

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU**

VANESSA PAES DA CRUZ

**Estudos genéticos em raias do gênero *Potamotrygon*
(Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na Bacia
do Rio Paraná**

BOTUCATU – SP

2013

VANESSA PAES DA CRUZ

**Estudos genéticos em raias do gênero *Potamotrygon*
(Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na Bacia
do Rio Paraná**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, para a obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Fausto Foresti

BOTUCATU – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Cruz, Vanessa Paes.

Estudos genéticos em raias do gênero *Potamotrygon* (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae) na Bacia do Rio Paraná / Vanessa P Cruz.
– Botucatu : [s.n.], 2013

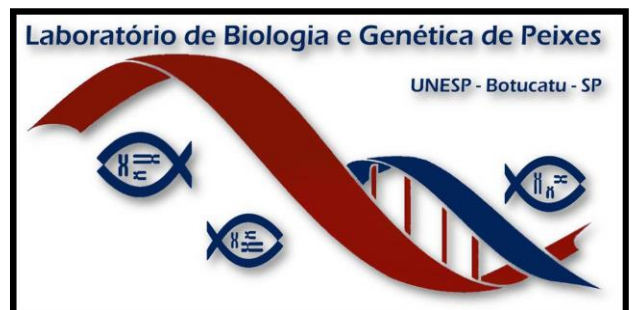
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.

Orientador: Fausto Foresti

Capes: 20406029

1. Genética de populações. 2. Raia (Peixe). 3. Paraná, Rio, Bacia.

Palavras-chave: Colonização; Genética populacional; *Potamotrygon*; Raias de água doce.



***Aos meus pais, que sempre se
dedicaram, me incentivaram e estiveram
presentes em todas as etapas da minha
vida...***

*Qual o sentido da vida
Viver por mera falta do que fazer
Viver por insistir em ter algo pra fazer
Viver apenas por confundir
Vida com sobrevivência*

*O sentido da vida
É mais complexo do que se pode imaginar
Nossa imaginação é limitada apenas ao que vemos
E se nunca vemos nada além da vida
É porque não vivemos nada mais do que permitiram*

*Viver é mais do que respirar
É sentir o amor brotar com o nascer do sol
É deixar escorrer pelo rosto o orvalho do amanhecer
É querer mais do que apenas querer
Queimar o sol que existe dentro de nós*

*A vida não se mede em tempo
O tempo é curto para que uma vida seja vivida
A qualquer momento o relógio para
E o tempo que tínhamos chega ao final
E o final acaba chegando antes do que deveria*

*Vivo os momentos da vida
Os bons e os maus, os duros e os fáceis
A cada sentimento que eu deixo para trás
Eu arranco um pedaço de minha alma
Por pura ignorância de querer ser feliz*

*A vida não é só alegria
É dor, lágrimas, amor e compaixão
Viva cada momento como se fosse acordar
Bom ou ruim logo irá passar
E irá perceber que nada passou de um sonho*

Autor: Alan Pooh

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos inesquecíveis!!!

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti, por orientar-me, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelo exemplo, pela paciência e pelo incentivo em todos os momentos deste trabalho. “O saber se aprende com os mestres. A sabedoria, só com o corriqueiro da vida”. *Cora Coralina*.

Ao Prof. Dr. Claudio de Oliveira pelo exemplo como pesquisador e dedicação aos alunos.

Ao grande colega de trabalho Renato Devidé, sempre presente e disposto a ajudar nas coletas.

Aos companheiros de risadas e distrações, Fábio Roxo, Bruno Melo, Guilherme, Jefferson, Kelly, Marlon, Luiz, Fernando, Yuldi, Natália, Priscilla, Ligia, Ricardo, Erica e Diogo (todos da República 5 de paus) “A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens”. *François La Rochefoucauld*. Agradeço o apoio, carinho e amizade dos inúmeros companheiros do laboratório: Bruno R., Gláucia, Daniela, Renato, Marcelo, Guiodai, Patrícia, Luis (japonês), Mahmoud, Ricardo Britzke, Raquel, Luciana, Gleisy.

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências (Botucatu-SP) e ao Departamento de Morfologia que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

Ao Professor Paulino Martinez, pelo grande auxílio de extrema importância neste trabalho! A todos do laboratório de Genética (Universidad de Santiago de Compostela, Lugo / Espanha), à Vanina pelos valiosos conselhos!

Aos funcionários, técnicos José Eduardo e Ricardo Texeira (pelas risadas), Dona Yolanda, Vanda e Dona Tera (que sem seu café seria extremamente difícil ficar acordada após os almoços).

A toda minha família, meus pais: José A. Paes e D. Yolanda, e irmãos: Anderson e Andresa, pelo apoio financeiro, amizade, churrascos e, é claro, a confiança. *Muito obrigada!*

RESUMO

As raia da família Potamotrygonidae são importantes componentes da ictiofauna Neotropical, sendo completamente restritas aos principais sistemas fluviais da América do Sul. Quatro gêneros são relacionados nessa família: *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*. Na Bacia do Rio Paraná, as espécies de maior frequência são *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri*. Ambas as espécies ocorriam somente na região do médio Paraná, a jusante de uma importante barreira geográfica natural, as Cachoeiras de Sete-Quedas. Porém, após a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu, muitas espécies antes existentes apenas na parte baixa da bacia hidrográfica, iniciaram um processo de dispersão e colonizaram o Alto Paraná, incluindo as raia, as quais passaram a desempenhar o papel de espécies invasoras. Atualmente, as raia estão estabelecidas até a região de Ilha Solteira-SP (alto Paraná), com possibilidade de já terem atingido pontos mais superiores nesta bacia. Com o objetivo de analisar o processo de invasão e colonização das espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* na bacia do Rio Paraná, foram realizados estudos genéticos moleculares utilizando genes mitocondriais e nucleares. O gene Citocromo Oxidase C subunidade I (COI) foi utilizado primeiramente para a identificação molecular das espécies, posteriormente, sequências dos genes ATPase 6/8, Cyt-B e região controle D-loop foram obtidas para análises populacionais. A divergência genética encontrada para o gene COI entre as espécies foi de 2,0%, considerada baixa quando comparada com resultados obtidos em outras espécies de peixes. Nas análises populacionais em *P. motoro*, a diversidade intra-específica foi baixa para todos os genes, com vários indivíduos compartilhando os mesmos haplótipos. Em *P. falkneri*, os valores foram semelhantes aos detectados em *P. motoro*, porém com valores de diferenciação genética elevados mas não significativos estatisticamente. Diante dos resultados entende-se que a baixa diferenciação genética detectada para as duas espécies em estudo poderia estar relacionada ao tempo recente no processo de colonização, de menos de 30 anos, ou ao fato do marcador não ser sensível o suficiente para detectar tais diferenciações genéticas. Com isso, fez-se necessário a busca de outros marcadores para identificar de forma mais eficiente a diversidade genética das populações de raia do Rio Paraná. Com o uso da tecnologia de pirosequenciamento, foram desenvolvidos 10 marcadores microsatélites polimórficos para a espécie *P. motoro* e, posteriormente, verificada a transferabilidade destes *loci* no estudo da espécie *P. falkneri*, sendo identificados 6 *loci* polimórficos compatíveis. Em *P. motoro*, foram genotipados 100 indivíduos de quatro regiões amostradas ao longo do Rio Paraná, nas localidades de Foz do Iguaçu-PR, Porto Maringá-PR, Ilha Solteira-SP e Três Lagoas – MS. A

amostragem de Foz do Iguaçu apresentou maior variabilidade genética, quando comparada com Ilha Solteira. A média do *Fst* em todas as localidades foi de 0,05, indicando uma baixa diferenciação populacional. Altos índices de fluxo gênico foram detectados entre as localidades, sem perda de variabilidade genética detectável, indicando que a espécie *P. motoro* constitui uma única unidade panmítica na bacia do Rio Paraná. Em *P. falkneri*, foram genotipados 77 indivíduos distribuídos em três regiões, Porto Camargo - PR, Porto Rico - PR e Ilha Solteira - SP. Os índices genéticos revelaram que as localidades com possíveis populações colonizadoras perderam variabilidade genética ao longo do processo de invasão. A amostragem de Porto Camargo apresentou maior diversidade genética quando comparada com Ilha Solteira, porém com número efetivo populacional elevado, sugerindo uma expansão populacional. Ambas as espécies em estudo apresentam características fenotípicas únicas, uma vez que *P. motoro* apresenta uma coloração dorsal marrom ou cinza, com presença de fileiras de ocelos tricolores distribuídas por todo o disco, sendo estes ocelos constituídos de uma pequena mancha central amarela, um anel intermediário laranja e um anel periférico negro. Por outro lado, *P. falkneri* apresenta na superfície do disco dorsal uma coloração de fundo marrom escuro, podendo variar em tons claros com numerosos e pequenos ocelos redondos ou ovais de tons laranja para manchas amarelas, distribuídos por todo o dorso dos animais. Contudo, em coletas realizadas ao longo do Rio Paraná, foram encontrados espécimes com total ausência de ocelos. Diante da história do processo de invasão e colonização conjunta das espécies de raias neste ambiente, foi realizada a análise molecular comparativa para detecção da possível ocorrência de híbridos, com marcadores mitocondriais e nucleares. Os resultados obtidos para os espécimes com ausência de ocelos na região dorsal indicam sua identidade com a espécie *P. motoro*. Porém, outros indivíduos amostrados, identificados com padrão fenotípico de *P. motoro*, apresentaram mtDNA de *P. falkneri* e DNA nuclear de *P. motoro*, confirmando a ocorrência de hibridação entre as duas espécies. Considera-se que os resultados obtidos poderão auxiliar na compreensão dos processos envolvidos na especiação das raias de água-doce e que tais informações poderão ser utilizadas na identificação dos mecanismos determinantes do processo de colonização e do estabelecimento das formas colonizadoras nos componente hidrográficos da Bacia do Rio Paraná.

