl ₂ 25 µM	0,75
<i>Taq</i> DNA polimerase 5 U/µl	0,10
<i>Primer Forward</i> 10 µM	0,4
<i>Primer Reverse</i> 10 µM	0,4
BSA (Soro Albumina Bovina)	1,25
DNA	1,0
Volume final	12,5

Com relação aos programas de PCR, a temperatura de anelamento de 57°C foi estipulada para os *primers* Pme2 e Pme21 e de 59°C para os *primers* Pme20 e Pme28. Para os locos Pme4, Pme5 e Pme14, utilizaram-se um ciclo *touchdown*.

Os programas utilizados para realizar a amplificação dos locos citados estão descritos abaixo:

MST 57 (para os locos Pme2 e Pme21):

- 1º passo: 4 minutos à 94°C;
- 2º passo: 45 segundos à 94°C;
- 3º passo: 45 segundos à 59°C;
- 4º passo: 45 segundos à 72°C;
- 5º passo: volta para o 2º passo por 30 vezes;
- 6º passo: 7 minutos à 72°C;

- 7º passo: esfriar à 4°C – Fim.

MST 59 (para os locos Pme20 e Pme28):

- 1º passo: 4 minutos à 94°C;
- 2º passo: 45 segundos à 94°C;
- 3º passo: 45 segundos à 59°C;
- 4º passo: 45 segundos à 72°C;
- 5º passo: volta para o 2º passo por 29 vezes;
- 6º passo: 10 minutos à 72°C;
- 7º passo: esfriar à 4°C – Fim.

Touchdown (para os locos Pme4, Pme5 e Pme14):

- 1º passo: 5 minutos à 95°C;
- 2º passo: 45 segundos à 95°C;
- 3º passo: 45 segundos à 59°C;
- 4º passo: 45 segundos à 72°C;
- 5º passo: volta para o 2º passo uma vez;
- 6º passo: 45 segundos à 95°C;
- 7º passo: 45 segundos à 57°C;
- 8º passo: 45 segundos à 72°C;
- 9º passo: volta para o 6º passo uma vez;
- 10º passo: 45 segundos à 95°C;
- 11º passo: 45 segundos à 55°C;

- 12º passo: 44 segundos à 72°C;
- 13º passo: volta para o 10º passo uma vez;
- 14º passo: 45 segundos à 95°C;
- 15º passo: 45 segundos à 53°C;
- 16º passo: 44 segundos à 72°C;
- 17º passo: volta para o 14º passo uma vez;
- 18º passo: 45 segundos à 95°C;
- 19º passo: 45 segundos à 51°C;
- 20º passo: 45 segundos à 72°C;
- 21º passo: volta para o 18º passo por 25 vezes;
- 22º passo: 10 minutos à 72°C;
- 23º passo: esfriar à 4°C – Fim.

Para os ensaios com o material amplificado das amostras dos indivíduos dos diferentes estoques, a separação dos alelos foi feita em gel de poliacrilamida não desnaturante na concentração de 6% e a visualização dos alelos foi feita utilizando-se o protocolo de coloração com nitrato de Prata, conforme descrito em Suganuma (2004). Procedeu-se à coloração conforme descrito abaixo:

- Preparar a solução fixadora composta de 15 ml de etanol absoluto, 1 ml de ácido acético e água destilada q.s.q. 150 ml;
- Mergulhar o gel na solução fixadora, agitar levemente e deixar por 10 minutos;

- Preparar a solução de nitrato de prata pesando-se 0,3 g de nitrato de prata e dissolvendo em 150 ml de água destilada;
- Verter a solução de nitrato de prata no recipiente com o gel e a solução fixadora e homogeneizar as soluções. Esperar 15 minutos;
- Descartar as soluções e lavar o gel brevemente com água destilada. Preparar a solução reveladora composta de 10 ml de hidróxido de sódio 30%, 2 ml de formaldeído e água destilada q.s.q. 150 ml. Colocar sobre o gel e agitar suavemente até que as bandas apareçam.

Posteriormente, os alelos foram visualizados e fotografados utilizando-se um transiluminador de luz branca e o programa *Kodak Digital Science 1D*.

Oligonucleotídeos com modificações 6-FAM (6-carboxifluoresceína) ou HEX (hexaclaro-6-carboxifluoresceína) na extremidade 5' da direção *forward* foram sintetizados e utilizados em novas reações de PCR.

3.5) Genotipagem automática em seqüenciador

Inicialmente, a genotipagem seria realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida dos produtos de PCR. Devido ao grande trabalho requerido, demora e dificuldade da interpretação dos dados que a aplicação desta metodologia requer, além de acentuar as dificuldades quando um grande número de indivíduos é analisado e/ou vários locos são utilizados, optou-se pela genotipagem em seqüenciador.

O DNA genômico extraído das amostras de nadadeira e os oligonucleotídeos marcados com fluorescência foram utilizados nas reações de PCR para amplificar as regiões microssatélite. Posteriormente, estes produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% para averiguação da concentração. Observando-se a intensidade das bandas, pode-se determinar a diluição das amostras para serem seqüenciadas. As bandas apresentaram-se bastante intensas, podendo-se diluir uma parte do produto de PCR em dez de água Milli Q autoclavada.

As amostras analisadas pelo seqüenciador foram dispostas em uma placa de 96 poços (*Thermo-Fast® 96 PCR Plate Skirted, Low Profile*). Em cada poço foi possível fazer combinações das reações, desde que realizadas com os *primers* marcados com fluorescências diferentes. Assim, em cada poço havia reações de um mesmo indivíduo amplificadas com *primer* marcado com 6-FAM e também com *primer* marcado com HEX.

Além dos produtos de PCR diluídos, foi adicionada uma mistura com o marcador de peso molecular conhecido *MegaBACE™ ET550-R Size Standard* (*GE Healthcare*), mais uma solução de carregamento de *Tween20* (polioxietilenosorbitano monolaurato) a 0,1% em água destilada.

Primeiramente foi realizado um teste no qual foram escolhidas, aleatoriamente, 36 amostras para serem genotipadas. Os resultados obtidos em relação a diluição deste teste foram satisfatórios, permitindo a continuidade do trabalho. Os fragmentos amplificados foram genotipados no seqüenciador automático *MegaBACE™ 1000* (*Amersham Biosciences*), pertencente ao Centro de Estudos do Genoma Humano da Universidade de São Paulo e a visualização

dos resultados foi feita utilizando-se o programa *GeneMarker v.1.6* (Soft Genetics LLC). O tamanho dos alelos foi obtido por comparação com o marcador de peso molecular *MegaBACETM ET550-R Size Standard* (GE Healthcare).

3.6) Forma de análise dos resultados

A determinação do tamanho dos alelos foi realizada utilizando-se o programa *GeneMarker v.1.6* (Soft Genetics LLC), através da comparação com o marcador de peso molecular *MegaBACETM ET550-R Size Standard* (GE Healthcare).

A variabilidade genética das populações de pacu foi determinada utilizando-se programas computacionais como Genepop 1.2 (Raymond & Rousset, 1995), FSTAT v.1.2 (Goudet, 1995), Arlequin ver 2.000, *A Software for Population Genetics Data Analysis* (Schneider *et al.*, 1997), Structure.2.2 (Pritchard, 2000), GeneClass2 (Piry *et al.*, 2004) e Phylip version 3.68 (Felsenstein, 2005).

Os tamanhos dos alelos foram organizados em matrizes de dados que foram submetidas aos programas computacionais. Foram calculados vários parâmetros que permitiram a determinação da diversidade genética intra e interpopulacional. O número de alelos por loco e a riqueza alélica foram calculados utilizando-se o Fstat. A heterozigosidade observada foi calculada segundo Brown & Weir (1983) e a esperada segundo Nei (1978), utilizando o programa Arlequin. Este programa também foi utilizado para calcular o equilíbrio de Hardy Weinberg, o índice Fst segundo Weir & Cockerham (1984), o índice Rst, que é análogo ao Fst, segundo

Slatkin (1995) e a análise de variância molecular (AMOVA). Nesta última análise, as populações foram agrupadas formando cinco combinações:

- Todas as populações formando um grupo.
- Quatro agrupamentos sendo **Grupo I**: RCPN - Rio Cuiabá /Parque Nacional – Foz, RSLO – Rio São Lourenço e RCSE – Rio Cuiabá/SESC; **Grupo II**: RTCA – Rio Taquari/Caronal e RTPA – Rio Taquari/Palmeiras; **Grupo III**: RNEG - Rio Negro; **Grupo IV**: RPMI - Rio Paraguai Mirim, RPCO – Rio Paraguai/Corumbá e RPCA – Rio Paraguai/Cáceres.
- Dois agrupamentos: **Grupo I**: RCPN - Rio Cuiabá /Parque Nacional – Foz, RSLO – Rio São Lourenço, RCSE – Rio Cuiabá/SESC e RPCA – Rio Paraguai/Cáceres; **Grupo II**: Rio Taquari/Caronal, RTPA – Rio Taquari/Palmeiras, RNEG - Rio Negro, RPMI - Rio Paraguai Mirim e RPCO – Rio Paraguai/Corumbá.
- Cinco agrupamentos: **Grupo I**: RCPN - Rio Cuiabá/Parque Nacional – Foz, RSLO – Rio São Lourenço e RCSE – Rio Cuiaba/SESC; **Grupo II**: RTCA – Rio Taquari/Caronal e RTPA – Rio Taquari/Palmeiras; **Grupo III**: RNEG - Rio Negro; **Grupo IV**: RPMI - Rio Paraguai Mirim e RPCO – Rio Paraguai/Corumbá; **Grupo V**: RPCA – Rio Paraguai/Cáceres.

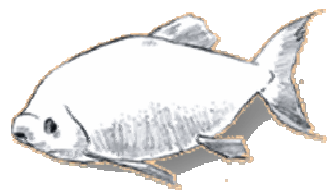
O índice de fixação de Wright (1978), que mede a deficiência de heterozigotos, a diferenciação populacional alélica e genotípica e o teste exato segundo Raymond & Rousset (1995), que leva em conta a frequência das bandas para ser calculado foram calculados utilizando o programa Genepop. A distância

de *chord* de Cavalli Sforza & Edwards (1967) foi calculada através do programa GeneClass2.

O programa Structure foi utilizado para verificar a estrutura populacional. Para a determinação do número de populações (K) existentes utilizou-se o modelo de ancestralidade misturada (*Admixture*), com os alelos correlacionados, que permite a resolução máxima na separação das populações com K variando de 1 a 12. 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).

Um dendrograma foi gerado a partir da matriz de distância baseada nos valores de distância de *chord*, os quais foram agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (Sneath & Sokal, 1973), utilizando-se o programa Phylip version 3.68 (Felsenstein, 2005).

O número de migrantes foi calculado com base nos alelos privativos segundo Barton & Slatkin (1986), utilizando o programa Genepop.



Resultados

4) RESULTADOS

4.1) Extração e purificação do DNA das amostras

A extração de DNA foi realizada a partir das amostras do material coletadas pela Embrapa–Pantanal e disponibilizadas para este trabalho, sendo devidamente identificadas utilizando-se a nomenclatura indicada na Tabela 7. Nos estudos de diversidade genética são necessários que as amostras sejam identificadas corretamente para que se possa entender o comportamento dessas populações com relação à possível troca de alelos que ocorrem entre elas.

Neste trabalho utilizou-se a metodologia de extração de DNA genômico segundo Aljanabi e Martinez (1997) por apresentar certas vantagens como a facilidade e rapidez da realização, a não necessidade de fenol, que é um reagente tóxico, utilizado no protocolo segundo Sambrook e Russel (2001) e a possibilidade de processar várias amostras de tecido ao mesmo tempo. Esta metodologia mostrou-se bastante eficiente, resultando num material de boa qualidade (Anexos 20, 21, 22 e 23).

4.2) Amplificação dos locos microssatélites

Após a obtenção do DNA procedeu-se à amplificação dos locos microssatélites utilizados neste trabalho para verificar a composição da estrutura

genética das populações de pacu de diferentes sub-bacias do Pantanal Matogrossense.

Os *primers* utilizados são específicos para esta espécie; portanto, as reações e os programas de PCR seguiram recomendações dos autores que os desenharam (Calcagnotto *et al.*, 2001). Mesmo assim foram realizados alguns ensaios para verificar se o DNA obtido pelo método de extração de Aljanabi e Martinez (1997) apresentaria algum problema na amplificação dos locos e também se haveria a necessidade de alguma alteração do protocolo, referente à temperatura de anelamento ou quantidade dos reagentes para se obter melhores resultados. Nesta fase de padronização utilizaram-se *primers* não marcados, uma vez que a verificação destes resultados seria feita no gel de poliacrilamida não desnaturante 6%. Depois de otimizadas as reações e os programas de PCR, os mesmos foram feitos com os *primers* marcados com fluorescência, para proceder à genotipagem no seqüenciador. O protocolo de extração de DNA utilizado não interferiu na amplificação do DNA com os *primers*, tornando possível a sua utilização neste trabalho devido às vantagens já descritas anteriormente.

Com relação às temperaturas de anelamento, não foram necessárias alterações para os *primers* Pme2, Pme20, Pme21 e Pme28. Os programas de PCR utilizados mostraram-se adequados, permitindo especificidade dos locos amplificados. Foram então realizados outros testes com alteração dos reagentes e obtiveram-se bandas bem definidas (Anexos 24, 25, 26 e 27).

Outro fator que foi testado na amplificação dos locos microssatélites foi a concentração do DNA. Nestes testes foram utilizadas as concentrações de 10:1 e 5:1, que foram comparadas com a concentração normal, sem diluição, para

verificar possíveis diferenças. A diluição de 5:1 apresentou bandas bem definidas e menor incidência de sub-bandas (*stutter bands*), que poderiam trazer dificuldades posteriores na análise dos dados (Anexos 26 e 27).

4.3) Genotipagem automática em seqüenciador

As amplificações das regiões microssatélites foram feitas utilizando-se o DNA genômico e oligonucleotídeos marcados com fluorescência para, em seguida, serem genotipados no seqüenciador automático *MegaBACE™ 1000* (Amersham Biosciences). Os tamanhos dos alelos foram determinados por comparações com o marcador de peso molecular *MegaBACE™ ET550-R Size Standard* (GE Healthcare) e, utilizando o programa *GeneMarker v.1.6* (Soft Genetics LLC), visualizou-se os resultados. Nos resultados gerados pelo seqüenciamento, o tamanho dos alelos é determinado pelos picos de intensidade no eletroferograma como mostra a Figura 13, a seguir. Também se pode observar o tamanho dos alelos em pares de base indicados sob seus respectivos picos, nesta figura.

A denominação numérica dada aos alelos por loco obedeceu ao critério de aparecimento de picos nos eletroferogramas. Por exemplo, o primeiro pico foi denominado Alelo 1, o segundo, Alelo 2.

Os indivíduos heterozigotos para os locos estudados são caracterizados pela presença de dois picos bem definidos, enquanto os homozigotos apresentaram um pico apenas (Figura 13). As *stutter bands* se fizeram presentes, mas sempre apresentando picos de menor intensidade ao lado das bandas

representativas, não havendo nenhuma importância para a análise dos dados e nem prejudicando a interpretação dos resultados.

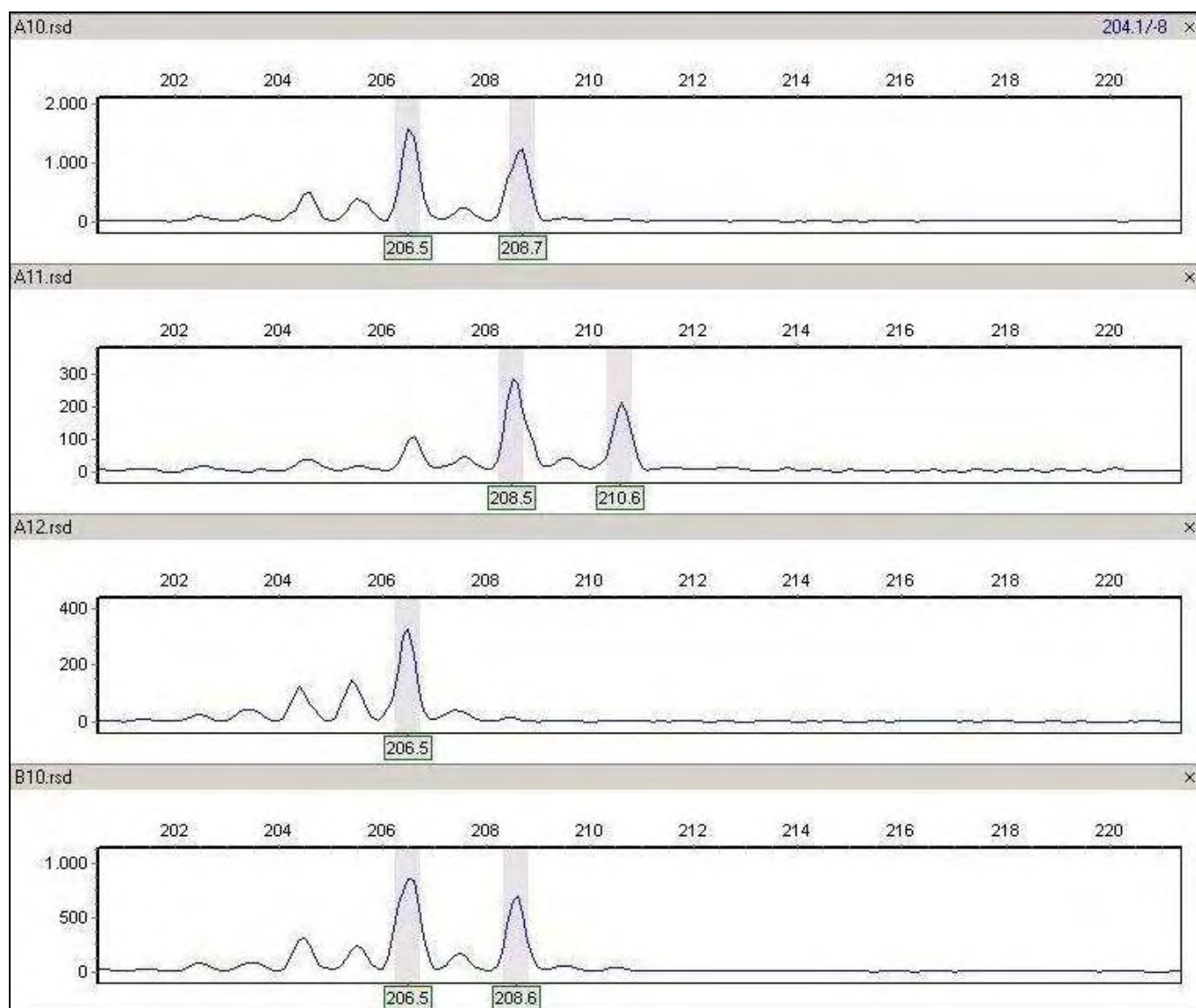


Figura 4. Eletroferogramas com os picos de intensidade indicando o tamanho dos alelos em Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Resultados de alguns indivíduos amplificados com o *primer* Pme2.