ABSTRACT

The stingrays Potamotrygonidae family are important components of Neotropical ichthyofauna, being completely restricted to the main river systems of South America four genera are related in that family: *Heliotrygon*, *Paratrygon*, and *Plesiotrygon* *Potamotrygon*. In Paraná River Basin, the species most frequently are *Potamotrygon motoro* and *Potamotrygon falkneri*. Both species occur only in the region of the middle Paraná, downstream of a major natural geographic barrier, the Waterfalls of Seven Falls. However, after the construction of the Itaipu Hydroelectric, many aquatic species colonized the high Paraná, including stingrays, which came to play the role of invasive species. Currently, the lanes are set up in the region Ilha Solteira - SP (high Paraná). Aiming to analyze the process of invasion and colonization of species *Potamotrygon motoro* and *P. falkneri* in the Paraná River Basin were carried out molecular genetic studies using mitochondrial and nuclear genes. The gene Cytochrome Oxidase subunit I (COI) was first developed for molecular identification of species. Gene sequences were subsequently ATPase 6/8, Cyt-B and D-loop control region were obtained for population analyzes. The genetic diversity found for the COI gene between species was 2.0%, considered low when compared to results obtained in other species of fish. In population analyzes in *P. motoro*, diversity intraspecific was very low for all genes with multiple individuals sharing the same haplotype. In *P. falkneri* values were similar to that detected in *P. motoro*, although the values of genetic differentiation elevated but not statistically significant. Diantes results mean that the low genetic differentiation detected for both species under study, may be related to the short time of colonization (under 30) or the fact that the marker is not sensitive enough to detect such genetic differences. With this, it was necessary to search for other markers to check more efficiently the genetic diversity of populations of stingrays of the Paraná River. Through pyrosequencing technology, were developed 10 polymorphic microsatellite markers for the species *P. motoro*, and later held the transferabilidades these loci in the species *P. falkneri*, identified six polymorphic loci. In *P. motoro*, 100 individuals in four populations along the Paraná River were genotyped (Foz do Iguaçu-PR, Porto Maringá-PR, Ilha Solteira – SP (river Paraná) e Três Lagoas – MS (river Sucuriú). The of Foz do Iguaçu showed greater genetic variability when compared with the Ilha Solteira. The average *Fst* in all

populations was 0.05 indicating a low population differentiation. We detected that populations still have high rates of gene flow, without detectable loss of genetic variability, indicating that the species *P. motoro* panmitic is a single unit in the Paraná River Basin. In *P. falkneri*, 77 individuals were genotyped divided into three populations (Porto Camargo - PR, Porto Rico - PR and Ilha Solteira - SP). The indices have revealed that genetic populations colonizing lost genetic variability during the process of invasion. The population of Porto Camargo has higher genetic diversity compared with Ilha Solteira, but with large effective population number, suggesting a population expansion. Both of these species have unique phenotypic characteristics, since *P. motoro* is colored brown or gray with dorsal presence of rows of ocelli tricolor distributed throughout the disk, and these ocelli consist of a small central stain yellow, orange an intermediate ring and a peripheral ring black. *P. falkneri* features on the disc surface dorsal to background color may vary from dark brown tints, with numerous small ocelli (round or oval) distributed throughout the back, tones of orange to yellow spots. However, in samples collected along the Rio Paraná, specimens were found with total absence of ocelli. Given the history of the process of invasion and colonization of species of freshwater stingrays in the Paraná River Basin, we performed comparative molecular analysis to detect possible hybrids with mitochondrial and nuclear markers. The results obtained for specimens with no eyespots in the dorsal region, indicate that actually form part of the species *P. motoro*. But other sampled individuals identified with phenotypic *P. motoro* showed mtDNA of *P. falkneri*, and nuclear DNA of *P. motoro*, confirming the existence of hybrids between the two species. It is considered that the results may help to understand the processes involved in speciation of freshwater stingrays, and such information may be used to identify the mechanisms that determine the process of colonization and the establishment of colonial forms in the Paraná River Basin.

SUMÁRIO

1 Introdução Geral.....	02
1.1 A Família Potamotrygonidae	02
1.2 Uso de Marcadores moleculares em peixes	06
1.2.1 DNA mitocondrial	06
1.2.2 Microsatélites	07
1.2.2.1 Tecnologia do Pirosequenciamento	09
1.3 Espécies invasoras e barreiras biogeográficas.....	11
2 Objetivos	14
3 Materiais e Métodos.....	16
3.1 Materiais.....	17
3.1.1 Área de estudo.....	17
3.1.1.1 Bacia do Rio Paraná.....	17
3.1.1.2 Alterações dos rios causada por hidrelétricas	19
3.1.1.3 Usina Hidrelétrica de Itaipú	20
3.2 Métodos.....	20
3.2.1 Métodos de captura e manuseio	20
3.2.2 Extração do DNA total.....	21
3.2.3 Sequenciamento genômico 454 GS – FLX Roche Titanium.....	22
3.2.4 Obtenção das sequências e arquivos de saídas (<i>output files</i>).....	22
3.2.5 Edição das sequências e confecção de <i>primers</i>	22
3.2.6 Seleção de Marcadores	24
3.2.7 Testando marcadores	24

3.2.8 Análises estatísticas (microsatélites)	25
3.2.9 Amplificação dos genes mitocondriais	26
3.2.10 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose	29
3.2.11 Purificação das amostras amplificadas	29
3.2.12 Reação de sequenciamento	30
3.2.13 Limpeza do PCR de sequenciamento	30
3.2.14 Sequenciamento de DNA.....	31
3.2.15 Análise dos dados mitocondriais	31
3.2.16 Equilíbrio de Hardy-Weinberg	32
3.2.17 Frequências alélicas	32
3.2.18 Análise da estrutura genética populacional.....	33
4 Resultados	34
4.1 Capítulo I - Desenvolvimento de marcadores microsatélites por pirosequenciamento em raias de água doce (<i>Potamotrygon motoro</i>) e sua transferabilidade em <i>P. falkneri</i>	36
4.2 Capítulo II - Recente colonização e dinâmica genética em raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia do Rio Paraná, revelados por marcadores genéticos	47
4.3 Capítulo III - Primeiro registro de hibridação entre espécies de raias água doce <i>Potamotrygon motoro</i> e <i>P. falkneri</i> na Bacia do Rio Paraná, Brasil	72
6 Discussão Geral	83
7 Considerações finais.....	91
8 Referências	94
9 Anexos	116

Introdução

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 A Família Potamotrygonidae

Os Chondrichthyes são peixes caracterizados por apresentarem esqueleto cartilagenoso, estando o grupo atualmente organizado em duas Subclasses: Holocephali que contém as quimeras e Elasmobranchi, formada pelos tubarões e raias (Storer et al. 1991). Dentre os elasmobrânquios, as raias da família Potamotrygonidae (*sensu* Rosa 1985) representam uma importante parte da ictiofauna Neotropical, sendo os únicos componentes deste grupo totalmente restritos ao ambiente dulcícola (Thorson et al. 1978, Compagnon & Cook 1995). Sua classificação taxonômica pode ser descrita como segue:

FILO: Chordata

SUBFILO: Vertebrata

CLASSE: Chondrichthyes

SUBCLASSE: Elasmobranchi

ORDEM: Milyobatiformes

FAMÍLIA: Potamotrygonidae

A família Potamotrygonidae atualmente compreende 26 espécies válidas (Eschmeyer & Fong, 2013) que estão relacionadas nos gêneros *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon* (Rosa 1985, Carvalho et al. 2003, Deynat 2006, Rosa & Carvalho 2007, Rosa et al. 2008, Carvalho & Lovejoy 2011). Estas espécies encontram-se distribuídas nas grandes bacias hidrográficas da América do Sul, incluindo rios da Venezuela, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Colômbia, Peru, Bolívia, Paraguai, Argentina, Uruguai e Brasil (Achenbach & Achenbach 1976, Rosa 1985, Carvalho et al. 2003).