4.4) Análises intrapopulacionais

Os tamanhos dos alelos encontrados na análise das populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) utilizando-se oito marcadores microssatélites estão organizados nos Anexos 1 à 9. Anexo 10 encontra-se relacionada as frequências alélicas dos oito locos microssatélites utilizados.

O menor número de alelos foi encontrado nas populações do Rio Negro e Rio Paraguai Mirim. Essa amostra apresentou apenas um alelo; caracterizando seu monomorfismo para o loco Pme32. A população do Rio Cuiabá/Sesc apresentou o maior número de alelos (13) para o loco Pme28. Considerando todas as populações, o loco Pme28 mostrou-se o mais polimórfico, com 14 alelos e os locos Pme21 e Pme32 mostraram-se menos polimórficos, com apenas cinco alelos. Considerando todos os locos, a população que apresentou maior número médio de alelos foi a do Rio Cuiabá/Sesc, com 6,8 alelos. O menor número médio de alelos foi encontrado na população do Rio Negro, com 4,0 alelos (Tabela 5).

Com relação ao tamanho dos alelos, o menor valor foi encontrado na população do Rio Taquari/Palmeiras para o loco Pme5 e apresentou 184 pb (Anexo 4). O maior alelo foi encontrado nas populações do Rio Taquari/Caronal e Rio Paraguai Mirim para o loco Pme21, apresentando 270 pb (Anexo 9).

Alelos exclusivos foram verificados em algumas populações e para certos locos, como podem ser vistos na Tabela 6. Na população do Rio Taquari /Palmeiras encontrou-se o maior número de alelos exclusivos (cinco alelos).

Tabela 5. Número absoluto de alelos por locos nas populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) estudadas. **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

Locos	RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA	Total
Pme2	9	9	9	8	7	6	6	7	8	11
Pme4	10	7	8	6	7	6	8	5	7	11
Pme5	7	7	8	6	8	6	6	7	8	10
Pme14	6	5	5	4	4	4	5	5	4	8
Pme20	3	3	5	4	5	3	4	5	4	6
Pme21	3	3	3	3	2	2	4	2	4	5
Pme28	11	10	13	6	12	4	7	5	9	14
Pme32	2	2	3	2	3	1	1	3	2	5
Total	6,4	5,8	6,8	4,9	6,0	4,0	5,1	4,9	5,8	

Tabela 6. Alelos exclusivos por locos nas populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) estudadas. **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

	RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA
Pme2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pme4	-	-	-	-	-	-	1	-	-
Pme5	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Pme14	-	1	-	-	-	-	-	1	-
Pme20	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Pme21	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Pme28	-	-	-	-	1	-	-	-	-
Pme32	-	-	-	-	2	-	-	-	-

Tabela 7. Análise intrapopulacional de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Matogrossense. Os parâmetros apresentados são: N = número de indivíduos, Fis = endogamia, PHW = equilíbrio de Hardy Weinberg (e alelos nulos quando significativo), Riqueza = riqueza alélica. **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

População		RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA	Média
	N	34	30	40	11	32	13	16	19	31	
Pme2	Nº de alelos	9	9	9	8	7	6	6	7	8	7,6667
	Fis	0,0251	0,1971	-0,0867	-0,1489	0,1089	0,2163	0,1475	0,0917	0,0345	0,0651
	Ho	0,80769	0,69231	0,81579	0,9	0,7	0,61538	0,71429	0,75	0,73333	0,7476
	He	0,82805	0,85897	0,75158	0,78947	0,78333	0,77846	0,83333	0,82246	0,7661	0,8013
	PHW	NS	*(0,0826)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-
	Riqueza	6,134	6,536	5,47	6,784	5,48	5,007	5,383	6,183	5,321	5,811
Pme4	Nº de alelos	10	7	8	6	7	6	8	5	7	7,1111
	Fis	0,0701	0,2239	0,0202	-0,0169	-0,0057	0,0352	0,0909	-0,0128	0,2604	0,0739
	Ho	0,74194	0,5	0,675	0,81818	0,625	0,61538	0,6875	0,57895	0,51613	0,6398
	He	0,79693	0,64181	0,70253	0,80519	0,62153	0,63692	0,75403	0,57183	0,69487	0,6917
	PHW	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*(0,1084)	-
	Riqueza	5,748	4,34	4,565	5,226	4,67	4,519	5,923	3,493	4,61	4,788
Pme5	Nº de alelos	7	7	8	6	8	6	6	7	8	7
	Fis	-0,0238	0,1014	0,0374	-0,0519	0,0316	-0,0891	0,1517	-0,0286	0,0508	0,0199
	Ho	0,82353	0,75	0,8	0,9	0,7931	0,83333	0,6875	0,84211	0,75862	0,7987
	He	0,80465	0,83312	0,8307	0,85789	0,81851	0,76812	0,80645	0,81938	0,79855	0,8153
	PHW	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-
	Riqueza	5,553	5,663	5,574	5,67	5,402	4,984	5,39	5,656	5,374	5,474
Pme14	Nº de alelos	6	5	5	4	4	4	5	5	4	4,6667
	Fis	-0,1013	-0,1852	-0,2361	-0,0084	-0,009	0,1529	-0,3043	-0,3813	0,1107	-0,1069
	Ho	0,6	0,68966	0,50002	0,54545	0,5625	0,46154	0,75	0,84211	0,48387	0,6039
	He	0,54576	0,58379	0,405	0,54113	0,55754	0,54154	0,58065	0,61593	0,5431	0,5460
	PHW	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*(0,0000)	NS	-
	Riqueza	3,293	3,347	2,753	3,272	3,406	3,442	3,565	3,583	2,768	3,2699
Pme20	Nº de alelos	3	3	5	4	5	4	4	5	4	4,1111
	Fis	-0,094	0,415	0,1433	0,3684	0,0278	-0,2203	0,44	0,1074	-0,1335	0,1171
	Ho	0,54545	0,23333	0,42105	0,4	0,51724	0,71429	0,26667	0,47368	0,48387	0,4506
	He	0,4993	0,39605	0,49053	0,62105	0,53176	0,61538	0,46897	0,52916	0,42782	0,5089
	PHW	NS	*(0,1271)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	-
	Riqueza	2,381	2,396	2,922	3,4	3,275	4	2,928	3,482	2,613	3,0441
Pme21	Nº de alelos	3	3	3	3	2	2	4	2	4	2,8889
	Fis	0,0541	0,1785	-0,0193	-0,08	0,3465	-0,0526	0,3514	1	0,0485	0,2030
	Ho	0,26471	0,2069	0,35294	0,3	0,13043	0,18182	0,4	0	0,36	0,2441
	He	0,27963	0,25106	0,34636	0,27895	0,19807	0,17316	0,60526	0,12874	0,37796	0,2932
	PHW	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*(0,1652)	*(0,1703)	NS	-
	Riqueza	0,124	2,334	2,443	2,621	4,853	1,879	3,679	1,724	2,902	2,5066
Pme28	Nº de alelos	11	10	13	6	12	4	7	5	9	8,5556
	Fis	-0,0622	-0,0039	0,1608	0,3023	0,0769	-0,0811	-0,2748	-0,348	0,1165	-0,0126
	Ho	0,85294	0,7931	0,64103	0,54545	0,80645	0,76923	0,9375	0,89474	0,66667	0,7675
	He	0,80378	0,79008	0,76224	0,77056	0,87255	0,71385	0,74194	0,66999	0,75311	0,7642
	PHW	NS	NS	NS	*(0,0915)	NS	NS	*(0,0000)	*(0,0000)	*(0,0719)	-
	Riqueza	6,314	5,728	5,894	5,14	7,161	3,537	5,093	3,975	5,249	5,3434
Pme32	Nº de alelos	2	2	3	2	3	1	1	3	2	2,1111
	Fis	0,4803	-	-0,044	-	0,9129	-	-	-0,0149	1	0,4669
	Ho	0,05882	0,03333	0,12821	0,09091	0,03125	-	-	0,11111	0	0,0648
	He	0,11238	0,03333	0,12288	0,09091	0,35367	-	-	0,10952	0,06554	0,1269
	PHW	NS	NS	NS	NS	** (0,2530)	-	-	NS	*(0,1236)	-
	Riqueza	1,612	1,233	1,734	1,636	2,192	1	1	1,778	1,415	1,5111

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

A grande maioria das populações mostrou-se em equilíbrio de Hardy Weinberg, não apresentado desvios significativos. As populações do Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz e do Rio Cuiabá/Sesc mostraram-se em equilíbrio de Hardy Weinberg para todos os locos estudados enquanto a população do Rio Paraguai/Corumbá apresentou desvio do equilíbrio de Hardy Weinberg para os locos Pme14 e Pme28. Já a população do Rio Paraguai Mirim apresentou desvio do equilíbrio de Hardy Weinberg para o loco Pme28. Nesses dois casos verificaram-se valores de Fis negativos, indicando a existência de um excesso de heterozigotos que provavelmente foi a causa dos desvios (Tabela 7).

As populações dos Rios Paraguai/Cáceres e Taquari/Palmeiras apresentaram desvio do equilíbrio Hardy Weinberg para o loco Pme32 e a população do Rio Paraguai/Corumbá; para o loco Pme21. Seus respectivos valores de Fis foram positivos e iguais, ou muito próximos de 1, indicando déficit de heterozigotos. Estas e as demais populações que apresentaram significância e, conseqüentemente desvios de equilíbrio no Hardy Weinberg, acusaram a presença de alelos nulos (Tabela 7).

A população do Rio Paraguai/Corumbá apresentou o menor valor para o índice de fixação (Fis), que foi igual a -0,3813 para o loco Pme14. Os maiores valores para este parâmetro foram encontrados nas populações dos Rios Paraguai/Cáceres e Paraguai/Corumbá (Fis = 1) para os locos Pme32 e Pme21, respectivamente.

A maior riqueza alélica foi encontrada na população do Rio Taquari/Palmeiras nas análises do Pme28 (7,161). Considerando-se todos os locos, esta população apresentou a maior riqueza alélica total. As populações dos

Rios Negro e Paraguai Mirim apresentaram o menor valor (1,000) para o loco Pme32, podendo ser explicado devido a monomorfismo como citado anteriormente.

Os maiores valores de heterozigosidade observada e esperada foram encontrados na população do Rio Taquari/Caronal, para os locos Pme2 e Pme5 (0,9000) e na população do Rio Taquari/Palmeiras para o loco Pme28 (0,87255). Os menores valores foram encontrados na população do Rio Paraguai/Corumbá para o loco Pme21 (0,0000) e na população do Rio São Lourenço para o loco Pme32 (0,03333). Considerando todos os locos, a maior heterozigosidade observada foi encontrada na população do Rio Negro (0,5987)(Tabela 7).

Nos dados de desequilíbrio de ligação (Anexos 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, e 19) observou-se que não houve associações significativas nas análises par a par realizadas para os locos estudados.

4.5) Análises interpopulacionais

A Tabela 8 apresenta os valores de diversidade genética das comparações entre os pares de populações, sendo que na diagonal inferior estão os valores de F_{st} e na diagonal superior estão os valores de R_{st} . Os menores valores destes parâmetros foram -0,01463 e -0,0753, respectivamente, e os maiores valores foram 0,02618 e 0,10100. As significâncias positivas sugerem uma leve estruturação, porém os valores tanto de F_{st} quanto o de R_{st} são muito baixos, não permitindo uma afirmação correta sobre tal fato. A população do Rio Taquari/Palmeiras apresentou diferenças significativas para o parâmetro F_{st} em sete das oito comparações com outras populações.

Na Tabela 9 pode-se observar o resultado do teste exato de Fisher que avalia a heterogeneidade na distribuição de frequências alélicas e genotípicas. Não houve diferenças significativas para a grande maioria das comparações entre as populações. A única exceção foi a população do Rio Taquari/Palmeiras que mostrou-se significativa quando comparada com praticamente todas as populações, tanto na diferenciação populacional alélica quanto genotípica.

Tabela 8. Diversidade genética (F_{st} na diagonal inferior e R_{st} na diagonal superior) entre pares de populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) para todos os locos estudados. **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

Populações	RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA
RCPN	x	-0.00917	-0.00940	0.05001	-0.01197	0.07798*	0.01180	0.06204*	0.05987*
RSLO	0.00234	x	-0.00346	0.06236*	-0.0145	0.10100*	0.03228*	0.05615*	0.05932*
RCSE	0.00537	0.00874	x	0.05092*	-0.02040	0.05017*	0.00600	0.04764*	0.04959
RTCA	0.00855	0.03503**	0.02229*	x	0.06117*	0.02722	-0.07530	-0.02426	-0.00504
RTPA	0.01361*	0.01377*	0.01333*	0.00893	x	0.08010*	0.03093*	0.08603*	0.07285*
RNEG	-0.00498	0.01494	0.00290	-0.00229	0.00089	x	0.00479	0.03641	0.03803
RPMI	0.00149	0.01015	0.01408*	0.03014*	0.02239*	0.00091	x	0.00865	0.01432
RPCO	0.00454	-0.01216	0.00058	0.01846	0.02618**	-0.01463	0.01439*	x	-0.02146
RPCA	0.00855	0.00818	0.01593*	0.01513	0.01426*	0.00913	0.01183	-0.01031	x

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

* Significativo a 5%.

Tabela 9. Diferenciação populacional (teste exato de Fisher) alélica (Diagonal inferior) e genotípica (diagonal superior). **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

Populações	RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA
RCPN	xxx	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	ns
RSLO	ns	xxx	ns	**	**	**	ns	ns	ns
RCSE	ns	ns	xxx	ns	**	ns	*	ns	ns
RTCA	ns	**	ns	xxx	ns	ns	ns	ns	ns
RTPA	**	**	**	ns	xxx	*	**	**	**
RNEG	ns	**	ns	ns	*	xxx	ns	*	ns
RPMI	ns	ns	ns	ns	**	ns	xxx	ns	ns
RPCO	ns	ns	ns	ns	**	*	ns	xxx	ns
RPCA	ns	ns	ns	ns	**	ns	ns	ns	xxx

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

Um dendrograma foi construído com base nos valores de distância de *chord* (Cavalli Sforza & Edwards, 1967), os quais foram agrupados pelo método UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (Sneath & Sokal, 1973). Foi possível observar a formação de três grupos principais:

- agrupamento das populações do Rio Paraguai Mirim e Rio Negro;
- agrupamento do Rio Taquari/Caronal e rio Taquari/Palmeiras;
- agrupamento do Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc, Rio Paraguai/Cáceres e Rio Paraguai/Corumbá.

Na Tabela 10 apresentam-se os valores da distância de *chord* Cavalli Sforza & Edwards (1967). Encontrou-se uma variação de 0.171 (Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz x Rio São Lourenço) a 0.284 (Rio São Lourenço x Rio Negro).

Tabela 10: Distância de chord de Cavalli Sforza & Edwards (1967) entre pares de populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **5** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPC** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

Populações	RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA
RCPN	0								
RSLO	0.171	0							
RCSE	0.149	0.181	0						
RTCA	0.246	0.260	0.232	0					
RTPA	0.219	0.263	0.238	0.238	0				
RNEG	0.241	0.284	0.237	0.263	0.265	0			
RPMI	0.218	0.233	0.224	0.267	0.278	0.214	0		
RPCO	0.222	0.221	0.205	0.250	0.260	0.260	0.277	0	
RPCA	0.181	0.187	0.175	0.226	0.236	0.249	0.219	0.212	0

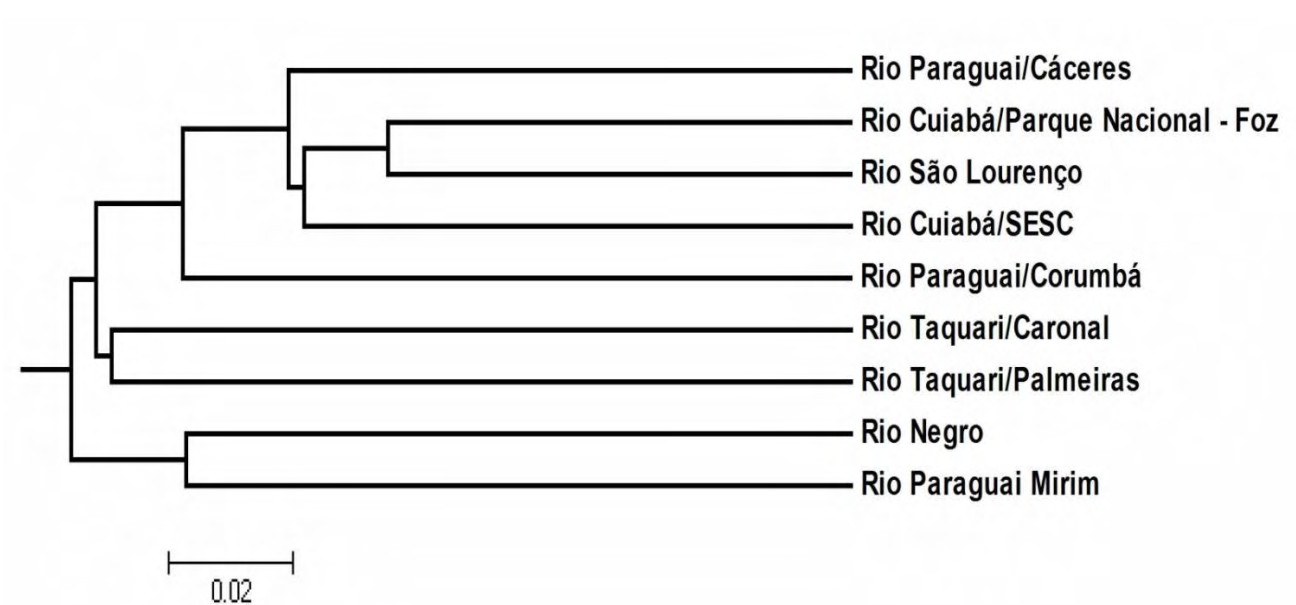


Figura 5: Dendrograma de UPGMA utilizando a distância de *chord* de Cavalli Sforza & Edwards (1967), representando a relação entre as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) analisadas.

Nas Tabelas 11, 12, 13, 14 e 15 estão descritos os resultados da análise hierárquica de variação molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) utilizando os índices de F_{st} e R_{st} . A maior variabilidade foi encontrada dentro das populações, em todos os agrupamentos testados. Os valores significativos encontrados em alguns casos entre as populações poderiam indicar uma fraca estruturação. A Tabela 15 apresenta os resultados da análise da variação molecular agrupando as populações segundo a separação encontrada no dendrograma de UPGMA.

Tabela 11. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando um grupo com todas as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). (Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc, Rio Taquari/Caronal, Rio Taquari/Palmeiras, Rio Negro, Rio Paraguai Mirim, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/ Cáceres).

Fonte de variação	Fst			Rst		
	Porcentagem do total	Componente da variância	Fst	Porcentagem do total	Componente da variância	Rst
Entre populações	0,94	0,01899**	0,00941 Fst	2,85	3,47493**	0,02851 Rst
Dentro das populações	99,06	1,99983		97,15	118,3895	

** Significativo a 1%

Tabela 12. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) separadas em dois grupos (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc e Rio Paraguai/ Cáceres; Grupo II = Rio Taquari/Caronal, Rio Taquari/Palmeiras, Rio Negro, Rio Paraguai Mirim e Rio Paraguai/Corumbá;).

Fonte de variação	Fst			Rst		
	Porcentagem do total	Componente da variância	Fst	Porcentagem do total	Componente da variância	Rst
Entre Grupos	0,09	0,00175	0,00216 Fct	-0,57	-0,69697	0,00087 Fct
Dentro dos grupos	0,9	0,01810*	0,00767 Fsc	3,18	3,85951*	0,00897 Fsc
Dentro das populações	99,02	1,99983*	0,00981 Fst	97,4	118,3895**	0,00983 Fst

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

Tabela 13. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) separadas em quatro grupos (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço e Rio Cuiabá/Sesc; Grupo II = Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras; Grupo III = Rio Negro; Grupo IV = Rio Paraguai Mirim, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/ Cáceres).

Fonte de variação	Fst			Rst		
	Porcentagem do total	Componente da variância	Fst	Porcentagem do total	Componente da variância	Rst
Entre grupos	0,53	0,01067	0,00528 Fct	3,17	3,88761*	0,03166 Fct
Dentro dos grupos	0,54	0,01087	0,00541 Fsc	0,42	0,51644	0,00434 Fsc
Dentro das populações	98,93	1,99983**	0,01066 Fst	96,41	118,3895**	0,03587 Fst

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

Tabela 14. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) separadas em cinco grupos (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço e Rio Cuiabá/Sesc; Grupo II = Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras; Grupo III = Rio Negro; Grupo IV = Rio Paraguai Mirim e Rio Paraguai/Corumbá; Grupo V = Rio Paraguai/ Cáceres).

Fonte de variação	Fst			Rst		
	Porcentagem do total	Componente da variância	Fst	Porcentagem do total	Componente da variância	Rst
Entre grupos	0,22	0,00436	0,00216 Fct	2,6	3,18091	0,02597 Fct
Dentro dos grupos	0,77	0,01546*	0,00767 Fsc	0,73	0,89981	0,00754 Fsc
Dentro das populações	99,02	1,99983**	0,00981 Fst	96,67	118,3895**	0,03331 Fst

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

Tabela 15. Análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) baseada em Fst e Rst, considerando as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) separadas em três grupos de acordo com a separação sugerida pelo dendograma de UPGMA (Grupo I = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/Cáceres; Grupo II = Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras; Grupo III = Rio Negro e Rio Paraguai Mirim).

Fonte de variação	Porcentagem do total	Fst		Rst		Rst
		Componente da variância	Fst	Porcentagem do total	Componente da variância	
Entre grupos	0,76	0,01544	0,00762 Fct	-0,18	-0,2189	-0,00180 Fct
Dentro dos grupos	0,52	0,01043*	0,00519 Fsc	2,95	3,59619*	0,02948 Fsc
Dentro das populações	98,72	199,983**	0,01277 Fst	97,23	118,39**	0,02774 Fst

* Significativo a 5%. ** Significativo a 1%

A análise Bayesiana gerada pelo programa Structure. 2.2 (Pritchard, 2000) foi realizada para avaliar os níveis de relação entre as populações, a ocorrência de fluxo gênico e a distinção do número de populações (K).

Na análise *admixture* testou-se a existência de 1 a 12 populações que gerou os valores de Ln(PD), utilizados para montar o gráfico que determina o valor de K. O número de populações (K) é determinado através do menor valor de Ln(PD). Na ocorrência de um platô no gráfico, a escolha do valor de K é feita com base no Ln(PD) que apresentar o menor desvio padrão. O gráfico feito com os resultados das populações de pacu mostrou K=1 como sendo o valor mais provável de populações existentes (Figura 6). Evanno *et al.* (2005) verificaram que em muitos casos os valores de Ln(PD) não oferecem uma estimativa acurada dos valores de K. Sendo assim, os autores delinearam uma metodologia para a determinação do K mais provável que utiliza o delta K (ΔK) dos valores de Ln(PD). Utilizando este método obteve-se, também, K=1 (Figura 7) como sendo o número de populações dos dados analisados nesse trabalho.

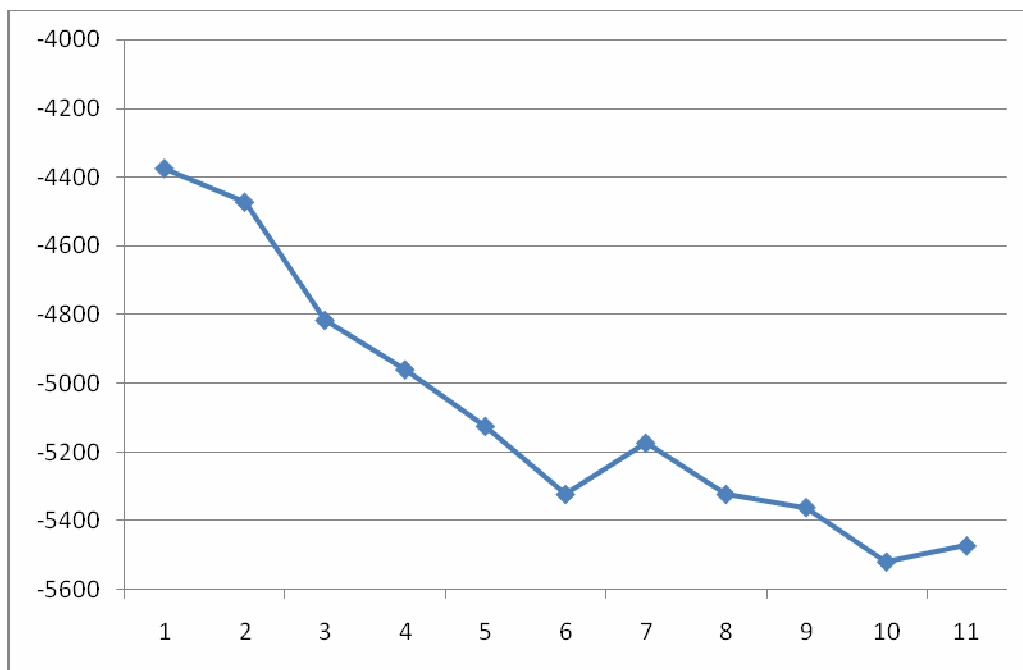


Figura 6. $\text{Ln}(\text{PD})$ em relação ao número de populações (K) testadas.

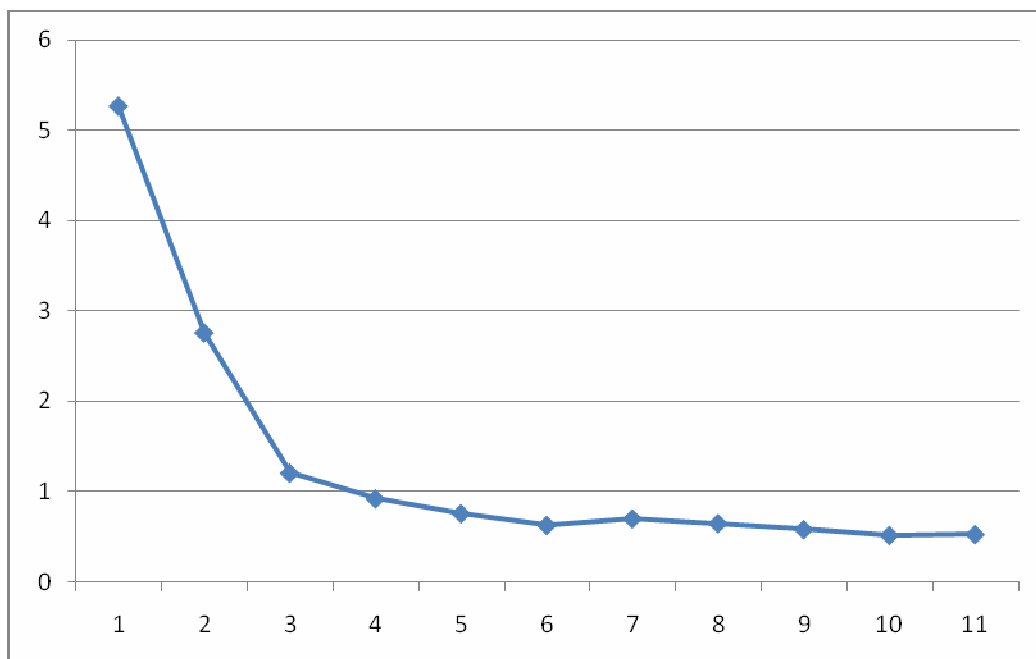


Figura 7. ΔK em relação ao número de populações (K) testadas.

A Figura 8 é a representação gráfica da estrutura populacional resultante da análise bayesiana nas populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Não houve a divisão das populações, ilustrado pela ausência de divisão vertical das cores, que representam os *clusters* (K).

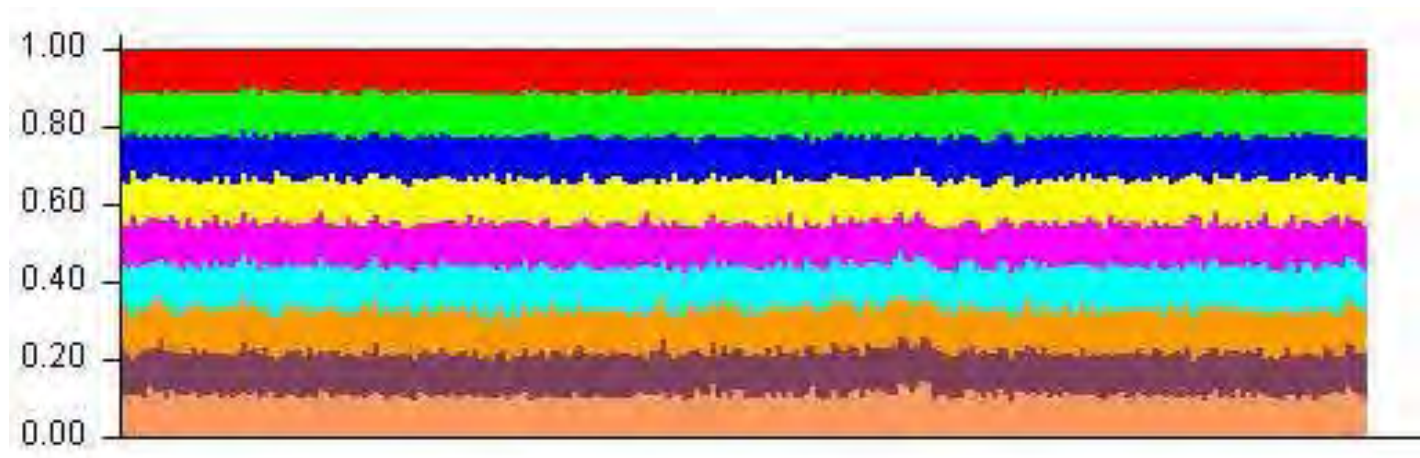


Figura 8. Estrutura *bar plot* representando a atribuição dos genótipos para cada população. As cores representam cada população.

Na Tabela 16 estão relacionados os resultados do teste de atribuição que utilizou os genótipos multilocos de cada indivíduo para calcular a probabilidade deste pertencer a cada população. Os maiores valores de atribuição foram encontrados nas populações do Rio Negro e do Rio Paraguai/Corumbá (98%). O menor valor foi encontrado na população do Rio Taquari/Palmeiras (96,8%). Todos os valores foram altos, acima de 95%.

Tabela 16. Resultado do teste de atribuição para as populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) utilizadas. **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

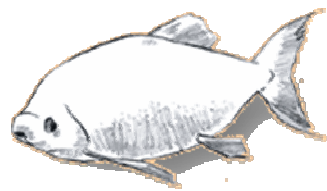
	RCPN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA
RCPN	0,976	0,003	0,003	0,003	0,005	0,003	0,003	0,003	0,003
RSLO	0,003	0,979	0,003	0,003	0,002	0,002	0,003	0,003	0,003
RCSE	0,003	0,003	0,979	0,003	0,002	0,003	0,003	0,003	0,003
RTCA	0,003	0,003	0,003	0,975	0,004	0,003	0,003	0,003	0,003
RTPA	0,004	0,004	0,004	0,003	0,968	0,004	0,004	0,003	0,005
RNEG	0,003	0,002	0,003	0,003	0,002	0,980	0,003	0,002	0,002
RPMI	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,004	0,976	0,003	0,003
RPCO	0,003	0,003	0,003	0,003	0,002	0,002	0,002	0,980	0,003
RPCA	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,978

A Tabela 17 apresenta os valores das proporções de atribuição correta aos *clusters* inferidos, resultantes da análise bayesiana realizada pelo Structure. Os valores encontrados para todas as populações e os *clusters* inferidos foram próximos de 10%.

O número de migrantes ou fluxo gênico histórico calculado com base nos alelos privativos (Barton & Slatkin, 1986) apresentou valor igual a 2,51269.

Tabela 17. Proporção de atribuição correta de cada população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) aos *clusters* inferidos. **RCPN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres).

População	Cluster inferido								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
RCPN	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110	0,110	0,101	0,113	0,114
RSLO	0,109	0,111	0,113	0,114	0,11	0,108	0,113	0,111	0,110
RCSE	0,112	0,113	0,108	0,108	0,110	0,111	0,114	0,113	0,114
RTCA	0,115	0,109	0,111	0,110	0,115	0,113	0,109	0,110	0,108
RTPA	0,114	0,111	0,108	0,109	0,115	0,113	0,109	0,111	0,111
RNEG	0,114	0,113	0,109	0,111	0,112	0,114	0,111	0,108	0,109
RPMI	0,111	0,11	0,112	0,111	0,113	0,109	0,111	0,112	0,110
RPCO	0,110	0,116	0,112	0,112	0,107	0,111	0,112	0,110	0,111
RPCA	0,110	0,112	0,115	0,114	0,108	0,11	0,111	0,108	0,111



Discussão

5) DISCUSSÃO

Um dos principais objetivos da genética de populações é identificar e quantificar a variação observada dentro e entre as populações para o estudo de fluxo gênico, deriva genética, sistemas de acasalamento, mutação e seleção natural. Tradicionalmente, inferências sobre as forças microevolutivas estão baseadas no número de alelos ou haplótipos (no caso de DNA mitocondrial), nas frequências dos alelos e sua distribuição geográfica (Moysés, 2005).

Dos oito locos microssatélites utilizados para verificar a variabilidade genética de populações de pacu, o loco Pme28 apresentou o maior número de alelos (14). Calcagnotto *et al.* (2001) em seu estudo de isolamento e caracterização de locos microssatélites em *Piaractus mesopotamicus* provenientes da bacia do Pantanal, também encontraram o maior número de alelos para este loco (10 alelos).

Nos casos de reposição do estoques para ambientes naturais (repovoamento), a importância do conhecimento da variabilidade genética assim como sua manutenção tem grande valor, pois pode evitar um impacto genético nas populações locais (estoque receptor) e também permite que as espécies se adaptem a mudanças que possam surgir no meio em que vivem (Toledo-Filho *et al.*, 1992).

O tamanho dos alelos encontrados neste estudo variou de 184 pb, para o loco Pme5, à 270 pb, para o loco Pme 21. No estudo de Calcagnotto *et al.* (2001) a variação foi de 182 a 268 pb, para os mesmos loco, respectivamente.