No Brasil, o maior número de espécies conhecidas é encontrado na Bacia Amazônica (cerca de 13 espécies) (Charvet-Almeida et al. 2002). O nordeste do Brasil apresenta registros pontuais de representantes deste grupo, com referências de capturas nos estados do Maranhão e Piauí (Rosa 1985). Nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, a bacia dos rios Paraná-Paraguai abriga cerca de sete

espécies nominais, contudo, considera-se que esse número possa variar devido à possibilidade de existirem espécies sinônimas e/ou outras ainda não descritas (Rosa 1985, Carvalho et al. 2003).

Até o final dos anos 70, a ocorrência de raias no Rio Paraná era assinalada apenas para os trechos situados à jusante das Cachoeiras de Sete-Quedas (Figura 1), uma importante barreira geográfica situada no Município de Guaíra, Estado do Paraná (Vilela et al. 2004). No entanto, com o enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu no ano de 1982, esse obstáculo natural, que isolou por muito tempo a maioria dos componentes da ictiofauna do Alto Rio Paraná da fauna remanescente à jusante, deixou de existir, possibilitando a colonização do trecho situado à montante de Guaíra por espécies antes presentes apenas até o Médio Rio Paraná. Neste novo e extenso ambiente, as raias do gênero *Potamotrygon* e outras espécies antes endêmicas do médio Paraná, passaram a desempenhar o papel de espécies invasoras, provocando impactos de diferentes dimensões sobre a fauna aquática nativa (Agostinho et al. 1992, Vazzoler et al. 1997, Brasil 1998, Britto 2003, Vilela et al. 2004, Makrakis et al. 2011), os quais ainda necessitam ser melhor estudados e dimensionados.

A captura de algumas espécies de raias já foi registrada nas proximidades da Usina Hidrelétrica de Jupiá, na foz do rio Tietê no Estado de São Paulo e nas regiões do baixo Paranapanema (Britto 2004) e no Rio Sucuriú, em localidades próximas aos municípios de Castilho-SP e Três Lagoas-MS (Garrone et al. 2007).

Na Bacia do Rio Paraná, a espécie *Potamotrygon motoro* popularmente conhecida como “arraia-de-fogo” ou “arraia-pintada”, é atualmente considerada a mais abundante e amplamente distribuída. Outra espécie de ocorrência também comum, *P. falkneri*, denominada “Arraia Branca” ou “Arraia Clarinha”, também vem sendo capturada em componentes hidrográficos dos Estados do Paraná, Mato Grosso do Sul (Cândido-Silva 2006) e Estado de São Paulo (Garrone et al. 2007) (Figuras 2 e 3).

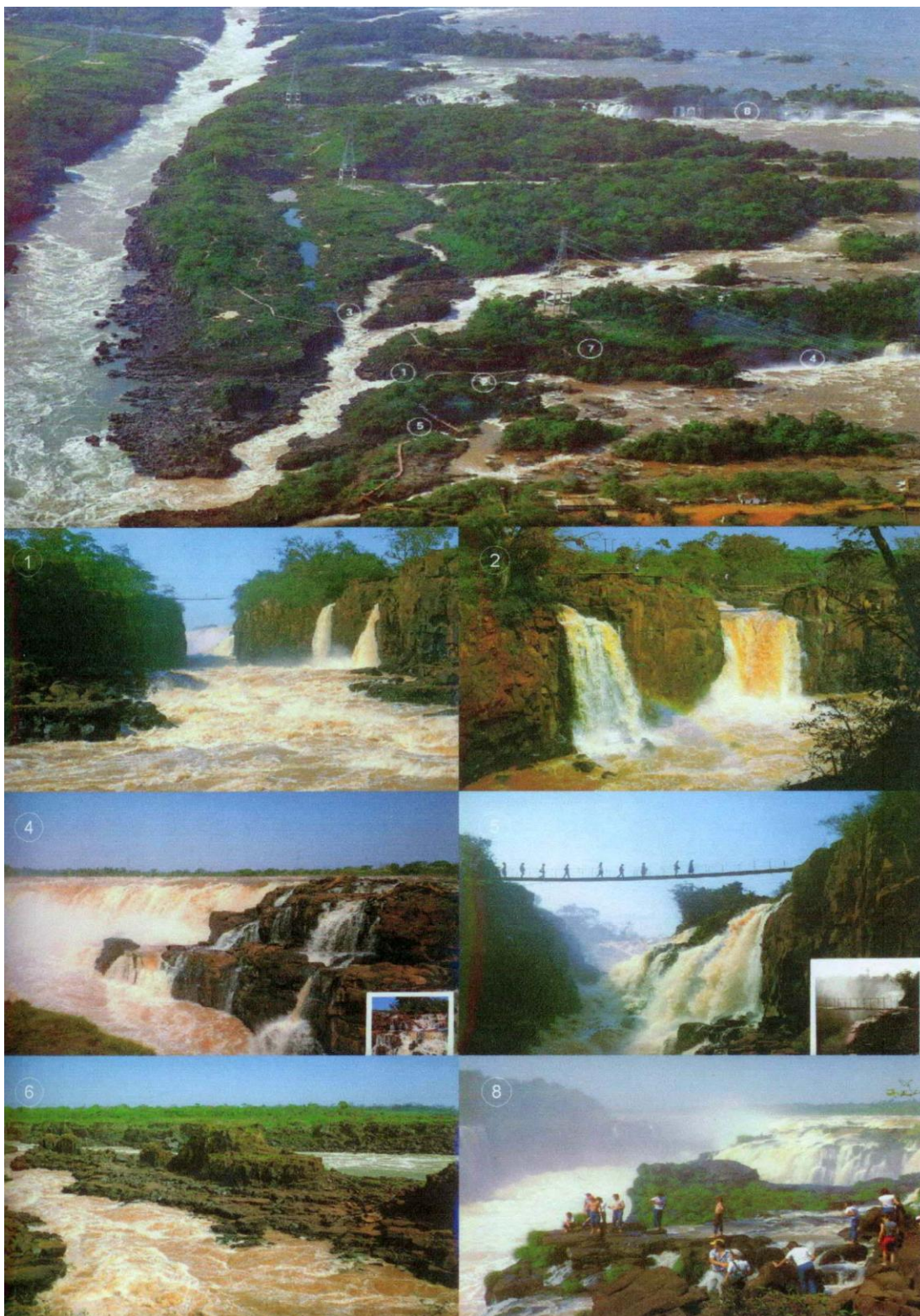


Figura 1. Cachoeiras Sete-Quedas ou Quedas de Guaíra. 1 – Canal do Salto 17; 2 – Saltinho; 4 – Salto Arco-Íris; 5 – Salto 19; 6 – Rio Paraná à jusante das quedas e 8 – Salto 14.
(Imagens cedidas pela Acessoria de Comunicação de Itaipú Binacional).

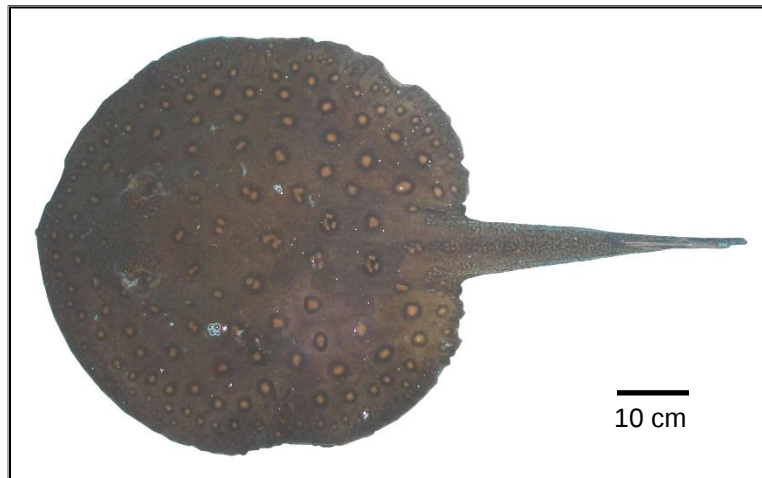


Figura 2 – Foto de exemplar da espécie *Potamotrygon motoro* (fêmea) de ocorrência na bacia hidrográfica do Rio Paraná.



Figura 3 – Foto de exemplar da espécie *Potamotrygon falkneri* (macho) de ocorrência na bacia hidrográfica do Rio Paraná.

1.2 Uso de marcadores moleculares em peixes

1.2.1 DNA mitocondrial

Uma metodologia que tem fornecido bons resultados nas análises de estruturação de populações ou subdivisão populacional e que pode identificar as variações geográficas entre populações é o sequenciamento de DNA mitocondrial (mtDNA). Os fatos que justificam esta afirmação decorrem de que os nucleotídeos são a unidade básica de informação codificada nos organismos, de onde é possível extrair e incorporar informações sobre processos de evolução molecular nas análises, e de que o potencial de informações de dados fornecido é imenso.

Vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de sequências de DNA mitocondrial para elucidar problemas relativos à genética de populações e à sistemática (Bermingham & Martin 1998, Wang et al. 2004, Chen et al. 2008, Lessios 2008, Haney et al. 2010, entre outros). Nos trabalhos publicados no livro de Kocher & Stepien (1997) com estes marcadores moleculares, pode-se observar o versátil emprego das análises moleculares na elaboração de hipóteses de relacionamento em diversos níveis taxonômicos.

O tamanho do genoma mitocondrial nos organismos é bastante variável, apresentando valores desde aproximadamente 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin 1994), sendo representado por 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (RNAt) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP nesta organela celular. Finalmente, o mtDNA possui uma região controle, conhecida como D-loop (*displacement loop*) de cerca de 1kb rica em sequências AT e desprovida de genes codificantes, embora exerça importante papel no início da replicação do mtDNA e da subsequente transcrição em RNA.

O gene mitocondrial Citocromo Oxidase C, subunidade I (COI) tem sido utilizado eficientemente na discriminação de espécies e na construção de um banco de dados identificado como código de barras de DNA (*DNA Barcoding*), com o objetivo de identificar e catalogar espécies pela sua respectiva sequência *barcode* (Hebert et al. 2003). As vantagens na utilização do COI são a presença de uma sequência conservada que facilita a utilização de *primers* universais (Hebert et al. 2003).

A metodologia do DNA Barcode, segundo seus idealizadores, é uma forma rápida, eficiente e de acesso global na delimitação e identificação de novas espécies (Hebert et al. 2003) e esta metodologia está baseada na premissa de que a diversidade interespecífica é sempre maior do que a diversidade intra-específica. Hebert et al. (2004) propuseram um limiar de identificação, em que espécies diferentes devem apresentar a diversidade interespecífica 10 vezes maior do que a diversidade intraespecífica.

Outras regiões do mtDNA comumente utilizadas em estudos genético-ecológicos são as que codificam os genes Citocromo B (Cyt b) e ATPase 8/6. O gene Cyt b contém sinais filogenéticos em vários níveis taxonômicos, inclusive em peixes (Kocher & White 1989, Meyer et al. 1990, Martin et al. 1992, Cantatore et al. 1994, García et al. 2000, Avise 2004, Chen et al. 2008, Lessios 2008, Haney et al. 2010, Plank et al. 2010, Cooke et al. 2011, entre outros), sendo muito utilizado para o cálculo de relógio molecular, estimando a cronologia dos eventos cladogenéticos que promoveram o processo de diversificação e a especiação (Meyer et al. 1990, et al. 1991, Smith & Patton 1993, Avise 2004).

O interesse no estudo do mtDNA tem por base o fato de que este genoma apresenta uma série de particularidades importantes como sua herança exclusivamente materna, sendo um marcador matrilinear, além disso, este elemento genético possui um genoma compacto, com estrutura e organização simples, ausência de íntrons, pseudogenes e elementos transponíveis, com uma alta taxa de evolução (Lewin 1994).

1.2.2 Microssatélites

Os marcadores isoenzimáticos tiveram grande aplicação nos estudos de genética de populações; contudo, a disponibilidade de um número limitado de *loci* polimórficos relacionados a estas características tornou o uso destes marcadores relativamente restrito. Posteriormente, novos procedimentos de identificação de marcadores foram desenvolvidos, com a possibilidade da utilização de um número de alelos significativamente maior.

Entre essas técnicas de estudos moleculares, a análise de RAPD, que identifica polimorfismos de DNA amplificados ao acaso, também foi inicialmente utilizada com grande sucesso

no estudo de genética de populações de peixes (Nilsson & Schmitz 1995, Caccone et al. 1997, Dergan et al. 1998, Wasko 2000, Revaldaves 2001, Leuzzi et al. 2004, Hatanaka 2006, Oliveira et al. 2006, entre outros).

Outra técnica que tem sido muito utilizada para estudos populacionais são os marcadores do tipo microssatélite. O termo microssatélite refere-se a uma classe de marcadores de DNA co-dominantes que possui padrão de herança mendeliana, composta de sequências de 1 a 6 bases repetidas em tandem e que estão presentes em organismos procariotos e eucariotos, em menor ou maior abundância, podendo ser encontradas em regiões codificantes e não codificantes do genoma (Chambers & Macavoy 2000, DeWoody & Avise 2000).

Os microssatélites têm mostrado ser uma ferramenta extremamente vantajosa para o mapeamento do genoma de muitos organismos (Schuler et al. 1996). Por conta disso, suas aplicações se estendem por diferentes áreas de investigação como em estudos forenses, de paternidade, na genética de populações, bem como na conservação e manejo de recursos biológicos (Jarne & Lagoda 1996). Estas regiões genômicas são caracterizadas por uma elevada taxa de polimorfismo, representada pela taxa de mutação estimada em 10^2 a 10^3 por *loci*, por gameta, por geração (Goldstein et al. 1999). Este polimorfismo tem como consequência a geração de alelos polimórficos que podem ser utilizados em uma variedade de estudos genético-populacionais (Goldstein et al. 1999).

A grande aplicabilidade dos microssatélites em peixes pode ser evidenciada primeiramente pela quantidade de artigos disponíveis na literatura referentes ao isolamento e caracterização desses marcadores entre os representantes deste grupo (e.g. Lee & Kocher 1996, O'Connell et al. 1998, Krieg et al. 1999, Taylo et al. 2002, Kamonrat et al. 2002, Palti et al. 2002, Strecker et al. 2003, Pardo et al. 2007, Martinez et al. 2007, Gomes et al. 2011, Olivatti et al. 2011).

Tradicionalmente, a estratégia de desenvolvimento de *primers* microssatélites envolve a construção de uma biblioteca genômica, hibridização com sondas contendo microssatélites, sequenciamento dos clones hibridizados e desenho de *primers* flanqueando os microssatélites encontrados. No entanto, a etapa de seleção é trabalhosa e demorada (Caixeta et al. 2009), com uma taxa de sucesso que pode variar de 12% a menos de 0,04% do total de clones analisados (Zane et al. 2002).

Uma das metodologias alternativas envolve a construção e utilização de bibliotecas genômicas enriquecidas com *motifs* SSR, como inicialmente proposto por Ostrander et al. (1992). Esta estratégia consiste na digestão do DNA genômico usando uma combinação de enzimas de restrição, a seleção de fragmentos de tamanhos desejáveis e a ligação dos fragmentos digeridos a um adaptador. Segue-se, então, à ocorrência de hibridização seletiva dos fragmentos com sondas marcadas com biotina ou sondas aderidas a uma membrana de náilon, podendo a recuperação dos fragmentos hibridizados ser feita usando partículas magnéticas cobertas com estreptoavidina, que são então submetidas a várias lavagens para eluir o DNA associado à sonda (Hamilton et al. 1999). Esta metodologia envolve um número de etapas relativamente grande; no entanto, o sucesso de seleção de clones contendo microssatélites é bem maior do que aquele obtido pela técnica tradicional, sendo a eficiência de clones positivos identificados na ordem de 40 a 50% do total.

É possível também identificar microssatélites por meio de novas tecnologias de sequenciamento, denominadas de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS), que começaram a ser comercializadas a partir de 2005 e sua aplicação vem evoluindo rapidamente. Estas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informações sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, sendo o pirosequenciamento uma das técnicas de NGS mais populares e acessíveis até o momento. Entre os Chondrichthyes, poucos estudos já utilizaram tecnologias de sequenciamento de nova geração (pirosequenciamento) para a prospecção de marcadores microssatélites (Boomer et al. 2010, Chabot et al. 2011, Kang et al. 2012).

1.2.2.1 Tecnologia de Pirosequenciamento

A necessidade atual pela redução do custo de bases sequenciadas, juntamente com a demanda de um maior número de dados em curto espaço de tempo, propiciaram o desenvolvimento de novas tecnologias capazes de suprir parcialmente tais exigências. Apesar da grande evolução na técnica de Sanger originalmente proposta há mais de 30 anos (1978), ainda há limitações no custo e velocidade de sequenciamento do DNA, tornando-se cada vez menos compatível às atuais necessidades. Desta forma, a utilização de técnicas modernas como sequenciamento de nova geração

(NGS) aplicadas à investigação da diversidade genética, proporciona a possibilidade da análise de amostragem muito maior que as abordagens tradicionais, permitindo identificar espécies pouco frequentes, mas que podem ter importância crucial para a manutenção do ambiente.

Entre os sequenciamentos de nova geração utilizados até o presente momento, apenas a técnica de pirosequenciamento (Ronaghi et al. 1996) foi realmente empregada em maior escala para análise da diversidade genética de muitos organismos, tais como em anfíbios (Nair et al. 2011), artrópodes (Pauchet et al. 2009, Rasmussen & Noor 2009, Zhang et al. 2010), aves (Abdelkrim et al. 2009, Allentoft et al. 2009, Lerner & Fleischer 2010), fungos (Santana et al. 2009, Magain et al. 2010), mamíferos (Vanpe et al. 2009, Michelizzi et al. 2010), peixes (Johansen et al. 2009, Boomer & Stow 2010, Dubut et al. 2010, Saarinen & Austin 2010, Chabot et al. 2011, Kang et al. 2012) e répteis (Castoe et al. 2010).

As reações de pirosequenciamento ocorrem em uma sequência planejada e são coordenadas pelas enzimas DNA polimerase, Sulfurilase ATP, Luciferase e Apirase. A sequência de nucleotídeos pode ser identificada devido ao fato de que as classes dos mesmos são adicionadas e testadas individualmente, mediante a polimerização e liberação de um pirofosfato inorgânico (PPi). Os sinais e sua intensidade são captados por uma câmera CCD e indicam que determinado nucleotídeo do fluxo emitido foi incorporado à cadeia de DNA. Estes processos devem ser muito bem coordenados, sendo adicionados e liberados elementos em quantidades molares, específica de cada um dos reagentes e enzimas (Agah et al. 2004). A emissão de luz é detectada e registrada na forma de um pico denominado pirograma, o qual é diretamente proporcional ao número de nucleotídeos incorporados na sequência. Pode-se resumir a tecnologia de pirosequenciamento como uma técnica que se baseia nos métodos de sequenciamento por detecção do pirofosfato luminométrico, produzido pela incorporação de nucleotídeos na reação (Ronaghi et al. 1998).

A maior vantagem da utilização do pirosequenciamento em relação ao método de Sanger é decorrente do fato de não ser necessária a clonagem do fragmento a ser sequenciado, reduzindo uma etapa dispendiosa em tempo e recursos financeiros, uma vez que a técnica tem como vantagem a precisão, flexibilidade e pode ser facilmente automatizada (Ronaghi 2001). Algumas críticas surgiram em relação ao tamanho dos fragmentos sequenciados, uma vez que no sistema

Titanium obtém-se sequências de até 500 pb, sendo este o mesmo sistema utilizado neste trabalho. Apesar desta polêmica, contudo, atualmente é reconhecido o fato de que a técnica de pirosequenciamento pode ser amplamente aplicada, sendo uma alternativa para o desenvolvimentos de muitos marcadores moleculares (Ronaghi 2001).

1.3 Espécies invasoras e barreiras biogeográficas

Espécies não-nativas têm sido introduzidas em novos ecossistemas através de atividade humana de forma deliberada ou acidental (Agostinho et al 1992, Agostinho et al. 1994, Vitousek et al. 1997, Koo & Mattson 2004). Uma série de fatores que operam em diferentes escalas espaciais e temporais determina as espécies capazes de colonizar e persistir em distintos habitats. Entre os fatores importantes que atuam na separação de organismos de água-doce estão as barreiras naturais como cordilheiras e grandes cachoeiras, que muitas vezes podem impedir o intercâmbio de espécies entre as regiões. Essas barreiras naturais são denominadas barreiras biogeográficas e os termos utilizados no presente estudo estão relacionados na Tabela 1, de acordo com Gozlan et al. 2010.

Tabela 1. Termos e definições baseados em estudos ecológicos em peixes invasores. Definições segundo Gozlan et al. 2010.

Termo	Definição
Nativa	Uma espécie que ocorre naturalmente em um local específico (ex. rios, lagos, poças, etc.).
Não - nativa (exótica)	Espécie introduzida fora de sua área de distribuição natural.
Introdução	A liberação na natureza, de forma acidental ou não, de uma espécie em um local não – nativo.
Estabelecimento	O processo pelo qual uma espécie introduzida reproduz formas de auto-sustentação, ou seja, não depende de mais indivíduos introdutórios para seu sucesso colonizador.
Dispersão	A distribuição natural de uma espécie a partir do seu ponto de introdução.
Colonização	A dispersão natural de uma população estabelecida, resultando em sua expansão populacional.
Invasão	O processo pelo qual uma espécie introduzida estabelece populações e espalha-se rapidamente, podendo apresentar um risco para as espécies nativas

Historicamente, as barreiras foram um fator dominante na determinação e composição de faunas regionais, atuando na promoção do endemismo (Cox & Moore 1980, Ricklefs & Schluter, 1993). No entanto, as ações humanas têm reduzido o isolamento anteriormente imposto pelas barreiras naturais e o resultado tem sido uma mistura sem precedentes de comunidades biológicas (Lockwood & McKinney 2001, Rahel 2002, McKinney 2006). Muito tem sido escrito sobre a perda ou ligação de conectividade em ecossistemas aquáticos, devido à construção de barragens e diques (Pringle 2003) e, dependendo da sua ação no ecossistema, pode impedir migrações sazonais e reduzir a diversidade e produtividade de habitats aquáticos.

Tudo isso pode afetar de forma drástica uma população colonizadora, principalmente aquelas de tamanho reduzido, nas quais estes efeitos são sentidos mais rapidamente, diminuindo sua adaptabilidade e reduzindo seu potencial evolutivo (Neraas & Spruell 2001, Jager et al. 2001, Morita & Yokota 2002, Fagan et al. 2002, 2005). As barragens podem afetar o tamanho das populações, interromper o fluxo gênico entre populações, reduzir a diversidade genética e aumentar a diferença genética entre populações isoladas e/ou colonizadoras (Jager et al. 2001, Neraas & Spruell 2001, Meldgaard et al. 2003, Yamamoto et al. 2004, Heggenes & Roed 2006).

Segundo Frankham et al. (2004), quando uma população é fragmentada e seu tamanho é reduzido, a perda de diversidade genética ocorre como consequência. Ainda segundo o mesmo autor, quando o tamanho da população é reduzido, a taxa de endocruzamento é aumentada e o desempenho reprodutivo é diminuído. Em consequência, a população se torna mais vulnerável aos efeitos da deriva e à perda de alelos, já que diminui a probabilidade de alelos raros serem transmitidos, ocorrendo redução da heterozigosidade.

Invasões biológicas são uma das mais graves ameaças aos ecossistemas de água doce (Copp et al. 2005, Dudgeon et al. 2006, Ricciardi 2007), mas também representam uma oportunidade única para cientistas testarem teorias relacionadas com a colonização de espécies e com os processos envolvidos na sua adaptação aos novos ambientes (Lodge 1993, Hochberg & Gotelli 2005, Novak 2007, Sax et al. 2007). Portanto, o desenvolvimento de métodos quantitativos para a compreensão ecológica e evolutiva de tais eventos, bem como as causas e consequências das invasões, são de importância fundamental (Sax et al. 2007). Recentes avanços de técnicas moleculares tais como os

sequenciamentos de nova geração ou a obtenção de valores da expressão gênica, acoplados a uma diminuição do custo de metodologias mais clássicas, contribuíram largamente para a versatilidade dos estudos nesta área (DeYoung & Honeycutt 2005, Selkoe & Toonen 2006, Bonneaud et al. 2008, Ellegren & Sheldon 2008).

Deste modo, revisões recentes têm enfatizado a utilidade das ferramentas moleculares para responder a questões específicas relacionadas com as fontes e processos de colonização, adaptabilidade fenotípica, hibridizações e entendimento do sucesso no estabelecimento de espécies não-nativas (Hanfling 2007, Miura 2007, Estoup & Guillemaud 2010, Geller et al. 2010, Blanchet 2012). Assim, com base nos efeitos negativos que podem ser causados às populações invasoras pela construção de hidrelétricas e tendo em vista a importância do conhecimento genético das populações colonizadoras, este estudo busca identificar padrões gerais de impacto sobre a variabilidade e estrutura genética em espécies de raias de água doce *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* ao longo do Rio Paraná.

Objetivos

2 OBJETIVOS

Considerando-se a relativa insuficiência de dados moleculares no que se refere aos representantes da família Potamotrygonidae, o presente trabalho abordou questões básicas sobre dados moleculares das espécies deste grupo, sendo tais informações úteis para o entendimento da dinâmica das populações colonizadoras da Bacia do Rio Paraná. Os marcadores moleculares (mtDNA e microssatélites) foram empregados no monitoramento do processo de migração, com a identificação molecular das populações, a caracterização dos padrões de diversidade genética dos estoques naturais e o entendimento da dinâmica do processo de colonização estabelecido por estas espécies. De modo específico, este trabalho teve como objetivos:

- a. caracterizar os estoques e determinar os padrões genético-populacionais de raias de água-doce de diferentes localidades da bacia do Rio Paraná;
- b. identificar o número de haplótipos e genótipos que formam os estoques no ecossistema estudado, com a finalidade de caracterizar a variabilidade e diversidade genética intra e entre as populações;
- c. desenvolver marcadores moleculares eficientes para estudos genéticos no grupo, para possível utilização em outras espécies relacionadas (e em larga escala);
- d. identificar os haplótipos (mtDNA) e genótipos (microssatélites) que possam caracterizar os estoques colonizadores no ecossistema estudado, com a finalidade de estabelecer os mecanismos determinantes da variabilidade genética entre as populações e sugerir hipóteses sobre o processo de colonização utilizado por estas espécies.