Os valores de heterozigosidade observada e esperada variaram de 0,0000, para o locos Pm21 e Pme32, a 0,9000, para o loco Pme2 e Pme5; e 0,0333, para o loco Pme32, a 0,8725, para o loco Pme28, respectivamente. Calcagnotto *et al.* (2001) encontraram diferentes níveis de heterozigosidade após análise dos oito locos microssatélites em populações de pacu do Pantanal Matogrossense. Altos níveis de heterozigosidade observada foram encontrados nos locos Pme2 (0,852), Pme14 (0,667) e Pme28 (0,643) e baixos níveis, no loco Pme4 (0.656) e Pme32 (0.200). Com relação à heterozigosidade esperada, os autores encontraram 0,856 para o loco Pme2 a 0,303 para o loco Pme21. Os locos que apresentaram maior e menor valores de heterozigosidade esperada no presente estudo apresentaram valores semelhantes, no trabalho de Calcagnotto *et al.* (2001), porém não foram os extremos. O maior valor médio de heterozigosidade observada neste trabalho foi de 0,7987. Porta *et al.* (2006), em seu estudo com *Solea senegalensis* verificaram em animais provenientes da natureza, valor de heterozigosidade observada elevado, igual a 0,802.

O equilíbrio de Hardy Weinberg se fez presente na maioria das populações de pacu estudadas. Moysés (2005) em seu estudo de caracterização da estrutura populacional de *Eigenmannia* também verificou uma situação de equilíbrio de Hardy Weinberg para a maioria das populações com relação aos locos de microssatélites estudados. Nos casos dos desvios encontrados, a autora atribuiu a deficiência de heterozigotos à presença de alelos nulos. Benites (2008)

encontrou desvios com relação a este parâmetro em todas as 11 populações de *Pseudoplatystoma corruscans* analisadas com marcadores tipo microssatélites. O autor verificou a existência de alelos nulos para a maioria dos casos de desvio do equilíbrio. Morelli (2008) verificou desvios em várias populações de *Prochilodus lineatus* em locos específicos relacionados aos déficits de heterozigotos, também ocasionados pela presença de alelos nulos. No presente trabalho, todas as populações de pacu que demonstraram desvios significativos no equilíbrio de Hardy Weinberg apresentaram excessos ou déficits de heterozigotos, sendo neste último caso associados à presença de alelos nulos.

O alelo nulo pode ser definido como qualquer alelo em um loco de microssatélite que não é amplificado no PCR ou pode ser fracamente amplificado mas não é visível após a detecção. Entre as possíveis causas estão a ocorrência de mutação de ponto dentro do sítio de hibridação do *primer*, grandes eventos de inserção/deleção entre os microssatélite e o sítio de hibridação do *primer*, baixa qualidade do DNA, ou ocorrência de mutações na repetição, levando a grandes mudanças no tamanho do produto. Os alelos nulos podem ser detectados indiretamente através do déficit de heterozigotos na população (O'Connell & Wright, 1997).

A análise interpopulacional revelou que praticamente não houve diferenciação genética entre as nove populações de pacu estudadas, apresentando uma estruturação muito tênue e revelando certa homogeneidade genética.

Os valores de F_{st} e R_{st} encontrados no presente estudo foram baixos (os maiores valores indicaram $F_{st} = 0,02618$ e $R_{st} = 0,10100$), sugerindo pequena ou nenhuma estruturação genética das populações analisadas. Significâncias ao nível de 1% e 5% foram encontradas para algumas das comparações entre os pares de populações. Considerando os baixos valores destes parâmetros não é possível, mesmo havendo significância, afirmar ao certo se há diferença entre elas. Wright (1978) determinou uma forma de verificar a magnitude da variabilidade genética entre os grupos. O autor afirmou que valores de F_{st} entre 0 a 0,05 indicam baixa estruturação das populações; valores entre 0,05 a 0,15 evidenciam uma moderada estruturação e valores entre 0,15 a 0,25 caracterizam alta estruturação. Os valores de F_{st} superiores a 0,25 indicam forte estruturação genética das populações. No presente estudo todos os valores de F_{st} estiveram dentro do intervalo de 0,00 a 0,05, demonstrando baixa estruturação das populações. Este fato pode ser confirmado pelo teste exato de Fisher para a diferenciação populacional, o qual não apresentou diferenças significativas para a grande maioria das comparações entre pares de populações analisados, também pelos valores da distância de Cavalli Sforza & Edwards (1967) que apresentou baixos valores e também caracterizou baixa semelhança.

López (2006), verificando a variabilidade genética e estrutura populacional de *Brycon sinuensis* do Rio Sinú, encontrou F_{st} de 0,0427, que indica baixa estruturação, segundo Wright (1978). Pampoulie *et al.* (2006), verificando a estrutura genética do bacalhau do Atlântico (*Gadus morhua*), encontraram elevado valor de F_{st} (0,261), mostrando a alta estruturação das 22 populações estudadas.

O índice R_{ST} é uma das medidas usadas para análise genética com o uso dos marcadores moleculares do tipo microssatélites (Slatkin, 1995). Ele utiliza a variância dos números das repetições e é análogo ao F_{ST} , que se baseia na variância das frequências alélicas. O R_{ST} foi desenvolvido levando-se em consideração o fato de que os dados gerados pelos locos microssatélites possuem tanto informação de frequência de alelos, como do tamanho dos mesmos, gerados pelo número de unidades repetitivas que cada alelo apresenta. Quando os valores são significativos, indicam evidência de diferenciação genética entre as populações e indícios de estruturação entre as mesmas. Ainda assim, não são suficientes para afirmar a existência de estruturação, mesmo quando houve significância em algumas das comparações realizadas.

O dendograma construído a partir distância de *chord* de Cavalli Sforza & Edwards (1967) e utilizando a metodologia de UPGMA (*Unweighted pair group method with arithmetic mean*) (Sneath & Sokal, 1973) separou as populações em três grupos: I - Rio Paraguai Mirim e Rio Negro; II - Rio Taquari/Caronal e Rio Taquari/Palmeiras e III - Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz, Rio São Lourenço, Rio Cuiabá/Sesc, Rio Paraguai/Cáceres e Rio Paraguai/Corumbá. As separações dos grupos II e III concordam com a distribuição geográfica dos rios na bacia do Pantanal, onde foram coletados os indivíduos utilizados no presente estudo, agrupando estas populações com base nas proximidades dos rios e associações de bacias secundárias do complexo do Rio Paraguai no Pantanal Matogrossense. O grupo III pode ser considerado controverso, pois o Rio Negro está isolado do Rio Paraguai. Este resultado pode ter sido uma consequência do baixo número amostral destas duas localidades.

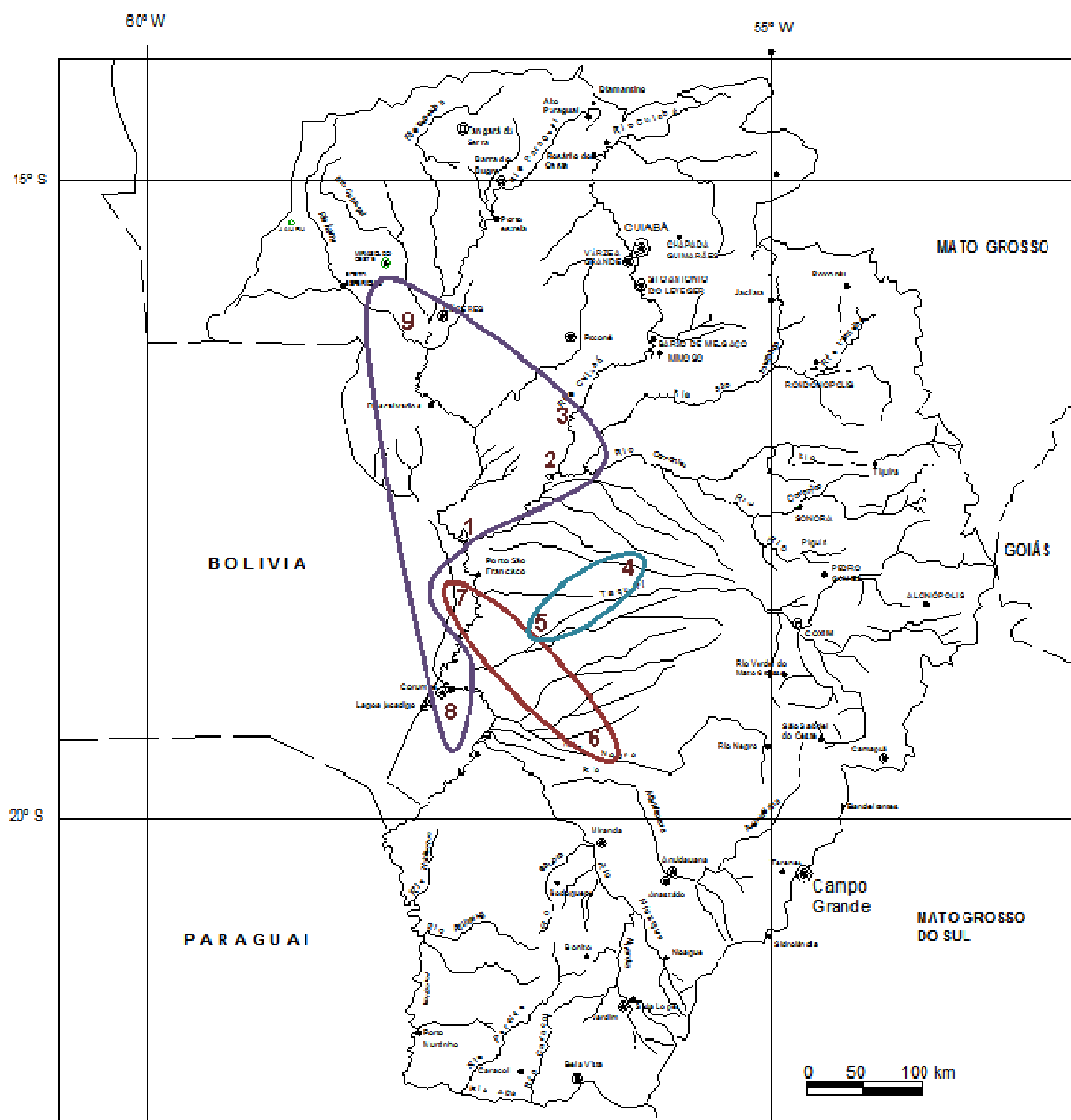


Figura 9: Mapa do Pantanal Mato–Grossense com o padrão de agrupamento das populações segundo o dendograma. 1: Rio Cuiabá/Parque Nacional – Foz; 2: Rio São Lourenço; 3: Rio Cuiabá/SESC Pantanal; 4: Rio Taquari/Coronal; 5: Rio Taquari/Palmeiras; 6: Rio Negro; 7: Rio Paraguai Mirim; 8: Rio Paraguai/Corumbá; 9: Rio Paraguai/Cáceres.

A população do Rio Taquari/Palmeiras apresentou significâncias para os valores de F_{st} e de diferenciação populacional (alélica e genotípica) em praticamente todas as comparações, indicando sua maior diferenciação em relação às demais populações. Tal fato está em concordância com o maior valor de riqueza alélica encontrada e com a presença de cinco alelos exclusivos nesta população, podendo ser considerada como a que apresenta maior diferenciação genética na amostragem analisada. Este fato poder ser resultante da história geológica deste rio. Este resultado justificaria a manutenção desta população isolada no caso de conservação genética *in situ* para que não haja a perda da maior variabilidade genética encontrada. Mais estudos são necessários para poder afirmar a causa desta maior variabilidade genética das amostras de pacu desta região.

A análise molecular da variância (AMOVA) calculada com os índices de F_{st} e R_{st} evidenciou que a maior diversidade genética encontra-se significativamente dentro das populações, para ambos os parâmetros. Este cenário se fez presente independentemente do agrupamento das populações consideradas. Colocando todas as populações em um único grupo, houve diferenciação significativa entre as populações, o que indicaria estruturação. Porém os valores de F_{st} e R_{st} baixos afirmam que se houver diversidade entre as populações, esta deve corresponder a um processo pouco significativo.

Cenário semelhante foi encontrado por Santos *et al.* (2007) estudando populações de tambaqui (*Colossoma macropomum*) do Rio Amazonas. Os resultados da análise de variância indicaram maior diferenciação dentro das populações, reforçando a hipótese da ocorrência de uma situação de panmixia.

Farias *et al.* (2005) verificaram que populações de *Prochilodus nigricans* e *Colossoma macropomum* da várzea Amazônica, não formam populações geneticamente estruturadas, apresentando-se como uma única população panmítica, segundo a análise do DNA mitocondrial do gene da ATPase.

Quando se realizou a análise de variância molecular agrupando as populações segundo a separação sugerida pelo dendograma de UPGMA, houve, novamente, significância dentro dos grupos. Mais uma vez ficou evidente o indicativo de ausente ou fraca estruturação, já que o valor de F_{st} foi próximo de zero e que a porcentagem de variação dentro foi de praticamente 99% apenas.

Os resultados encontrados na análise de variância molecular corroboraram aqueles encontrados na análise bayesiana gerada pelo programa Structure. 2.2 (Pritchard, 2000) que, como mostrou os gráficos de *bar plot* e de K, indicou a existência de apenas uma população ($K = 1$). Não houve evidência de estruturação genética sugerindo-se que há apenas uma população panmítica.

Balloux & Lugon-Moulin (2002) afirmaram que, em alguns casos, os baixos valores de F_{ST} podem indicar diferenciação genética. Considerando esta afirmação e verificando que, além da população do Rio Taquari, as populações dos Rios São Lourenço, Paraguai Mirim, Paraguai/Corumbá e Paraguai/Cáceres apresentaram alelos exclusivos, pode-se considerar a presença de uma pequena diferenciação genética entre estas populações justificando, também, a manutenção destas isoladas para a conservação genética *in situ*.

Se for considerado a ausência de estruturação populacional e a existência de apenas uma população panmítica, acende-se uma dúvida com relação ao termo que seria melhor aplicado para se referir ao conjunto de indivíduos

coletados nas localidades estudadas e utilizados nesta caracterização genética. O conceito de populações locais, subpopulações, estoques ou demes pode diferir em relação ao grau de homogeneidade genética (Dizon *et al.*, 1992 *apud* Hilsdorf *et al.*, 2006). No caso de recursos pesqueiros, o conceito de populações se complica ainda mais por fatores políticos, econômicos e sociais (Hilsdorf *et al.*, 2006).

O termo que poderia se tornar adequado neste trabalho seria “amostra”. Dessa maneira, pode-se dizer que no presente trabalho estudou-se a variabilidade e estrutura genética de nove amostras coletadas de várias localidades e compostas de N indivíduos.

O valor que indica a existência de fluxo gênico histórico encontrado, que é equivalente ao número de migrantes por geração, pode ser considerado alto ($N_m = 2,51269$) segundo a definição de Spieth (1974), no qual valores superiores a 1 são indicativos de que o fluxo gênico constitui um fator atuante estando em direção contrária à diferenciação genética entre as populações. Neste sentido, Feldeheim *et al.* (2001) encontraram N_m igual 8,9 usando a mesma metodologia de alelos privativos no estudo de populações de tubarão limão (*Negraprion brevirostris*) valor este indicativo de intenso fluxo gênico entre as populações. Santos *et al.* (2007) também encontraram fluxo gênico intenso entre as populações de tambaqui (*Colossoma macropomum*) do Rio Amazonas. Os autores afirmam que os altos níveis de fluxo gênico combinados com baixos valores de F_{st} encontrados no seu estudo dão indicações de intensa troca genética entre todas as populações.

A estrutura populacional é grandemente influenciada pelo fluxo gênico, que determina até que ponto uma população local pode ser considerada uma unidade evolutiva independente (Slatkin, 1993). Em populações com fluxo gênico intenso, verifica-se uma evolução conjunta, pois a migração atua como fator de homogeneização das frequências alélicas. Na situação inversa, encontra-se uma subdivisão populacional que freqüentemente leva à diferenciação genética entre as subpopulações, por meio da aquisição de frequências alélicas distintas (Moysés, 2005).

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

No presente trabalho pode-se verificar pequena diferenciação genética das nove populações de pacu estudadas do Pantanal Matogrossense. Este resultado corrobora os dados apresentados por Calcagnotto (1998) que não encontrou variabilidade nos fragmentos de restrição do mtDNA, estudando animais da mesma espécie. Algumas amostras das populações utilizadas no trabalho citado também tiveram como origem o Pantanal Matogrossense. A autora afirma que dois fatores parecem ter sido relevantes para explicar a ausência total da variabilidade genética encontrada nos experimentos com o mtDNA: o fato de o pacu ser uma espécie de grande amplitude migratória e as características relacionadas à origem e história geológica do Pantanal Matogrossense.

No início do terciário havia um grande golfo denominado Pacífico neo-orogênico na região onde atualmente se localiza o Pantanal. Com o soerguimento da cordilheira dos Andes, durante o Mioceno, formou-se um grande lago de características salobras que durou cerca de 20 m.a., até que no Pleistoceno ocorresse a ruptura entre os planaltos Brasileiro e Guiano e os rios comesçassem a escoar em direção ao oceano Atlântico. Nesse grande lago provavelmente deve ter surgido o pacu, há cerca de 15 m.a. (Lundberg *et al.* 1986 *apud* Calcagnotto, 1998).

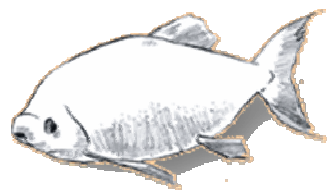
Considera-se ainda que a homogeneidade genética das populações selvagens atuais de pacu também pode ter sua origem e manutenção em decorrência das cheias anuais que acometem o Pantanal Matogrossense. Quando os rios extravasam seus leitos e as áreas inundadas formam uma rede de lagoas, baías e baixadas interligadas por cursos d'água (Por *et al.*, 1997), pode haver intensa mistura de animais provenientes de diferentes rios, pois é nesta planície alagada que ocorre a alimentação destes peixes. E são nas cheias anuais que ocorre a mistura populacional em função da invasão de extensas áreas alagadas por esta espécie e de outras no Pantanal.