Materias e ***M***étodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Foram estudados exemplares de raias das espécies *Potamotrygon motoro* (Müller & Henle 1841) e *P. falkneri* (Castex & Maciel 1963), capturados nos componentes da bacia hidrográfica do Rio Paraná. As localidades de coleta e número de exemplares analisados são mostrados na Tabela 2. Alguns exemplares foram fixados em formol a 10% e posteriormente conservados em álcool etílico a 70%, identificados pela especialista Patícia Charvet-Almeida e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LPB), Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Tabela 2 - Espécies do gênero *Potamotrygon* utilizadas no presente estudo e locais de coleta.

Espécie	Lote	N amostral	Localidade	Coordenadas
<i>P. motoro</i>	LBP 5203	22	Rio Sucuriú, Três Lagoas – MS	S 27° 37'42.4" W 53° 50'07.7"
	LBP 6716			
	LBP 7503	45	Rio Paraná, Ilha Solteira – SP	S 20° 21'03.4" W 51° 20'33"
	LBP 5102	21	Rio Paraná, Porto Maringá - PR	S 22°38'56.91" W 53°04'52.15"
	LBP 8520	54	Rio Paraná, Foz do Iguaçu - PR	S 25°24'3.37" W 54°32'.41"
<i>P. falkneri</i>	LBP 7503	52	Rio Paraná, Ilha Solteira – SP	S 20° 21'03.4" W 51° 20'33"
	LBP 5102	18	Rio Paraná, Porto Rico– PR	S 22°47'01.31" W 53°21'45.52"
	LBP 5202	22	Rio Paraná, Porto Camargo – PR	S 22° 47'42.4" W 53° 20'29.7"
	LBP 6717			

3.1.1 Área de estudo

3.1.1.1 Bacia do Rio Paraná

A Bacia do Rio da Paraná (Figura 4) abrange uma área de 3,1 milhões de km², equivalente a 17% da superfície da América do Sul, sendo a segunda maior bacia hidrográfica deste continente, atrás apenas da bacia amazônica, com cerca de 7 milhões de km² (CIC – Comité Intergubernamental Coordinador de los Países de la Cuenca del Plata, 2004).

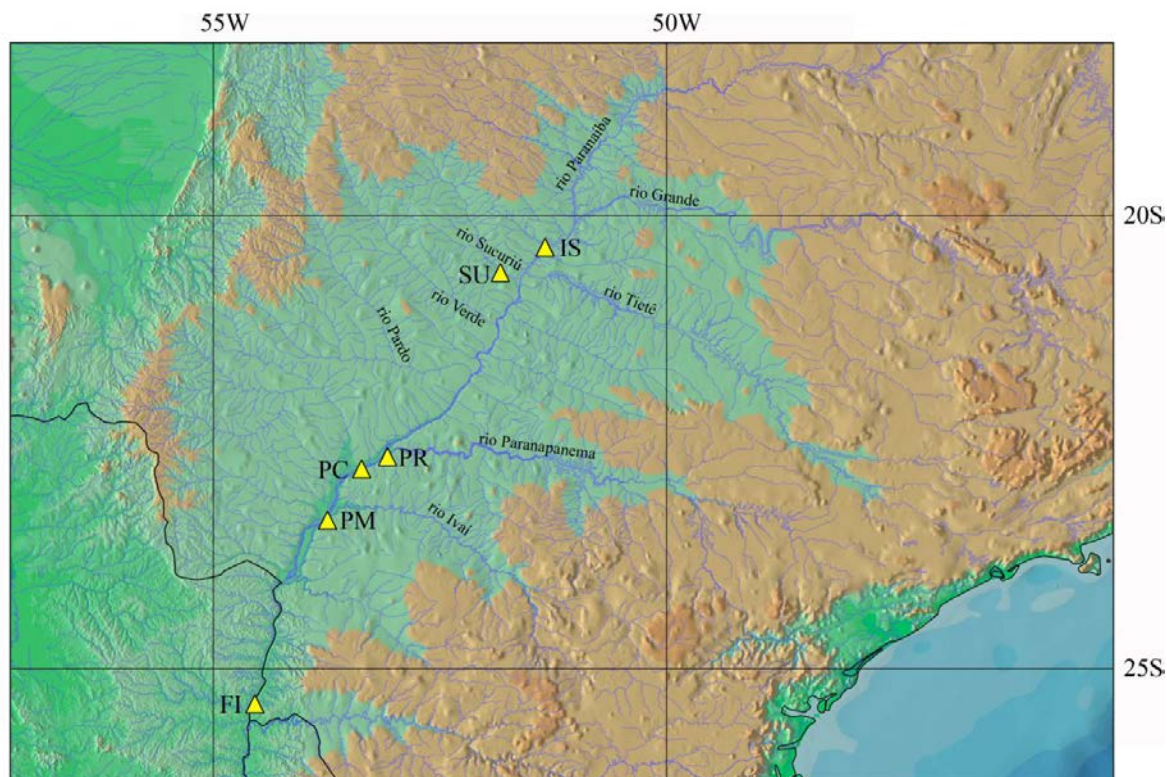


Figura 4 - Mapa hidrográfico da região Sul/Sudeste do Brasil. Em destaque a identificação dos pontos amostrados ao longo do Rio Paraná: Foz do Iguaçu (FI), Porto Maringá (PM), Porto Camargo (PC), Porto Rico (PR) e Ilha Solteira (IS), ao longo do Rio Paraná. E no rio Sucuriú (SU), próximo a Três Lagoas (MS).

Este sistema hidrográfico abrange os territórios de cinco países, incluindo Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. A maior parte da área da bacia se encontra no território brasileiro, totalizando 1.415.000 km², seguido por Argentina (920.000 km²), Paraguai (410.000 km²), Bolívia (205.000 km²) e Uruguai (150.000 km²). O principal rio da Bacia do Prata é o Paraná, com 3.780 km, acompanhado de seus maiores afluentes que são o Rio Paraguai, com 2.620 km e o Rio Uruguai, com 1.600 km. O Rio Paraná se torna Rio da Prata ao receber o Rio Uruguai, pouco antes de desembocar no Oceano Atlântico. (ANA – Agência Nacional de Águas 2001). Outros importantes rios da Bacia do Prata são o Bermejo, o Pilcomaio e o Salado, que, juntamente com o Rio Paraguai, formam a vertente ocidental da Bacia (Fonseca 1997).

O potencial hidrelétrico da Bacia é de 60 a 70 milhões de kW e seus principais rios e afluentes proporcionam 15 mil quilômetros de vias navegáveis, constituindo a única saída natural para

o mar para Bolívia e Paraguai, pelo Oceano Atlântico, bem como para importantes regiões do Brasil e da Argentina (Schilling 1981).

3.1.1.2 Alterações nos rios causadas por barragens de hidrelétricas

Estudos com salmonídeos mostram que não só as barragens propriamente ditas, mas também os reservatórios podem se tornar barreiras para determinadas espécies (Clarke et al. 2007). Analisando a composição química da água em diferentes partes do rio e comparando com a composição química dos otólitos de diversos indivíduos, os autores revelaram que a espécie em estudo não se movia para dentro de um reservatório recentemente inundado e que este havia se tornado uma barreira, interrompendo a interconectividade do sistema e fragmentando a população pré-existente no curso d'água. Além de afetar diretamente o ecossistema, o ambiente do entorno também pode sofrer mudanças. Áreas de várzeas marginais periodicamente inundáveis podem sofrer períodos de seca extensos determinados pelo controle do fluxo nas usinas, afetando diretamente as comunidades de peixes e de outros grupos de vertebrados e invertebrados que habitam estes ambientes (Pompeu & Godinho 2006), uma vez que os períodos de enchente dos rios podem ser alterados, afetando espécies cujos processos biológicos estão fortemente ligados à sua sazonalidade (Agostinho et al. 2004).

Um dos maiores impactos causados pelas usinas ocorre principalmente no trecho a montante, com transformação dos rios em grandes lagos, modificando as condições naturais do ecossistema e, quando em associação com despejos e cargas de resíduos decorrentes da ação humana, tornam os mesmos eutrofizados, criando condições aquáticas inadequadas como a proliferação de algas, geração de gases e toxicidade na água, que variam de acordo com o rio (Agostinho et al. 2004). Além disso, deve-se ressaltar que os reservatório tendem a ser assoridos, o que pode criar condições novas de inundações no seu trecho superior.

A jusante dos aproveitamentos, dependendo da configuração dos extravasores, a qualidade da água pode ser ruim, a medida que retira vazão com concentrações baixas de oxigênio. Adicionalmente existe a tendência de modificação dos leitos dos rios em função da operação adotada pela usina, com efeito sobre a flora e a fauna do trecho à jusante.

3.1.1.3 Usina Hidrelétrica de Itaipu

O reservatório de Itaipu corresponde ao segmento do médio Rio Paraná na fronteira Brasil-Paraguai que passou a ter continuidade com o alto Rio Paraná depois da formação do lago e consequente sobreposição das Cachoeiras de Sete-Quedas. Esse trecho situa-se entre a foz do Rio Piquiri e a do Rio Iguaçu no Estado do Paraná, respectivamente nos municípios de Guaíra e de Foz do Iguaçu (Figura 5).



Figura 5 – Imagens da região alagada de Guaíra (PR) durante o processo de construção da represa. a – Leito original do Rio Paraná. b – O Rio Paraná passa a correr pelo canal de desvio. c – Vista aérea atual da UHE Itaipú, na divisa entre Brasil e Paraguai. *(Imagens cedidas pela Acessoria de Comunicação de Itaipu Binacional).*

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Métodos de captura e manuseio

As espécies foram coletadas utilizando físga (arpão), espinhel e tarrafa. A pesca com arpão só é possível em ambientes rasos e com elevada transparência. A falta de resultados na captura de Potamotrygonidae com redes de espera pode ser explicada em parte pela forma do corpo dos indivíduos. O formato discóide, com amplas expansões laterais, dificulta ou impede a passagem do animal pela malha. Além disto, estas raias têm potencial para realizar movimentos laterais sobre um eixo vertical quando tocam uma rede, o que pode facilitar a fuga de artefatos comuns de pesca.

Após serem coletados (234 indivíduos), foram retiradas amostras de fígado e de tercido muscular dos exemplares usados nos estudos moleculares. Alguns espécimes foram fixados em formol a 10% e posteriormente conservados em etanol 70%, identificados pela especialista Patrícia Charvet-

Almeida e depositados no museu do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), UNESP, Botucatu, SP.

3.2.2 Extração do DNA total

O DNA total foi extraído com a utilização de kit da DNeasy Tissue (Qiagen), de acordo com o protocolo a seguir:

1. cortar um pedaço de tecido (pesando entre 10 e 15 mg);
2. colocar o tecido em um tubo de 1.5ml contendo 200µl de “ATL” e 15µl de Proteinase K;
3. colocar o tubo em banho-maria a 55°C por 1 hora ou mais, até que a proteína tenha digerido todo o tecido;
4. adicionar 200µl de “AL” ao tubo e colocar em outro banho-maria a 70°C por 10 minutos, com agitação dos tubos no vórtex a cada 4 minutos;
5. após os 10 minutos, adicionar ao tubo 200µl de etanol 98%, misturar (vórtex) e transferir o líquido para a “coluna de Qiagen”;
6. centrifugar a 6000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
7. descartar o líquido juntamente com o tubo coletor;
8. colocar um novo tubo coletor e adicionar a coluna 500µl de “AW1”;
9. centrifugar a 6000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
10. descartar o líquido juntamente com o tubo coletor;
11. colocar um novo tubo coletor e adicionar a coluna 500µl de “AW2”;
12. centrifugar a 13000rpm por 3 minutos a temperatura ambiente;
13. descartar o líquido juntamente com o tubo coletor, colocar a coluna em um tubo de 1.5ml;
14. adicionar a coluna 250µl de “AE” (tampão para preservar o DNA);
15. centrifugar a 6000rpm por 1 minuto a temperatura ambiente;
16. descartar a coluna;
17. aliquotar 100µl de DNA e guardar na geladeira (-4°C, solução de trabalho), o restante do DNA guardar no freezer (-20°C, solução estoque);
18. preparar um gel de agarose a 1% para quantificar e verificar a integridade do DNA.

3.2.3 Sequenciamento genômico 454 GS-FLX Roche Titanium

O fluxo do sistema *Genome Sequencer FLX Titanium* se baseia em cinco etapas, que podem ser descritas resumidamente, do seguinte modo:

1. *Fragmentação da amostra*: a amostra de DNA genômico é fracionada em fragmentos de 300 a 800 pares de bases (pb) por meio de nebulização.
2. *Preparação da biblioteca*: pequenos adaptadores (A e B) específicos são ligados nas extremidades 3' e 5' dos fragmentos.
3. *Um fragmento = um bead*: cada fragmento de DNA único da biblioteca é imobilizado em um *bead*, a amostra é então purificada gerando micro reatores únicos onde cada *bead* representa uma sequência única da biblioteca.
4. *PCR de emulsão*: cada fragmento único ligado a um *bead* é amplificado, excluindo sequências competidoras e contaminantes, gerando cada micro reator único a ligação com vários milhões de sequências idênticas.
5. *Um bead = um read*: os *beads* carregando sequências únicas são então adicionados em uma placa *PicoTiter* permite a inserção de somente um *bead*. Por fim a placa é carregada no aparelho GS FLX e a leitura é feita por sinais quimioluminescência registrados em uma câmera acoplada ao equipamento.

3.2.4 Obtenção das sequências e arquivos de saídas (*output files*)

No processo de sequenciamento pela tecnologia de pirosequenciamento, os sinais quimioluminescentes são registrados individualmente para cada sequência na câmera acoplada ao equipamento durante todo o processo. Ao final, estes dados são processados por um programa específico do equipamento, a qual, a partir dos sinais brutos obtidos, gera arquivos de *flowgrams* e *basecalls* contendo a identidade e a qualidade de cada base e em cada read – estes arquivos possuem a extensão *.fn e *.qual.

Um processamento posterior visa vincular a identidade à qualidade de cada base em um único arquivo, gerando arquivos *.sff. O Serviço de sequenciamento contratado neste projeto junto à 454 GS-FLX Roche (Instituto Agrobiotecnológico de Rosário / INDEAR, Argentina) disponibilizou

os arquivos na extensão *.fn *.qual e *.sff para o *pool* de amostras submetidas ao sequenciamento (DNA genômico).

3.2.5 Edição das sequências e confecção de *primers*

O Batch *Primer3* é um programa online que pode ser acessado na página <http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/>, para fazer buscas de sequências microssatélite e, simultaneamente, desenhar *primers* de acordo com cada *loci*. Este programa analisa a possibilidade de formação de heterodímeros entre os *primers reverse* e *forward*, identifica a existência de autocomplementariedade e formação de homodímeros e ainda identifica a possível formação de estruturas secundárias (*hairpin*) durante a futura reação de PCR por meio de padrões termodinâmicos pré-estabelecidos. O programa considera os seguintes fatores:

- a) Estabilidade do pentâmero 3' – é um valor limite de estabelecimento para os cinco últimos nucleotídeos do terminal 3'. *Primers* com o valor ES de energia livre (G) do pentâmero menor es do que -8,5 Kcal/mol apresentam uma tendência de pareamento em regiões inespecíficas e são mais prováveis de formar estruturas em grampo e dímeros com ele mesmo.
- b) Sequência 3' única de 7 bases – este critério limita o pareamento inespecífico; usando este critério, qualquer *primer* que não apresente uma sequência específica de 7 bases ou superior que seja exatamente complementar ao sítio de anelamento é eliminado.
- c) Formação de dímeros – este critério limita no valor 2 a 3 o número de pares de bases que o dímero pode conter.
- d) Formação de estruturas em grampo – este critério limita no valor 2 o número de pares de bases que a estrutura pode conter.
- e) Formação de fita dupla próximo à extremidade 3' – este critério elimina *primers* candidatos que apresentem qualquer dímero ou estrutura em grampo a uma distância de 8 pares de base da extremidade 3'.

3.2.6 Seleção de Marcadores

Para evitar a concepção de *primers* duplicados para o mesmo *loci*, todas as sequências de microssatélites selecionadas pelo programa BatchPrimer3 (You et al. 2008) foram agrupadas e alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al. 1997), para identificar possíveis sequências redundantes. Microssatélites com uma boa probabilidade de amplificação (grau de confiança) foram identificados de acordo com os seguintes critérios: para repetições de dinucleotídeos (número mínimo de repetição (nmr) = 8); trinucleotídeos (nmr = 5); tetranucleotídeo (nmr = 4); pentanucleotídeos (nmr = 4) e hexanucleotídeos (nmr = 3).

Os *primers* foram desenhados pelo programa PRIMER 3.0 (Rozen & Skaletsky 2000) com base nos seguintes critérios: tamanho ótimo de *primer* de 20 pb (min = 18, max = 22 pb), temperatura ideal de anelamento 60 ° C (min = 55 ° C, max = 63 ° C), quantidade de GC ótimo de 60% (min = 40%, max = 80%) e o tamanho do produto amplificado variando de 50-450 bp. As cores dos fluorocromos utilizados foram definidas de acordo com os tamanhos dos fragmentos dos microssatélites, de modo que *loci* de diferentes tamanhos poderiam ser marcados com o mesmo fluorocromo, para a adaptação da técnica de PCR-multiplex.