Em outro exemplo interessante, em que foram utilizados marcadores moleculares do tipo RAPD para analisar a variabilidade genética em populações de mesma espécie provenientes da bacia do Paraná-Uruguai (Zamparette, 1996), obteve-se resultados que evidenciaram uma estreita base genética dos peixes estudados, não identificando diferenciação das populações. Assim como Calcagnotto (1998), este autor justifica a homogeneidade genética encontrada nesta espécie à grande capacidade migratória. A capacidade migratória e as

características climáticas (ocorrência de cheias anuais) também podem ser as causas da não ocorrência de diferenciação genética de populações selvagens de *Colossoma macropomum* da Amazônia, como verificado por Santos *et al.* (2006) e Calcagnotto (1998).

Benites (2008), contudo, encontrou estruturação nas 11 populações de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) provenientes da bacia Paraná - Paraguai, estudadas pelo autor. Esta espécie, assim como o pacu e o tambaqui, é migradora e divide habitats semelhantes; e mesmo assim apresentou estruturação populacional. Possíveis causas para a ocorrência dessa estruturação poderiam estar associadas ao hábito alimentar diferenciado e comportamento de “homing” desta espécie. Por ser um peixe geralmente de grande porte e de fundo não realiza longas migrações.

Este estudo constatou que as populações de pacu provenientes do Pantanal Matogrossense apresentaram pequena estruturação genética, considerando o FST, por exemplo, ou que compõem apenas um grande banco genético, segundo análise bayesiana gerada pelo programa Structure. Resultados mais conclusivos seriam possíveis com o aumento do número amostral de algumas localidades. Apesar desta ambigüidade pode-se verificar que os animais estudados apresentaram diversidade genética muito pequena.



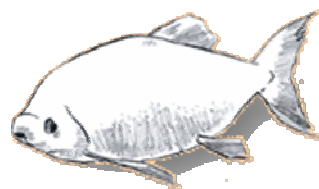
Conclusões

6) CONCLUSÕES

Nove amostras de pacu (*Piaracuts mesopotamicus* Holmberg, 1887) provenientes de diversas localidades da rede hidrográfica do Pantanal Matogrossense foram estudadas com o objetivo principal de caracterizar a diversidade genética, utilizando marcadores moleculares tipo microsatélite. Os dados obtidos permitiram formular as seguintes conclusões:

- ❖ Os marcadores genéticos moleculares do tipo microsatélite mostraram-se eficientes no estudo da variabilidade genética das amostras de pacu da Bacia do Alto Paraguai, resultando em dados acurados sobre a estruturação genética destas populações.
- ❖ Os resultados indicaram a existência de grande identidade genética entre as amostras de pacu estudadas não sendo significativos os valores de diferenciação genética encontrados nas comparações entre estas.
- ❖ A amostra do Rio Taquari/Palmeiras apresentou maior variabilidade genética, conseqüência dos resultados de riqueza alélica, Fst e diferenciação genética.

- ❖ Encontrou-se intenso fluxo gênico histórico intraespecífico, fato este que associados aos resultados de F_{st} , AMOVA e da análise bayesiana justifica a uniformidade genética encontrada para as populações de pacu do Pantanal Matogrossense.
- ❖ Para a formação de bancos genéticos desta espécie, sugere-se a formação de um único estoques compostos de animais das diversas localidades devido a baixa estruturação encontrada para as populações. A amostra do Rio Taquari/Palmeiras poderia ser mantida separada dos demais animais para preservar os alelos exclusivos e também para manter a maior variabilidade genética que apresentou.
- ❖ As amostras do Rio São Lourenço, Rio Paraguai Mirim, Rio Paraguai/Corumbá e Rio Paraguai/Cáceres que apresentaram alelos exclusivos também poderiam ser mantidas isoladas para a conservação genética *in situ*. Este resultado poderia ser mais acurado com o aumento do número amostral das localidades estudadas.



Referências Bibliográficas

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho, A.A.; Bini, L.M.; Gomes, L.C.; Júlio, H.F.Jr.; Pavanelli, C.S.; Agostinho, C.S. 2004. Fish assemblages. **In** The Upper Paraná River floodplain: physical aspects, ecology, and conservations. S.M. Thomaz, A.A. Agostinho, N.S. Hahn (Eds.) Backhuys Publishers, Leiden, 223 – 246.
- Alho, C.J.R.; Lacher, T.E.; Gonçalves, H.C. 1988. Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. **Bioscience** 38, 164-171.
- Aljanabi, S.M. & Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extractions high quality genomic DNA for PCR based techniques. **Nucleic Acids Research** 25 4692-4693.
- Barton, N.H. & Slatkin, M. 1986. A quasi equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. **Heredity** 56, 409-415.
- Baulloux, F. & Lugon-Moulin, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. **Molecular Ecology** 11, 155-165.

- Bernatchez, L.; Dempson, J.B.; Martin, S. 1998. Microsatellite gene diversity analysis in anadromous char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, Canada. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 55, 1264-1272.
- Billington, N. & Hebert, P. 1991. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 48, 80-94.
- Britski, H.A.; Silimon, K.Z.S.; Lopes, B.S. 2007. **Peixes do Pantanal: Manual de Identificação**. Embrapa, Serviço de Produção de Informação, Brasília. 227p.
- Brown, A.D.H.; Weir, B.S. 1983. Measuring genetic variability in plant population. In: Tanksley, S. D.; Orton, T. J. (ed.) Isoenzymes in plant genetics breeding, PART A. Amsterdam: Elsevier Science Publishers, 219-239.
- Calcagnotto, D. 1998 Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Através da Análise do DNA Mitocondrial. São Paulo Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - Universidade de São Paulo.
- Calcagnotto, D.; Russello, M.; DeSalle, R. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. **Molecular Ecology**. 245-247.

Carneiro, D.J.; Wagner, P.M.; Dias, T.C.R. 1995. Efeito da densidade de estocagem e do nível de proteína bruta na dieta, no desempenho de produção de pacu (*Piaractus mesopotamicus*). In: **Encontro Nacional de Aquicultura, Anais...**, 52-61. n 84.

Castagnolli, N. & Zuim, S.M.F. 1985. **Consolidação do conhecimento adquirido sobre o pacu (*Colossoma mitrei* Berg 1895)**. FCAV/UNESP. Jaboticabal, SP. 26p.

Catella, A.C.; Peixer, J. ; Palmeira, S. da S. 1996. Sistema de controle de pesca de Mato Grosso do Sul, SCPESCA/MS–1 maio/1994 à abril/1995. Corumbá, MS: EMBRAPA–CPAP/SEMADES–MS. (EMBRAPA–CPAP, **Documentos** (16). 49p.

Catella A.C. 2001. A pesca no Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil.: descrição, nível de exploração e manejo (1994-1999). Manaus Tese (Doutorado) Instituto acional de Pesquisas da Amazônia – Universidade do Amazonas *apud* Peixer, J. & Petrere Jr., M. 2007. Hook selectivity of the Pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) in the Pantanal, the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Braz. J. Biol.** 67(2), 339-345.

Cnaani, A. Hallerman, E.M.; Ron, M.; Weller, J.I.; Indelman, M.; Kashi, Y.; Gall, G.A.E.; Hulata, G. 2003. Detection of a chromosomal region with two

quantitative trait loci, affecting cold tolerance and fish size, in an F₂ tilapia hybrid. **Aquaculture** 223, 117-128.

da Silva, J.S.V. & Abdon, M.M. 1998. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Brasileira Agropecuária** 33, 1703-1711.

da Silva, J.S.V. & Abdon, M.M. 1995. Elementos fisiográficos para delimitação do ecossistema Pantanal: discussão e proposta. In: Esteves, F.A., ed. Oecologia Brasiliensis, estrutura, funcionamento e manejo de ecossistemas brasileiros [S.l: s.n.]. v.1. 439-458.

Dizon, A.E.; Lockyer, C.; Perrin, W.F.; Demaster, D.P.; Sisson, J. 1992. Rethinking the stock concept: a phylogeographic approach. **Conservation Biology** v. 6, 24-36 *apud* Hilsdorf, A.W.S.; Marques, D.K.S.; Resende, E. K. 2006. Genética e Conservação de Estoques Pesqueiros de Águas Continentais no Brasil: Situação Atual e Perspectivas. Corumbá: Embrapa Pantanal, 43p.

Eizirik, E.; Kim, J.H.; Menotti-Raymond, M.; Crawshaw, P.G.; O'Brien, S.J.; Johnson, W.E. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology** 10, 65-79.

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of cluster of individuals using the software *Structure*: a simulation study. **Molecular Ecology** 14, 2611-2620.

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics** 164, 1567–1587.

Farias, I.P.; Vasconcelos, W.R.; Nunes, M.S. Mota, E.; Tomas, H. 2005. Padrões Genético-populacionais de peixes da Várzea. In: Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura, *Anais...*, 91-95.

Feldheim, K.A.; Gruber, S.H.; Ashley, V. 2001. Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atrantic: DNA microsatellite variation. **Molecular Ecology** 10, 295-303.

Felsenstein, J., 2005. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle.

Ferraz de Lima, J.A.; Barbieri, G.; Verani, J.R. 1984. Período de reprodução e idade a primeira maturação gonadal de pacu (*Colossoma mitrei*) em ambiente natural, (Rio Cuiabá, - Pantanal de Mato Grosso). **Anais do III Simpósio Brasileiro de Aqüicultura**, São Carlos, SP.

Ferraz de Lima, J.A. 1986/87. A pesca do Pantanal do Mato Grosso (Rio Cuiabá): importância dos peixes migratórios. **Acta Amazonica** 16/17, 87-94.

Ferreira, M.E.; Grattapaglia, D. 1998. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3ª ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM. 220p.

Fitzsimmons, N.N.; Moritz, C.; Moore, S.S. 1995. Conservation and dynamics of microsatellites loci over 300 million years of marine turtle evolution. **Mol. Biol. Evol.** 12 (3), 432-440.

Fowler, H.W. 1950. Os peixes de água doce do Brasil. **Arq. Zool.** 6, 1-204.

Foresti, F. coord.. 2001. Projeto Gestão dos Recursos Pesqueiros do Pantanal. 24p. /Relatório/.

Futuyma, D.J. 1992. Variação e Estrutura Populacional e Deriva Genética. In: _____. **Biologia Evolutiva**. 2 ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 86-154.

Goudet, J. 1995. Fstat version 1.2: a computer program to calculate Fstatistics. **Journal of Heredity** 86, 485-486.

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

Hahn, N.S.; Fugi, R.; Andrian, I.F. 2004. Trophic ecology of fish assemblages. In: The Upper Paraná River Floodplain: physical aspects, ecology, and conservation. S. M. Thomaz, A. A. Agostinho, N. M. Hahn (Eds), Bachuys Publishers, Leiden, 247-269.

Hara, M.; Sekino, M. 2003. Efficient detection of parentage in a cultured Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* using microsatellite DNA marker. **Aquaculture** 217, 107-114.

Heckman, C.W. 1998. **The Pantanal of Pocone: Biot and Ecology in Northern Section of the World's Largest Pristine Wetland**. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Hurt, C. & Hedrick, P. 2004. Conservation genetics in aquatic species: General approaches and case studies in fishes and springsnails of arid lands. **Aquatic Sciences** 66, 402-413.

Jomori, R.K.; Carneiro, D.J.; Malheiros, E.B.; Portella, M.C. 2003. Growth and survival of pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg 1887) juveniles reared in ponds with different initial larvicultura periods indoors. **Aquaculture Nutrition** 8, 169-174.

Junk, W.J. & Cunha, C.N. 2005. Pantanal: a large South American wetland at a crossroads. **Ecological Engineering** 24, 391-401.

Kimura, M. & Crow, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics** 49: 725-738 *apud* Moysés, C.B. 2005. Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo. Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva-Universidade de São Paulo.

Kimura, M. & Ohta, T.. 1978. Stepwise mutation model of population and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 75: 2868-2872 *apud* Moysés, C.B. 2005. Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo. Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva-Universidade de São Paulo.

Lévêque, C.; Oberdorff, T.; Paugy, D.; Stiassny, M.L.J. Tedescop, A. 2008. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. **Hydrobiologia** 595, 545-567.

Litt, M. & Luty, J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetic** 4, 398-401.

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

Lundberg, J.G.; Machado-Allison, A.; Kay, R. 1986. Miocene characid fishes from Colombia: Evolutionary stasis and extirpation. **Science** 234: 208-209. *Apud* Calcagnotto, D. 1998 Caracterização de Bancos Genéticos Selvagens de Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) e de Tambaqui (*Colossoma macropomum*) Através da Análise do DNA Mitocondrial. São Paulo Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva - Universidade de São Paulo.

Marques, D.K.S. 2005. **Diversidade de peixes do Pantanal: por que conservar?**. Corumbá: EMBRAPA-Pantanal. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/>. Acesso em 15 de setembro de 2005.

Marques, D.K.S. 2002. Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros. Corumbá, MS: EMBRAPA-Pantanal. 22p. (EMBRAPA Pantanal, **Documentos**, 36).

Miller, M.P. 1997. TFPGA, version 1.31: tools for population genetic analyses. Department of Biological Sciences—Northern Arizona University.

- Morelli, K.A. 2008. Migração do curimatá (*Prochilodus lineatus* Prochilodontidae, Characiformes) no Rio Mogi Guaçu: aspectos genético populacionais. Botucatu Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista.
- Morelli, K.A.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F.; Senhorine, J.A.; Foresti, F. 2007. Population structure of *Prochilodus lineatus* (Characiformes. Prochilodontidae) in the Mogi-Guaçu river identified by molecular analysis. 7-12. In: Pompeu P.S.; Santos, H.A.; Alves, C.B.M. (Eds). **Proceedings of the Symposium on Fish Passages in South America**. Lavras, UFLA. 100p.
- Moysés, C.B. 2005. Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero *Eigenmannia* (Pisces: Gymnotiformes) São Paulo. Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva-Universidade de São Paulo.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance of a small number of individuals. **Genetics** 89, 583-590.
- O'Connell M. & Wright, J.M. 1997. Microsatellite DNA in fishes. **Rev.Fish Biol. Fish.** 7, 331-363.
- Pampoulie, C.; Ruzzante, D.E.; Jörundsdóttir, C.T.D.; Thorsteinsson, V.; Daníelsdóttir, A.K.; Marteinsdóttir, G. 2006. The genetic structure of Atlantic cod (*Gadus morhua*) around Iceland: insight from microsatellites, the *Pan I* locus, and tagging experiments. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 63, 2660-2674.

Piry, S.; Alapetite, A.; Cournuet, J.-M.; Paetkau, D.; Baudoin, L.; Estoup, A. 2004.

Gene Class2: a software for genetic assignment and first generation migrants detection. **J. Heredity** 95, 536-539.

Por, F.D. 1995. **The Pantanal of Mato Grosso (Brazil) World's largest.**

Monographiae Biologicae, Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, 121p.

Por, F.D.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Lencioni-Neto, F. 1997. **O Pantanal do Mato**

Grosso. Instituto de Biociências-Universidade de São Paulo.

Por, F.D.; Imperatriz-Fonseca, V.L.; Lencioni-Neto, F. 2007. Economia do

Pantanal. Disponível em <http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/meioamb/ecossist/pantanal/economia/apresent.htm>. Acesso em 15 de maio de 2007.

Porta, J.; Porta, J.M.; Martínez-Rodríguez, R.; Alvarez, M.C. 2006. Genetic

structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. **Aquaculture** 251, 46-55.

Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. 2000. Inference of population

structure using multilocus genotype data. **Genetics** 155, 945-959.

Pullela, S. V. S. 1997. Aquaculture of Pacu (*Piaractus mesopotamicus*) and a

Comparison of its Quality: Microbiological, Sensory and Proximate Composition.

Blacksburg. Dissertação (Mestrado)–Virginia Polytechnic Institute and State University.

Raymond, M.; Rousset, F. 1995. Genepop (version 1.2): Population Genetic Software for Exact Tests and Ecumenism. **Journal of Heredity** 86, 248-249.

Reis, R.E.; Kullander, S.O.; Ferraris, C. 2003. **Check List of The Freshwater Fishes of South And Central America** (CLOFFSCA), EDIOUCRS. Porto Alegre, 729p.

Resende, E.K.; Pereira, R.A.C.; Almeida, V.L.L. de. 1998. Peixes herbívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil, Corumbá: EMBRAPA–CPAP, 24p. (EMBRAPA–CPAP. Boletim de Pesquisa, 10).

Resende, E.K. 2003. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin Excluding the Upper Paraná River. In Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation states. J. Carolsfeld, B. Harvey, C. Ross, A. Baers (Eds), World Bank, Victoria. 99-155.

Rizzini, C.T. 1997. **Tratado de Fitogeografia do Brasil: aspectos ecológicos, sociológicos e florísticos**. 2ª edição. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural Edições Ltda. 747p.

- Saint-Paul, U. 1985. The neotropical serrasalmid *Colossoma macropomum* a promising species for fish cultures in Amazônia. **Anim. Res. Dev.** 22, 7-35.
- Saitoh, K. 1998. Genetic variation and local differentiation in the Pacific Cod *Gadus macrophalus* around Japan revealed by mtDNA and RAPD markers. **Fish. Sci.** 64, 673-679.
- Salkoe K.A. & Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellites markers. **Ecology Letters** 9, 615-629.
- Sambrook, J.; Russel, D.W. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold spring harbor Laboratory Press.
- Schneider, S.; Roessli, D.; Excoffier, L. 1997 ARLEQUIN ver. 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, Department of Anthropology, University of Geneva.
- Severi, W.; Rantin, F.T.; Fernandes, M.N. 1999. Structural and morphological feature of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887) gills. **Rev. Brasil. Biol.** 60, 193-501.
- Shikani, T.; Taniguchi, N. 2002. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. **Aquaculture** 204, 271-281.

- Silva, J.S.V.; Abdon, M. de M. 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub-regiões. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** 33, 1703-1712
- Slatkin, M.A. 1993. Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. **Evolution** 47, 264-279.
- Slatkin, M.A. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics Society of America** 139, 457-462.
- Smith, W.S.; Espindola, E.L.G.; Petrere, M.Jr.; Rocha, O. 2003. Fishing modification due dam, pollution and introduction fish species in the Tiete River, Monograph Collation, SP, Brazil, 494p. *apud* Makrakis, M.C.; Miranda, L.E.; Mkrakis, S.; Xavier, A.M.M.; Fontes, H.M.; Morlis, W.G. 2007. Migratory movements of pacu, *Piaractus mesopotamicus*, in the highly impounded Paraná River. **J. Appl. Ichthyol.** 23, 700-704.
- Sneath, P.H.A.; Sokal, R.R. 1973. **Numerical taxonomy**. WH Freeman ed. San Francisco, California.
- Spieth, P.T. 1974. Gene flow and genetic differentiation. **Genetics** 48, 961-965.
- Suganuma, C.H. 2004. Caracterização de estoques de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de microssatélites. Jaboticabal. Dissertação (Mestrado) – Centro de Aquicultura/UNESP.

Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. **Tree**, London, v.15, p.199-203.

Toledo Filho, S.A.; Almeida-Toledo, L.F.; Foresti, F.; Galhardo, E.; Donola, E. 1992. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. São Paulo: USP, Divisão de Artes Gráficas da CCS, 39p. (Cadernos de ictiogenética, 1).

Toledo – Filho, S.A.; Foresti, F.; Almeida-Toledo, L.F. 1996. Biotecnologia Genética Aplicada à Piscicultura. São Paulo: USP, Divisão de Artes Gráficas da CCS, 59p. (Cadernos de ictiogenética, 3).

Valle, R.P. & Proença, C.E.M. 2000. Evolução e Perspectivas da Aqüicultura no Brasil. 383-398 **In:** Valenti, W.C.; Poli, C.R.; Pereira, J.A.; Borguetti, J.R., Editores. Aqüicultura no Brasil. Bases para um desenvolvimento sustentável. Brasília: CNPq, 399p.

Vazzoler, A.E.A.M.; Suzuki, H.I.; Marques, E.E.; Lizama, M. De. Los. A. 1997. Primeira maturação gonadal, períodos e áreas de reprodução. **In:** A planície de inundação do alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socio econômicos. A. E. A. M. Vazzoler, A. A. Agostinho, N. S. Hahn (Eds), EDUEM, Maringá Paraná. p. 249-265.

Vieira, L.M. 2005. **Pantanal: um bioma ameaçado**. Corumbá: EMBRAPA – Pantanal. Disponível em :<http://www.cpap.embrapa.br/>. Acesso em 15 de setembro de 2005.

Ward, R.D.; Grewe, P.M. 1995. Appraisal of molecular genetic techniques in fisheries. In: Molecular Genetics in Fisheries. (Carvalho, G.R.; pitcher, T.J.). 2954p.

Ward, R.D.; Jorstad, K.E; Maguire, G.B. 2003. Microsatellite diversity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) introduced to Western Australia. **Aquaculture** 219, 169-179.

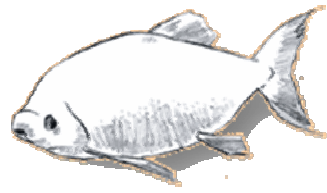
Wright, S. 1922. Coefficients of inbreeding and relationship. **American Naturalist** 56, 330-338.

Wright, J.M. & Bentzen, P. 1994. Microsatellites: genetic markers for the future. **Rev. Fish Biol.** 4, 384-388.

Wright, S. 1978. Evolution and genetic population. Vol. 4: Variability within and among natural populations. Chicago III: University of Chicago Press.

Zamparette, A.S. 1996. Caracterização de marcadores citogenéticos e genético moleculares em quatro populações de peixes da família Characidae – *Piaractus*

mesopotamicus (Holmberg, 1887). Jaboticabal. Dissertação (Mestrado) – FCAV/UNESP.



Anexos

Anexo1. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/Parque Nacional - Foz.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RCPN1	207	209	192	206	190	198	200	203	214	216	266	217	209	217	250	
RCPN2	197	209	202		194	198	203		210	216	266	231	223	231	250	
RCPN3	193	205	202	208	186	198	203	212	214		260	223	217	223	250	
RCPN4			192	206	190		203		214		266	209	209	223	250	
RCPN5	207	209	206	212	186	192	203	206	214	216	266	229	223	229	250	
RCPN6			208		186	192	203	206	214		266		211		250	
RCPN7	205		206	208	198	201	203	212	214	216	266	231	225	231	250	
RCPN8	205	207	206		190	194	200	203	214	216		222	225	222	250	
RCPN9	205	207	206	212	190	202	203		214		266	209	209	223	250	
RCPN10	205	209	202	208	190	194	206		214		266	23	217	23	250	
RCPN11	199	203	208	212	186	192	203	206	214	216	266	23	209	23	250	
RCPN12	203	211	204		192	202	203		214		266	209	209	233	250	
RCPN13			202	206	190	192	203		214	216	266	209	215	231	244	
RCPN14	207	209	206		190	194	203		214	216	266	223	211	223	250	
RCPN15			206	212	192	198	203	215	216		266	227	223	227	250	
RCPN16	205	207	202		190		203		214		266	209	209	223	250	
RCPN17			202	206	192	194	203	206	214		266	209	209	223	250	
RCPN18	197	207	202	214	190		203		214		266	223	215	223	250	
RCPN19	207	209	202		186	192	203	206	216		266	229	223	229	250	
RCPN20	197	205	192	206	192	198	203				266	223	215	223	250	
RCPN21	205		202	206	190	198	203	206	214	216	266	209	209	223	250	
RCPN22			202	212	190	192	206		214		266	209	209	223	250	
RCPN23	207		206		192		206	206	214	216	280	225	209	225	250	
RCPN24		211	202	204	190	192	203	206	214	216	266		209		250	
RCPN25	197	205	206		190	192	203	206	214	216	266	231	209	231	250	
RCPN26	203	205	212	212	194	198	203		214		266	223	223	223	250	
RCPN27			212	216	192	198	197	206	210	214	266	209	209	223	244	
RCPN28	205	211	208		190		203	206	214	216	266	223	223	223	250	
RCPN29	203		202	206	186	192	203	206	214		266	219	219	223	250	
RCPN30	197	213	206	210	192	196	203		214	216	266	209	209	223	250	
RCPN31			198	202	196	198	203		214		266	209	209	223	250	
RCPN32	205	207			190	202	203	206	214	216	266	209	209	223	244	
RCPN33			206	212	192	198	203	206	214		266	223	223	233	250	
RCPN34	193	209	202	206	192	196	203	206	216		266	215	215	223	250	

Anexo 2. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio São Lourenço.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RSLO1	207	209	206		194	198	203	206	214	216	266	266	223	231	250	
RSLO2	203	209	206		190		203	206	214		260	266	215	223	244	250
RSLO3	207	209	202		192	194	206	212	214		260	266	217	223	250	
RSLO4	201		202		192	196	203		214		266		211	217	250	
RSLO5	203	209	206		196	198	203		214	216	260	266	209	231	250	
RSLO6	205	206	206	208	202	202	203		216		266		209	235	250	
RSLO7	209	211	202		194	196	203	206	214		266		209	229	250	
RSLO8	197	203	206	212	186	194	203	206	214	216	268		223	231	250	
RSLO9	205	209	206	216	190	198	203	203	214		266		215	227	250	
RSLO10	205	209	202	208	192	194	200	203	214		266		223	233	250	
RSLO11	191	207	206		192	198	200	203	214		266		209	223	250	
RSLO12	197	207	202	202	186	198	203	206	214		266		209	231	250	
RSLO13	207		206		194	198	206		206	214	266	266	209	231	250	
RSLO14	205	211	206	208	198		203	206	214		260	266	223	233	250	
RSLO15	205		206		198	192	200	203	214		266		215	223	250	
RSLO16	197		202	212	186		203	206	214		266		223		250	
RSLO17			202	206			203	206	214		266				250	
RSLO18			206		192		203	206	216		266		209	223	250	
RSLO19	201	205	206		190		200	203	216	216	266		223	233	250	
RSLO20	203	205	206				203	203	214		266	268	223	229	250	
RSLO21	197		204	206	190	194	194	203	214	216	266		209	215	250	
RSLO22			202	206	186	190	203	206	214		266		209	223	250	
RSLO23	199	207	206						214		266		209	223	250	
RSLO24	203	211	204	206	194	190	194	203	214		260	266	209	223	250	
RSLO25	207		202	212	186	192	203	203	214		266		223	231	250	
RSLO26			202	206	192	198	206	206	214		266		209	215	250	
RSLO27	205		204		192	198	203	206	208	214	266		215	223	250	
RSLO28	197	205	206	208	192	198	203	203	214	216	266		209	223	250	
RSLO29	205	209	206		186	194	203	206	216		266		231	233	250	
RSLO30	203	211	202	206	196	198	206		214		266		215	250	250	

Anexo 3. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio. Taquari/Caronal.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RTCA1	205	211	206	208	190	194	203	203	214	218	266	270	211	250	250	
RTCA2	197	211	205		192		200	203	214	216	260	266	209	227	250	
RTCA3			202		186	192	203	206	216		260	266	211	229	250	
RTCA4	205		202	208	192	198	206	206	214		266		209	223	250	
RTCA5	191	205	202	206	186	194	203	206	216		266		211	225	250	
RTCA6	203	205	212	214	195	198	197	203			266		209	223	250	
RTCA7	205		192	202	190	198	203	203	208	216	266		211	225	250	
RTCA8	209	213	192	208	192	198	203	206	214		266		211	225	250	
RTCA9	197	205	202	206	186	190	203	203	216		266		211	250	250	
RTCA10	203	205	192	206			203	206	214		266		223	250	250	
RTCA11	205	207	202	206	186	192	203		214		266		209	223	250	253

Anexo 4. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/SESC.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RCSE1	205		206	214	190	196	200	203	214	216	266		209		250	
RCSE2	205	213	202	208	186	190	197	203	214		266	266	217	223	250	
RCSE3	197	205	202	206	192	102	200	203	214		266		219	214	250	
RCSE4	193	209	206	210	186	198	203		214		266	266	215	239	250	
RCSE5	193	209	202	212	190	198	203		214		266		209	223	250	
RCSE6	205	209	202	212	190	194	203		214	216	266		209	231	244	250
RCSE7	205	209	206		186		203		214		266	266	215	223	250	
RCSE8	202		206	206	192	194	203	206	214		266		223	250	250	
RCSE9	203	205	208	212	186	194	203		214		266	266	223	250		
RCSE10	197	207	208	212	192		203	206	214	216	266		219	229	250	
RCSE11	203	205	206		186	198	203	206	214	216	266		223	229	250	
RCSE12	207	211	202		198		203		214		266		209	250		
RCSE13	205	209	212		190	198	203	206	214		266	266	209	223	250	
RCSE14	197	206	202		190	198	203		214	216	266	266	217	223	250	253
RCSE15	205		206		192	194	203		216		266		227	233	250	
RCSE16	205	209	206		194	202	200	203			266		223	235		
RCSE17	193	209	206	214	194	198	203		214		266	268	209	217	250	
RCSE18	205	205	202	206	190	194	203		214	216	266		223	250	250	
RCSE19	209	209	206	208	192	194	203	206	210	214	266	268	217	223	250	
RCSE20			206	212	188	198	203	206	210	216	266		209		250	
RCSE21	193	213	206	214	186	198	203	206	210	214	266	266			250	
RCSE22	193	197	198	212	192	198	203		214	216	266	266	223	250	250	
RCSE23	207	211	202	206	186	194	203		208	216	266		223	250		
RCSE24	201	209	206	212	190		203		214		266		223	233	250	
RCSE25	205		205		192	194	203		214		266	266	223	250	250	
RCSE26	205		192	206	198		203	206	214		266		209	223	250	
RCSE27	203	207	202	206	186	192	203		210	214	266	268	209	227	244	250
RCSE28	205	209	202	206	190	198	203	206	210	216	266		211	223	244	250
RCSE29	203	209	206	212	190	194	203		214	216	266	268	209	223	244	250
RCSE30	205	211	202	212	186	912	203	206	214	216	266		223	250	250	
RCSE31	205	209	206	208	194	196	203	206	214		266		223	250	250	
RCSE32	205	209	202		190		203	206	214		266		215	250	250	
RCSE33	205	209	206		192	198	203	206	216				211	223	205	
RCSE34			206		192	194	203	206	216		266		209	223	250	
RCSE35	205	207	206	212	192		203	212	216				211	225	250	
RCSE36	205	209	202	206	194	198	203		214				209	250	250	
RCSE37	205	209	202	206	186	190	203		214	216	260		211	223	250	
RCSE38	205	209	206	208	192	198	203	206	214	216			209	223	250	
RCSE39	205	209	206		186	194	203		214				209	223	250	
RCSE40	193	205	206		190	196	203		216	218			209	223	250	

Anexo 5. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio. Taquari/Palmeiras.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RTPA1	203	209	206		190		197	203	210	214	266		209	223	250	
RTPA2	203	209	206		192	194	203		214	216			211	223	250	
RTPA3	203	207	206	212	192	194	203						223	250	250	
RTPA4	205	213	206	208	190		203		216		266		223	250	250	
RTPA5	203	207	206		186	198	203		218	214		266	225	239	241	247
RTPA6			206				203				260	266	209	250	250	
RTPA7	197		202	214	190		203	206	214		266		215	231	250	
RTPA8	205	205	206		194	198	203		216		266		209	229	250	
RTPA9	205	205	192	206	192		200	203	214		266		209	223	250	
RTPA10	207	213	202	212	192	198	203	206			266		209	223	250	
RTPA11	205	211	202	206	194	198	203	206	214		266		211	223	250	
RTPA12			204	206	190	198	203	206	214		266		223	250	250	
RTPA13			206		190	200	200	203	210	214	266		209	229	250	
RTPA14	205	207	206				203	206	214		266		223	229	250	
RTPA15	205	207	202	214	194	198	203	206	214		266		225	250	250	
RTPA16	207		206		192	198	203		214		266		209	221	250	
RTPA17	205	205	192	206	192	198	200	203	214		266		219	225	250	
RTPA18			202	212	184	192	203	206	214	216	266		225	233	250	
RTPA19	205	211	202	206	194		203		214	216	260	266	211	225	250	
RTPA20			204	206	186	192	206	206	224	216	260	266	223	233	250	
RTPA21	207	211	206		190	194	200	203	214	216	266		211	225	250	
RTPA22			206				206		214	216			217	233	250	
RTPA23			192	206	192	194	206	206	214				211	231	250	
RTPA24	205	211	206	212	192	198	197	206	214				211	239	250	
RTPA25	205		206		192	198	203	203	214	216	266		211	225	250	
RTPA26	205	207	206	212	186	190	200	203	214		266		225	231	250	
RTPA27			202	212	190	194	206		214	216	266		217	225	247	
RTPA28			204	206	192	198	203		214		266		211	225	247	
RTPA29			206		190	192	203	206	214	225			211	225	250	
RTPA30	203	207	202	208	186		200	203	216	218	260		217	225	247	
RTPA31			206	212	194	198	203	206	214	216			211	217	247	
RTPA32			192	206	190	202	203		214	216			211	217	247	

Anexo 6. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio.Negro.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RNEG1	205	207	206	212	190		203		210	214	266		209	223	250	
RNEG2	205	211	206	208	192	198	203		210	216	266		211	223	250	
RNEG3	197	209	206		190	198	203		214		266		211	223	250	
RNEG4	205		206		192	198	203		214	216	260	266	209	223	250	
RNEG5	209	211	206		186	190	197	203	214	216	266		209	223	250	
RNEG6	205	205	206	212			203	206					209	223	250	
RNEG7	197	209	192	202	192		203	206	214		266		211	250	250	
RNEG8	197	205	212		194	198	206	212					211	223	250	
RNEG9	205	213	206	208	192	194	197	203			260	266	211	223	250	
RNEG10			206	212	190	192	203				266		209	219	250	
RNEG11	211		206	208	190	192	197	203	214		266		209	223	250	
RNEG12	205		206		190	192	203				266		209	223	250	
RNEG13	197	209	206	216	188	192	206				266		211	223	250	

Anexo 7. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Paraguai Mirim.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RPM11	207		206	212	185	188	203	206	214	216	268		209	223	250	
RPM12	197	205	200	206	186	198	197	203	214		268		209	223	250	
RPM13	211		206	208	190	194	203	206	214				209	217	250	
RPM14	209	211	208		194	198	203	206	214				209	223	250	
RPM15	207		206	212	190		203	206	210	216			209	223	250	
RPM16	197	203	206	212	190	194	203	206	214	216	266		211	223	250	
RPM17	209	211	202	206	188	194	203	206	214				209	223	250	
RPM18	197	205	206	214	190		203	212	214		266		211	225	250	
RPM19	197		206		192	198	203	206	214				209	227	250	
RPM110	197	209	202	206	190	194	197	203	214		266	270	215	223	250	
RPM111	197	207	206		192	198	203	214	216				209	223	250	
RPM112	205		204		190	192	203	214	216		260	266	211	217	250	
RPM113			206	208	192	192	206	214	214		266		215	223	250	
RPM114			192		192		203	206	214		260	266	209	223	250	
RPM115	205	207	206	212	190		203	206	216		266		209	223	250	
RPM116	205	207	192	206	186	190	203	206	208	214	260	266	223	223	250	

Anexo 8. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Paraguai/Corumbá.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RPC01			206	208	186	202	203	206	214	216	266		209	223	250	253
RPC02	193	205	202	206	190	192	203	206	214				209	223	250	
RPC03			202	206	198		200	203	210	216	266		209	223	250	
RPC04	199	205	192	202	190		206	209	208	214	266		209	215	250	
RPC05			192	206	192	198	203	206	214		266		209	223	250	
RPC06	197	205	202	206	186	194	203	206	214		266		211	223	250	
RPC07	205	209	202	212	194	198	203	214	214	216	266		209	223	250	
RPC08			206		184	190	203	206	214	216	266		215	223	250	
RPC09	205	209	206		192	198	203	206	214	218	266		211	231	250	
RPC10			192	206	192	194	203	206	208	214	266		209	223	250	
RPC11			192	206	192	198	200	203	214	214	266		209	223	250	
RPC12	197	207	206		186	194	206	209	214	216	266		209	223	250	
RPC13	207	209	206		186	202	203	214	214		266		211	223	244	250
RPC14	197	203	206		186	192	197	203	214		266		209	223	250	
RPC15			202	206	192	194	203	206	208	216	266		209	223	250	
RPC16	205		202	206	192	198	203	206	216		266		209	223	250	
RPC17	193		206		192	198	203	206	214		266		209	223	250	
RPC18	199	207	206		192		203	206	214		266		209	231	250	
RPC19	205	202	202		190	198	203	206	214		260		209	223	250	

Anexo 9. Tamanho dos alelos (pb) encontrados nos indivíduos de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio.Paraguai/Cáceres.

Indivíduo	Pme2		Pme4		Pme5		Pme14		Pme20		Pme21		Pme28		Pme32	
	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2	Alelo 1	Alelo 2
RPCA1	203	205	202		192		206		214		266	268	209		250	
RPCA2	201	205	204	206	198		200	203	210	214	266		209	223	250	
RPCA3	197	205	212	214	192	194	203	206	210	216	266		209	223	250	
RPCA4	205	207	202	206	190	198	206		214		260	268	211		250	
RPCA5	197		202		192	198	203		214	216	266		209		250	
RPCA6	205		202	206	184	190	203		214				209	225	250	
RPCA7	203		206	212	198		203		214	216	266		209	223	250	
RPCA8	197		192		196		203		214		266		211	223	244	
RPCA9	197	211	206		192		200	203	214		266		209		250	
RPCA10	205		206	208	190	194	206		214		264	266	209		250	
RPCA11	197	209	206		190	198	203		214	216	260		209	219	250	
RPCA12	203	205	206		194	198	200	206	214	216	260	266	211	239	250	
RPCA13			202				203	206	214				215		250	
RPCA14	205		202	206	184	190	203		214		266		209	223	250	
RPCA15	205	209	202	206	186	192	203		214		266		209	223	250	
RPCA16	205	209	206		192	198	203		214		266		209	223	250	
RPCA17	197	205	206	212	190	194	203	206	214	216	266		209	223	250	
RPCA18	205	205	202	206	191	198	206		214		260	268				
RPCA19	193	205	206		192	198	203		214	216	266		209	223	250	
RPCA20	197	205	202	206			203	206	214	216	260	268	209		250	
RPCA21	197	205	192		190	198	203		214		266		209		250	
RPCA22	203	205	206		198		197	203	214	216	266		209	223	250	
RPCA23	197	209	202	214	190	198	203	206	214	216	266	266	209	219	250	
RPCA24	197	205	206		190	196	203	206	214	216	266		209	223	250	
RPCA25	203		206		190	196	203	206	214				211		250	
RPCA26	205	211	202		190		206		208	216	266		211	215	250	
RPCA27	197	211	202		192	198	203	206	214	216	266		223	229	250	
RPCA28	203	207	208	214	190	194	203	206	214		266		211	225	250	
RPCA29	197	209	206	212	192	498	203	206	214	216			211	225	250	
RPCA30	205	207	202	206	190	194	203	206	214				223		250	
RPCA31	205		206	208	190	202	203		214		266		209	223	250	

Anexo 10. Frequências alélicas dos oito locos microssatélites estudados nas populações de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Mato-Grossense estudadas. (**RPCN** = Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz; **RSLO** = Rio São Lourenço; **RCSE** = Rio Cuiabá/Sesc; **RTCA** = Rio Taquari/Caronal; **RTPA** = Rio Taquari/Palmeiras; **RNEG** = Rio Negro; **RPMI** = Rio Paraguai Mirim; **RPCO** = Rio Paraguai/Corumbá; **RPCA** = Rio Paraguai/ Cáceres)

	Alelos (pb)	RPCN	RSLO	RCSE	RTCA	RTPA	RNEG	RPMI	RPCO	RPCA
Pme2	191	0.000	0.019	0.000	0.050	0.000	0.000	0.0000	0.000	0.000
	193	0.083	0.000	0.079	0.000	0.000	0.000	0.000	0.125	0.017
	197	0.096	0.135	0.053	0.100	0.050	0.154	0.214	0.125	0.233
	199	0.019	0.019	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000
	201	0.000	0.058	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
	203	0.096	0.115	0.053	0.100	0.125	0.000	0.036	0.042	0.133
	205	0.288	0.250	0.421	0.450	0.375	0.385	0.214	0.375	0.400
	207	0.250	0.173	0.066	0.100	0.250	0.038	0.250	0.125	0.050
	209	0.135	0.154	0.250	0.050	0.050	0.154	0.143	0.125	0.083
	211	0.058	0.077	0.039	0.100	0.100	0.231	0.143	0.000	0.067
	213	0.019	0.000	0.026	0.050	0.050	0.038	0.000	0.000	0.000
Pme4	192	0.048	0.017	0.013	0.182	0.063	0.038	0.094	0.079	0.065
	198	0.016	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
	202	0.226	0.233	0.225	0.273	0.125	0.038	0.063	0.236	0.290
	204	0.048	0.067	0.000	0.000	0.047	0.000	0.063	0.000	0.016
	206	0.355	0.550	0.475	0.318	0.594	0.577	0.469	0.605	0.468
	208	0.129	0.067	0.075	0.136	0.031	0.115	0.125	0.026	0.048
	210	0.016	0.000	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	212	0.129	0.050	0.150	0.045	0.109	0.192	0.125	0.026	0.065
	214	0.016	0.000	0.037	0.045	0.031	0.000	0.031	0.000	0.048
	216	0.016	0.017	0.000	0.000	0.000	0.038	0.000	0.000	0.000
Pme5	184	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.026	0.034
	186	0.088	0.107	0.150	0.200	0.086	0.042	0.094	0.105	0.017
	188	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000	0.042	0.063	0.000	0.000
	190	0.294	0.179	0.188	0.200	0.244	0.292	0.344	0.132	0.276
	192	0.279	0.196	0.200	0.200	0.241	0.375	0.219	0.289	0.190
	194	0.088	0.179	0.188	0.150	0.190	0.083	0.156	0.132	0.103
	196	0.044	0.071	0.037	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.069
	198	0.147	0.250	0.212	0.200	0.207	0.167	0.125	0.263	0.293
	200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000
	202	0.059	0.018	0.013	0.000	0.017	0.000	0.000	0.053	0.017
Pme14	194	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	197	0.017	0.000	0.013	0.045	0.063	0.115	0.063	0.026	0.016
	200	0.033	0.069	0.037	0.045	0.094	0.000	0.000	0.053	0.048
	203	0.617	0.569	0.750	0.636	0.625	0.654	0.594	0.526	0.581
	206	0.283	0.310	0.188	0.273	0.219	0.192	0.281	0.342	0.355
	209	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.053	0.000
	212	0.033	0.017	0.013	0.000	0.000	0.038	0.031	0.000	0.000
	215	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
Pme20	208	0.000	0.033	0.013	0.050	0.000	0.000	0.033	0.079	0.016
	210	0.030	0.000	0.053	0.000	0.034	0.143	0.033	0.026	0.032
	214	0.621	0.750	0.671	0.450	0.638	0.500	0.700	0.658	0.726
	216	0.348	0.217	0.250	0.450	0.259	0.286	0.233	0.211	0.226
	218	0.000	0.000	0.013	0.050	0.034	0.000	0.000	0.026	0.000
	224	0.000	0.000	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000
Pme21	260	0.147	0.086	0.162	0.100	0.109	0.091	0.150	0.067	0.120
	264	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.020
	266	0.838	0.862	0.794	0.850	0.891	0.909	0.600	0.933	0.780
	268	0.015	0.052	0.044	0.000	0.000	0.000	0.200	0.000	0.080
	270	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
Pme28	209	0.250	0.241	0.256	0.227	0.145	0.346	0.313	0.447	0.417
	211	0.044	0.017	0.051	0.409	0.194	0.269	0.094	0.079	0.150
	215	0.059	0.138	0.064	0.000	0.016	0.000	0.063	0.053	0.050
	217	0.044	0.034	0.051	0.000	0.065	0.000	0.063	0.000	0.000
	219	0.015	0.000	0.038	0.000	0.016	0.038	0.000	0.000	0.033
	221	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	223	0.353	0.362	0.410	0.182	0.161	0.346	0.406	0.368	0.233
	225	0.059	0.000	0.013	0.091	0.210	0.000	0.031	0.000	0.067
	227	0.015	0.017	0.026	0.045	0.000	0.000	0.031	0.000	0.000
	229	0.029	0.034	0.026	0.045	0.048	0.000	0.000	0.000	0.017
	231	0.074	0.103	0.013	0.000	0.048	0.000	0.000	0.053	0.000
	233	0.059	0.034	0.026	0.000	0.048	0.000	0.000	0.000	0.017
	235	0.000	0.017	0.013	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	239	0.000	0.000	0.013	0.000	0.032	0.000	0.000	0.000	0.017
Pme32	241	0.000	0.000	0.000	0.000	0.016	0.000	0.000	0.000	0.000
	244	0.059	0.017	0.051	0.000	0.000	0.000	0.000	0.028	0.033
	247	0.000	0.000	0.000	0.000	0.203	0.000	0.000	0.000	0.000
	250	0.941	0.983	0.936	0.955	0.781	1.000	1.000	0.944	0.967
	253	0.000	0.000	0.013	0.045	0.000	0.000	0.000	0.028	0.000

Anexo 11: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/Parque Nacional-Foz (RCPN).

População	Loco 1	Loco 2	<i>P</i>	S.E.
RCPN	Pme2	Pme4	1.00000	0.00000
RCPN	Pme2	Pme5	0.65596	0.03930
RCPN	Pme4	Pme5	0.51048	0.03860
RCPN	Pme2	Pme14	0.90805	0.01507
RCPN	Pme4	Pme14	0.45218	0.02928
RCPN	Pme5	Pme14	0.04781	0.01007
RCPN	Pme2	Pme20	0.21654	0.01859
RCPN	Pme4	Pme20	0.87976	0.01474
RCPN	Pme5	Pme20	0.36211	0.02071
RCPN	Pme14	Pme20	0.37118	0.01606
RCPN	Pme2	Pme21	0.24387	0.01922
RCPN	Pme4	Pme21	0.38018	0.01885
RCPN	Pme5	Pme21	0.33004	0.02035
RCPN	Pme14	Pme21	1.00000	0.00000
RCPN	Pme20	Pme21	0.71633	0.01015
RCPN	Pme2	Pme28	0.02432	0.01284
RCPN	Pme4	Pme28	0.62072	0.04316
RCPN	Pme5	Pme28	0.54185	0.04291
RCPN	Pme14	Pme28	0.57817	0.03627
RCPN	Pme20	Pme28	0.27744	0.02998
RCPN	Pme21	Pme28	0.21225	0.02719
RCPN	Pme2	Pme32	0.48704	0.01260
RCPN	Pme4	Pme32	0.09944	0.01074
RCPN	Pme5	Pme32	0.21342	0.01258
RCPN	Pme14	Pme32	0.22933	0.01136
RCPN	Pme20	Pme32	0.16250	0.00716
RCPN	Pme21	Pme32	1.00000	0.00000
RCPN	Pme28	Pme32	0.93768	0.00935

Anexo 12: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio São Lourenço (RSLO).

População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RSLO	Pme2	Pme4	0.91803	0.02048
RSLO	Pme2	Pme5	1.00000	0.00000
RSLO	Pme4	Pme5	0.30528	0.03191
RSLO	Pme2	Pme14	1.00000	0.00000
RSLO	Pme4	Pme14	0.34535	0.02201
RSLO	Pme5	Pme14	0.78059	0.01911
RSLO	Pme2	Pme20	0.46211	0.01906
RSLO	Pme4	Pme20	0.84555	0.01233
RSLO	Pme5	Pme20	0.72934	0.01670
RSLO	Pme14	Pme20	0.94099	0.00387
RSLO	Pme2	Pme21	0.04850	0.00760
RSLO	Pme4	Pme21	0.81192	0.01615
RSLO	Pme5	Pme21	0.82483	0.01158
RSLO	Pme14	Pme21	0.55290	0.01345
RSLO	Pme20	Pme21	0.36237	0.00999
RSLO	Pme2	Pme28	0.50959	0.04274
RSLO	Pme4	Pme28	0.74768	0.02914
RSLO	Pme5	Pme28	1.00000	0.00000
RSLO	Pme14	Pme28	0.39573	0.02110
RSLO	Pme20	Pme28	0.82971	0.01274
RSLO	Pme21	Pme28	0.86117	0.01375
RSLO	Pme2	Pme32	0.75627	0.01132
RSLO	Pme4	Pme32	1.00000	0.00000
RSLO	Pme5	Pme32	0.85282	0.00875
RSLO	Pme14	Pme32	1.00000	0.00000
RSLO	Pme20	Pme32	0.36694	0.00533
RSLO	Pme21	Pme32	0.23843	0.00544
RSLO	Pme28	Pme32	0.66870	0.01236

Anexo 13: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Cuiabá/SESC (RCSE).

População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RCSE	Pme2	Pme4	0.38889	0.03872
RCSE	Pme2	Pme5	0.45567	0.04395
RCSE	Pme4	Pme5	0.75132	0.02746
RCSE	Pme2	Pme14	0.36668	0.02813
RCSE	Pme4	Pme14	0.18829	0.01852
RCSE	Pme5	Pme14	0.35163	0.02280
RCSE	Pme2	Pme20	0.04544	0.01216
RCSE	Pme4	Pme20	0.89889	0.01388
RCSE	Pme5	Pme20	0.45345	0.02596
RCSE	Pme14	Pme20	0.61243	0.01662
RCSE	Pme2	Pme21	0.50160	0.02288
RCSE	Pme4	Pme21	0.34832	0.01750
RCSE	Pme5	Pme21	0.37052	0.01918
RCSE	Pme14	Pme21	0.63774	0.01189
RCSE	Pme20	Pme21	0.09223	0.00771
RCSE	Pme2	Pme28	0.12705	0.02804
RCSE	Pme4	Pme28	0.37850	0.03898
RCSE	Pme5	Pme28	0.02372	0.01082
RCSE	Pme14	Pme28	0.35575	0.02464
RCSE	Pme20	Pme28	0.62759	0.03143
RCSE	Pme21	Pme28	0.34382	0.02100
RCSE	Pme2	Pme32	0.76284	0.01836
RCSE	Pme4	Pme32	0.28298	0.01395
RCSE	Pme5	Pme32	0.69530	0.01563
RCSE	Pme14	Pme32	1.00000	0.00000
RCSE	Pme20	Pme32	0.69633	0.01164
RCSE	Pme21	Pme32	0.31961	0.00677
RCSE	Pme28	Pme32	0.25732	0.01865

Anexo 14: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Taquari/Caronal (RTCA).

População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RTCA	Pme2	Pme4	1.00000	0.00000
RTCA	Pme2	Pme5	No information	
RTCA	Pme4	Pme5	1.00000	0.00000
RTCA	Pme2	Pme14	1.00000	0.00000
RTCA	Pme4	Pme14	0.67571	0.01752
RTCA	Pme5	Pme14	1.00000	0.00000
RTCA	Pme2	Pme20	0.13786	0.01239
RTCA	Pme4	Pme20	0.54637	0.01571
RTCA	Pme5	Pme20	1.00000	0.00000
RTCA	Pme14	Pme20	0.19656	0.00794
RTCA	Pme2	Pme21	0.27779	0.00996
RTCA	Pme4	Pme21	0.20288	0.00870
RTCA	Pme5	Pme21	1.00000	0.00000
RTCA	Pme14	Pme21	0.78855	0.00690
RTCA	Pme20	Pme21	0.33848	0.00766
RTCA	Pme2	Pme28	1.00000	0.00000
RTCA	Pme4	Pme28	0.35547	0.02164
RTCA	Pme5	Pme28	1.00000	0.00000
RTCA	Pme14	Pme28	1.00000	0.00000
RTCA	Pme20	Pme28	1.00000	0.00000
RTCA	Pme21	Pme28	0.46785	0.00946
RTCA	Pme2	Pme32	1.00000	0.00000
RTCA	Pme4	Pme32	1.00000	0.00000
RTCA	Pme5	Pme32	1.00000	0.00000
RTCA	Pme14	Pme32	1.00000	0.00000
RTCA	Pme20	Pme32	1.00000	0.00000
RTCA	Pme21	Pme32	1.00000	0.00000
RTCA	Pme28	Pme32	0.71774	0.00732

Anexo 15: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Taquari/Palmeiras (RTPA).

População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RTPA	Pme2	Pme4	0.14990	0.01786
RTPA	Pme2	Pme5	0.80276	0.02316
RTPA	Pme4	Pme5	0.99177	0.00419
RTPA	Pme2	Pme14	0.84507	0.01175
RTPA	Pme4	Pme14	0.26267	0.01804
RTPA	Pme5	Pme14	0.86432	0.01585
RTPA	Pme2	Pme20	0.31289	0.02091
RTPA	Pme4	Pme20	0.59993	0.02655
RTPA	Pme5	Pme20	0.15052	0.02592
RTPA	Pme14	Pme20	0.59878	0.01745
RTPA	Pme2	Pme21	0.76457	0.01302
RTPA	Pme4	Pme21	0.39567	0.01373
RTPA	Pme5	Pme21	0.05000	0.00555
RTPA	Pme14	Pme21	0.86258	0.00504
RTPA	Pme20	Pme21	0.03975	0.00414
RTPA	Pme2	Pme28	1.00000	0.00000
RTPA	Pme4	Pme28	0.24048	0.03106
RTPA	Pme5	Pme28	0.66789	0.04126
RTPA	Pme14	Pme28	0.90425	0.01464
RTPA	Pme20	Pme28	0.70106	0.03298
RTPA	Pme21	Pme28	0.93239	0.00724
RTPA	Pme2	Pme32	0.73939	0.01050
RTPA	Pme4	Pme32	0.30162	0.01315
RTPA	Pme5	Pme32	0.37918	0.01738
RTPA	Pme14	Pme32	0.91152	0.00451
RTPA	Pme20	Pme32	0.20144	0.00970
RTPA	Pme21	Pme32	0.37286	0.00708
RTPA	Pme28	Pme32	0.31857	0.01840

Anexo 16: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Negro (RNEG).

População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RNEG	Pme2	Pme4	0.76315	0.01444
RNEG	Pme2	Pme5	0.27031	0.02273
RNEG	Pme4	Pme5	1.00000	0.00000
RNEG	Pme2	Pme14	0.90789	0.00837
RNEG	Pme4	Pme14	0.11751	0.00803
RNEG	Pme5	Pme14	0.24648	0.01845
RNEG	Pme2	Pme20	0.17834	0.01064
RNEG	Pme4	Pme20	0.62864	0.00821
RNEG	Pme5	Pme20	1.00000	0.00000
RNEG	Pme14	Pme20	0.88170	0.00409
RNEG	Pme2	Pme21	0.44955	0.00579
RNEG	Pme4	Pme21	1.00000	0.00000
RNEG	Pme5	Pme21	0.51264	0.01005
RNEG	Pme14	Pme21	1.00000	0.00000
RNEG	Pme20	Pme21	1.00000	0.00000
RNEG	Pme2	Pme28	0.44203	0.01494
RNEG	Pme4	Pme28	0.08664	0.00771
RNEG	Pme5	Pme28	1.00000	0.00000
RNEG	Pme14	Pme28	0.62239	0.01258
RNEG	Pme20	Pme28	0.63238	0.00923
RNEG	Pme21	Pme28	1.00000	0.00000
RNEG	Pme2	Pme32	Not possible	
RNEG	Pme4	Pme32	Not possible	
RNEG	Pme5	Pme32	Not possible	
RNEG	Pme14	Pme32	Not possible	
RNEG	Pme20	Pme32	Not possible	
RNEG	Pme21	Pme32	Not possible	
RNEG	Pme28	Pme32	Not possible	

Anexo 17: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Paraguai Mirim (RPMI).

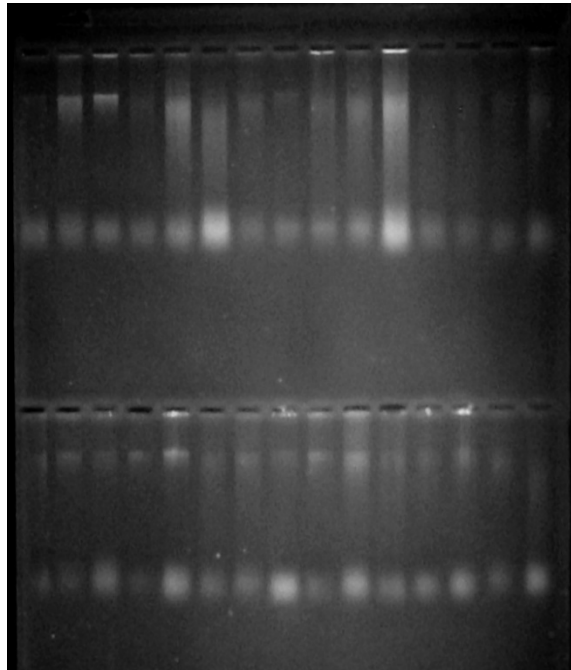
População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RPMI	Pme2	Pme4	0.42446	0.02734
RPMI	Pme2	Pme5	1.00000	0.00000
RPMI	Pme4	Pme5	0.08105	0.01742
RPMI	Pme2	Pme14	0.19108	0.00969
RPMI	Pme4	Pme14	0.09865	0.01257
RPMI	Pme5	Pme14	0.97734	0.00417
RPMI	Pme2	Pme20	0.10180	0.00855
RPMI	Pme4	Pme20	0.36641	0.02085
RPMI	Pme5	Pme20	0.70274	0.01808
RPMI	Pme14	Pme20	1.00000	0.00000
RPMI	Pme2	Pme21	1.00000	0.00000
RPMI	Pme4	Pme21	0.59998	0.01394
RPMI	Pme5	Pme21	0.51870	0.01054
RPMI	Pme14	Pme21	0.51633	0.00916
RPMI	Pme20	Pme21	1.00000	0.00000
RPMI	Pme2	Pme28	0.31749	0.02417
RPMI	Pme4	Pme28	0.36748	0.03092
RPMI	Pme5	Pme28	0.94170	0.00990
RPMI	Pme14	Pme28	0.26317	0.01959
RPMI	Pme20	Pme28	0.48464	0.02138
RPMI	Pme21	Pme28	0.91249	0.00528
RPMI	Pme2	Pme32	Not possible	
RPMI	Pme4	Pme32	Not possible	
RPMI	Pme5	Pme32	Not possible	
RPMI	Pme14	Pme32	Not possible	
RPMI	Pme20	Pme32	Not possible	
RPMI	Pme21	Pme32	Not possible	
RPMI	Pme28	Pme32	Not possible	

Anexo 18: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Paraguai/Corumbá (RPCO).

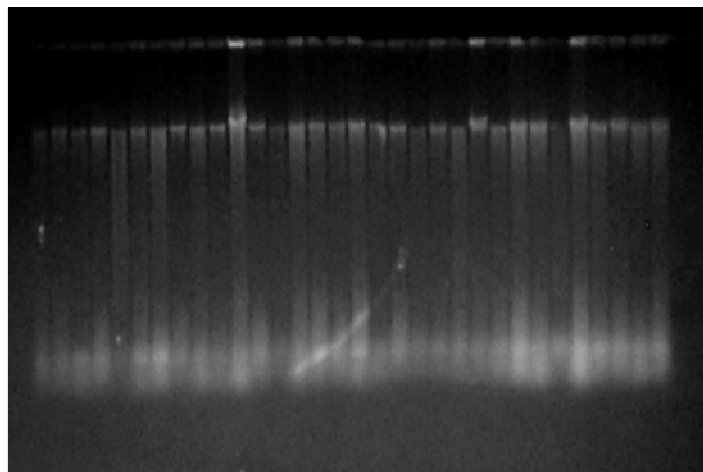
População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RPCO	Pme2	Pme4	1.00000	0.00000
RPCO	Pme2	Pme5	1.00000	0.00000
RPCO	Pme4	Pme5	0.73160	0.02584
RPCO	Pme2	Pme14	0.61286	0.01671
RPCO	Pme4	Pme14	0.52878	0.01620
RPCO	Pme5	Pme14	0.33305	0.02495
RPCO	Pme2	Pme20	1.00000	0.00000
RPCO	Pme4	Pme20	0.39480	0.02012
RPCO	Pme5	Pme20	0.57327	0.03121
RPCO	Pme14	Pme20	0.59010	0.01686
RPCO	Pme2	Pme21	1.00000	0.00000
RPCO	Pme4	Pme21	0.20743	0.00561
RPCO	Pme5	Pme21	0.47023	0.00889
RPCO	Pme14	Pme21	1.00000	0.00000
RPCO	Pme20	Pme21	1.00000	0.00000
RPCO	Pme2	Pme28	1.00000	0.00000
RPCO	Pme4	Pme28	0.93112	0.00934
RPCO	Pme5	Pme28	0.49513	0.03299
RPCO	Pme14	Pme28	0.77536	0.01615
RPCO	Pme20	Pme28	0.27186	0.02305
RPCO	Pme21	Pme28	1.00000	0.00000
RPCO	Pme2	Pme32	0.67140	0.00750
RPCO	Pme4	Pme32	0.43628	0.01412
RPCO	Pme5	Pme32	0.29285	0.01544
RPCO	Pme14	Pme32	0.63102	0.01171
RPCO	Pme20	Pme32	0.81577	0.01046
RPCO	Pme21	Pme32	1.00000	0.00000
RPCO	Pme28	Pme32	0.70008	0.01622

Anexo 19: Dados de desequilíbrio de ligação para cada par de locos para a população de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Rio Paraguai/ Cáceres (RPCA).

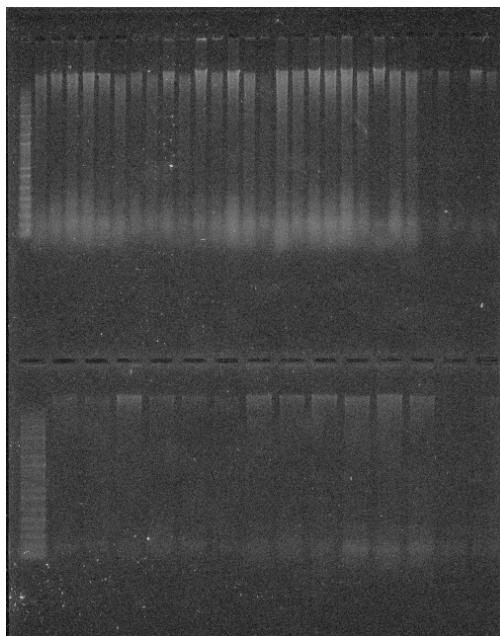
População	Loco 1	Loco 2	P	S.E.
RPCA	Pme2	Pme4	0.33807	0.03020
RPCA	Pme2	Pme5	0.58037	0.03291
RPCA	Pme4	Pme5	0.29145	0.02904
RPCA	Pme2	Pme14	0.00000	0.00000
RPCA	Pme4	Pme14	0.94685	0.00644
RPCA	Pme5	Pme14	0.06703	0.00925
RPCA	Pme2	Pme20	0.17215	0.01695
RPCA	Pme4	Pme20	0.03243	0.00815
RPCA	Pme5	Pme20	0.03937	0.00859
RPCA	Pme14	Pme20	0.11452	0.00843
RPCA	Pme2	Pme21	0.08126	0.01194
RPCA	Pme4	Pme21	0.59177	0.01976
RPCA	Pme5	Pme21	0.95759	0.00771
RPCA	Pme14	Pme21	0.02359	0.00468
RPCA	Pme20	Pme21	0.12900	0.00821
RPCA	Pme2	Pme28	0.18988	0.02747
RPCA	Pme4	Pme28	0.88869	0.02107
RPCA	Pme5	Pme28	0.18886	0.02600
RPCA	Pme14	Pme28	0.27356	0.02209
RPCA	Pme20	Pme28	0.87309	0.01707
RPCA	Pme21	Pme28	0.62165	0.02517
RPCA	Pme2	Pme32	0.51828	0.00922
RPCA	Pme4	Pme32	0.25094	0.00677
RPCA	Pme5	Pme32	0.20006	0.00635
RPCA	Pme14	Pme32	1.00000	0.00000
RPCA	Pme20	Pme32	0.49954	0.00736
RPCA	Pme21	Pme32	1.00000	0.00000
RPCA	Pme28	Pme32	0.24986	0.01030



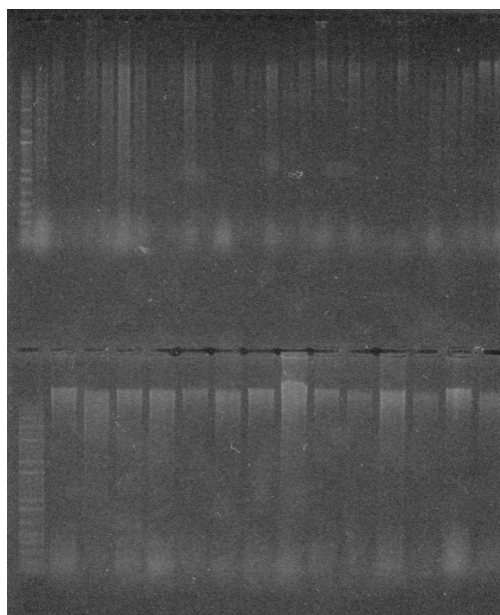
Anexo 20. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio São Lourenço.



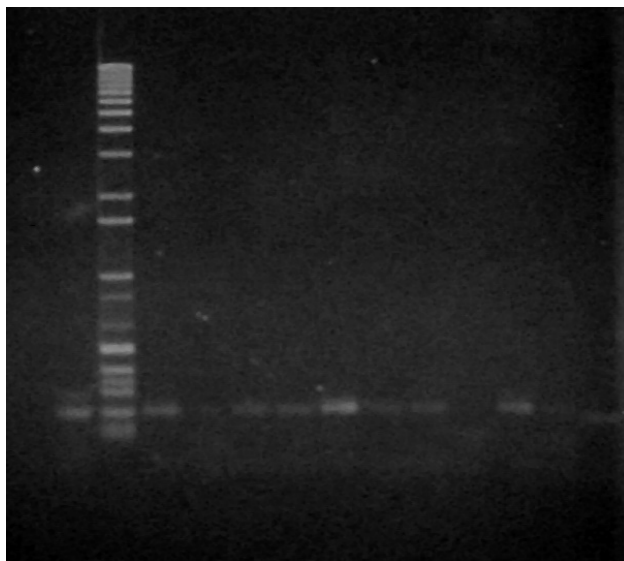
Anexo 21. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio Cuiabá (SESC Pantanal).



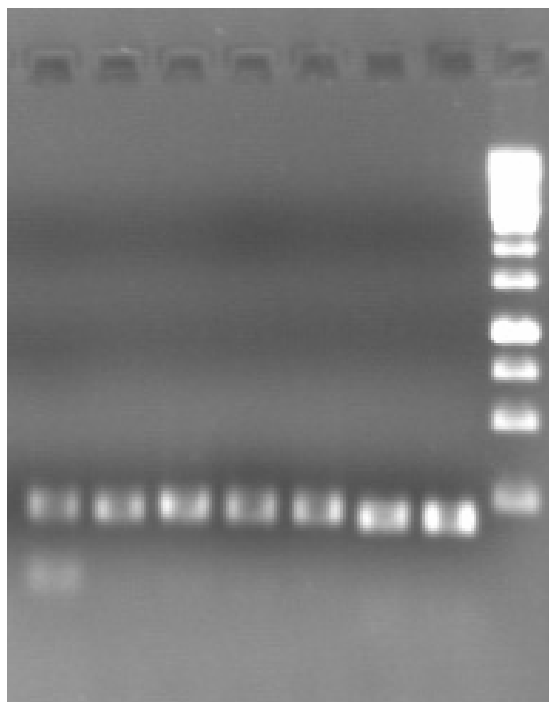
Anexo 22. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio Cuiabá (Parque Nacional do Pantanal). *Ladder 1kb plus*.



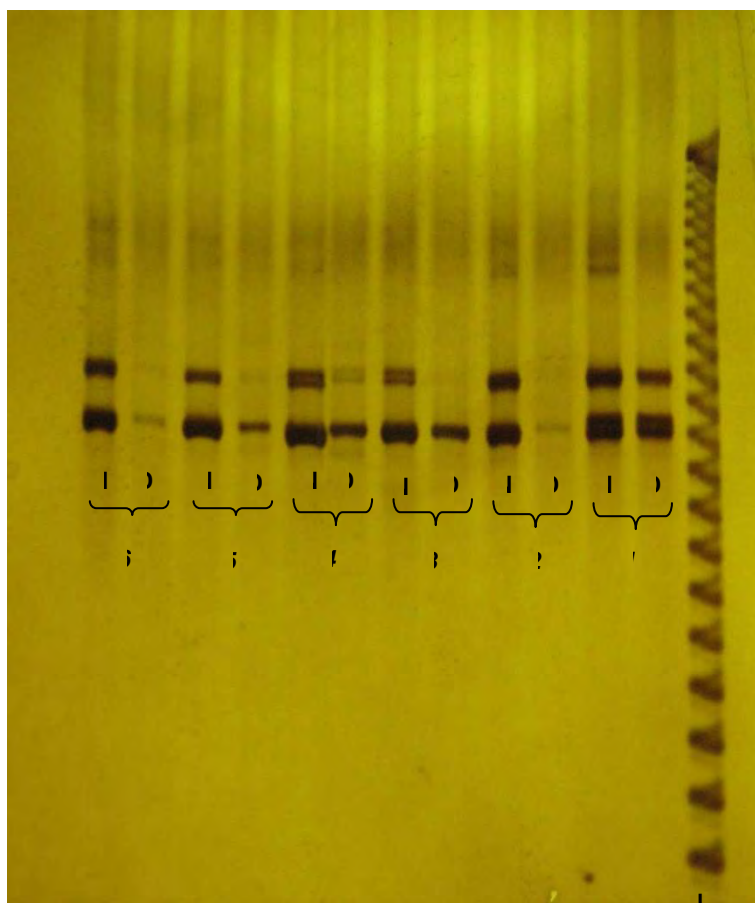
Anexo 23. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA extraído de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887). Amostras dos indivíduos coletados no Rio Paraguai. *Ladder 1kb plus*.



Anexo 24. Gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo com DNA amplificado de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com o *primer* Pme2. *Ladder* de 10 pares de base.



Anexo 25. Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com DNA amplificado de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com o *primer* Pme4. *Ladder* 1kb plus.



Anexo 28. Gel de poliacrilamida corado com nitrato de prata com DNA amplificado de pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) com *primer* Pme21. *Ladder* de 10 pares de base (L). 1 a 6: indivíduos escolhidos aleatoriamente para a realização do ensaio. (N): amostra não diluída. (D): amostra diluída na concentração de 5:1.

***“Assim diz o SENHOR: Reprime a tua voz de choro,
e as lágrimas de teus olhos; porque há galardão
para o teu trabalho, diz o SENHOR, pois eles
voltarão da terra do inimigo.”***

Jeremias 31: 16