3.2.7 Testando marcadores

Os *primers* foram sintetizados com fluorocromos FAM (azul), NED (amarelo), PET (vermelho) e VIC (verde). Cada conjunto de *primers* foi inicialmente avaliado utilizando amostras de DNA a partir de 5 indivíduos. Para a reação em cadeia de polimerase (PCR) foi utilizado o termociclador Applied Biosystems (Veriti, Thermal Cycler), nas seguintes condições: desnaturação inicial de 4 min a 94°C; 34 ciclos de 94°C por 15 s; temperatura de anelamento específica de cada *primer* por 25 s, 72°C por 25 s, e extensão final de 10 min a 72°C. O volume total da reação de PCR foi de 12,5µl e consistiu de: 1X Tampão, 1,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 0,5 unidades de polimerase de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 1,0 pmol de cada um dos *primers* (Schuelke 2000) e 30ng de DNA. Os produtos de PCR foram visualizados com controle negativo e positivo por eletroforese no gel de agarose a 2%. Os *loci* que produziram bandas de tamanho esperado foram

selecionados e analisados no sequenciador ABI 3730 XL (Universidad de Santiago de Compostela - Lugo, Espanha).

Após a identificação dos *loci* polimórficos, foram testadas as PCRs multiplex com as mesmas amostras anteriormente utilizadas e normalizadas para uma concentração de 5ng/μl usando o Type Master Mix PCR (Qiagen). As PCRs multiplex foram adaptadas com de 2μl de DNA, 2μl do mix de *primers* (cada *primer* de 2μl em TE pH 8,0), 10μl de Type Master Mix. O programa utilizado para a amplificação da PCR multiplex foi: desnaturação de 5 min a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 57°C e 30 s a 72°C e, finalmente, extensão final de 30 min a 60°C. Os picos obtidos a partir de reações multiplex foram verificados se correspondiam aos de um único *loci* no sequenciador Applied Biosystems (ABI) 3730 XL. A transferabilidade dos *loci* de *Potamotrygon motoro* foi testada para a espécie *P. falkneri*, sendo utilizada amostra de 20 indivíduos coletados no Rio Paraná, região de Porto Rico / PR, seguindo o mesmo protocolo de PCR anteriormente descrito para *P. motoro*.

Os tamanhos dos alelos em ambas as espécies foram determinadas usando o 500 LIZ (Applied Biosystems) como padrão interno e para estimar o tamanho do alelo foi utilizado o programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems).

3.2.8 Análises estatísticas (microssatélites)

Para a construção e exportação das matrizes utilizadas em outros programas e as estimativas de alelos privados foi utilizado o software GENALEX 6.1 (Peakall & Smouse 2006). Os valores de Heterozigosidade esperada e observada (H_e , H_o), índice de fixação F_{IS} (Wright 1951) e teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (valor de significância $P < 0,05$) foram obtidos a partir de aplicações realizadas também no GENALEX 6.1. Os níveis de significância para os testes de HWE, F_{ST} e R_{ST} foram ajustados usando as correções de Bonferroni (Rice 1989), sendo a correção padrão para HWE ($P \leq \alpha/k$, onde α representa o índice de significância 0,05 e k o número de *loci*) e sequencial para índices de fixação ($P \leq \alpha/k$, onde α representa o índice de significância 0,05 e k o número de estimativas). O fluxo gênico foi estimado como número de migrantes por geração (Nm) de

acordo com o método de alelos privados (Slatkin 1985) e o desequilíbrio de ligação foi estimado para todos os *loci* através de GENEPOP 4.0.1 (Raymond & Rousset 1995).

Para os cálculos de diferenciação populacional e dos índices de fixação F_{ST} (Weir & Cockerham 1984), foi utilizado o modelo IAM e para o índice R_{ST} (Slatkin 1995) foi assumido o modelo SMM:

1. *Infinite allele model* (IAM, Kimura & Crow 1964): assume que cada mutação gera sempre um alelo que não existe na população, pela perda ou por ganho de qualquer número de unidades de repetição, implicando que alelos idênticos partilhem a mesma ascendência, designando-os como alelos idênticos por ascendência. Neste modelo, uma maior proximidade de tamanho entre dois alelos não significa maior proximidade evolutiva.
2. *Stepwise mutation model* (SMM, Kimura & Ohta 1978): assume que cada mutação gera um alelo, pela perda ou ganho de uma única unidade de repetição, podendo dar origem a alelos já existentes na população, considerando também a possibilidade de eventuais fenômenos de homoplasia. Consequentemente admite-se que alelos de tamanho muito diferente estão menos relacionados do que os que têm um tamanho próximo (Balloux & Lugon-Moulin 2002).

A análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) calculada para todos os *loci* e para todas as populações com 16.000 permutações (Guo & Thomson 1992), sendo utilizado para os cálculos o programa GENALEX 6.1 (Peakall & Smouse 2006).

Para o cálculo do nível de estrutura populacional foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000), realizado através de uma análise bayesiana. Um modelo ancestral *admixture* com frequências alélicas correlacionadas foi usado para determinar a estrutura das populações. Todas as corridas consistiram de um “burn-in” de 100.000 passos, seguidos por 500.000 MCMC (Markovian chain of Monte Carlo).

3.2.9 Amplificação dos genes mitocondriais

Para a amplificação dos fragmentos dos 4 genes analisados das espécies empregadas no presente trabalho, utilizou-se a tecnologia da Polymerase Chain Reaction (PCR), com *primers* universais e espécie-específicos (Tabela 3). Para a amplificação foram empregados dois tipos de

enzimas *Taq* polimerase, sendo a GoTaq Polimerase (Promega), constituída de um mix com tampão, Buffer e dNTP em concentrações ótimas para a reação e a Taq Platinum (Invitrogen). Dois tipos de reações foram elaborados para a amplificação de todos os genes analisados, dependendo da enzima *Taq* polimerase que foi empregada (Tabelas 4 e 5).

Tabela 3 - Sequências dos *primers* utilizados na amplificação dos fragmentos dos genes mitocondriais, discriminando a região e o tamanho do fragmento.

Gene	Nome do <i>Primer</i>	Sequência do <i>Primer</i>	Referência
COI	Fish F1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	Ward et al. (2005)
	Fish R1	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG GAA TCA	Ward et al. (2005)
CytB	CytbF	CTT CTC CTC AAT GGC ACA C	Oliveira et al. (2011)
	CytbR	GAT GGC GTA GGC AAA TAG	Oliveira et al. (2011)
D-loop	DloopF-T	CTT CCG GGG AAT AGC GAT TTG	Mendonça et al. (2009)
	DloopR-R	CTC CCA AAG CCA AGA TTC TG	Mendonça et al. (2009)
ATPase 6-8	PotaATP2	GGG TCY AGC ATT AGC CTT T	Toffoli et al. (2008)
	PotaATPr2	GTT AGT GGT CAG GGG CTT GG	Toffoli et al. (2008)

Tabela 4. Condições da reação empregando a GoTaq

Reagentes	Volume
GoTaq (5U/μl)	6,3 μl
<i>Primer</i> Forward (5uM)	0,5 μl
<i>Primer</i> Reverse (5uM)	0,5 μl
DNA Genômico	1,0 μl
Água Milli-Q	4,05 μl
Volume Final	12,35 μl

Tabela 5. Condições da reação empregando a *Taq* Platinum

Reagentes	Volume
Taq Platinum	0,1 µl
Buffer 10X	1,25 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,25 µl
dNTP (2mM)	0,2 µl
<i>Primer</i> Forward (5uM)	0,5 µl
<i>Primer</i> Reverse (5uM)	0,5 µl
DNA Genômico	1,0 µl
Água Milli-Q	8,57 µl
Volume Total	12,5 µl

As amplificações foram efetuadas em um termociclador Veriti (Applied Biosystems) em que cada ciclo da técnica da PCR consiste, basicamente, da desnaturação, anelamento e extensão. Esses ciclos variaram dependendo do *primer* utilizado seguindo as condições básicas descritas pelos autores que os desenvolveram. Porém, ao longo do trabalho esses ciclos sofreram adaptações para a obtenção de melhores resultados (Tabela 6). A Figura 7 mostra um esquema da molécula de mtDNA localizando as posições dos genes utilizados no presente estudo.

Tabela 6. Condições de reação dos programas empregados na PCR para cada gene.

Passo	Processo	Temperatura				Tempo
1	Desnaturação inicial	<i>COI</i>	<i>CytB</i>	<i>D loop</i>	<i>ATP6/8</i>	2'
				94°C		
2	Desnaturação			94°C		30''
3	Anelamento	54°C	49°C	55°C	55°C	1'
				50°C	50°C	
				48°C	48°C	
				50°C	50°C	
4	Extensão			72°C		1'
5	Voltar ao passo 2					30x
6	Extensão final			72°C		7'

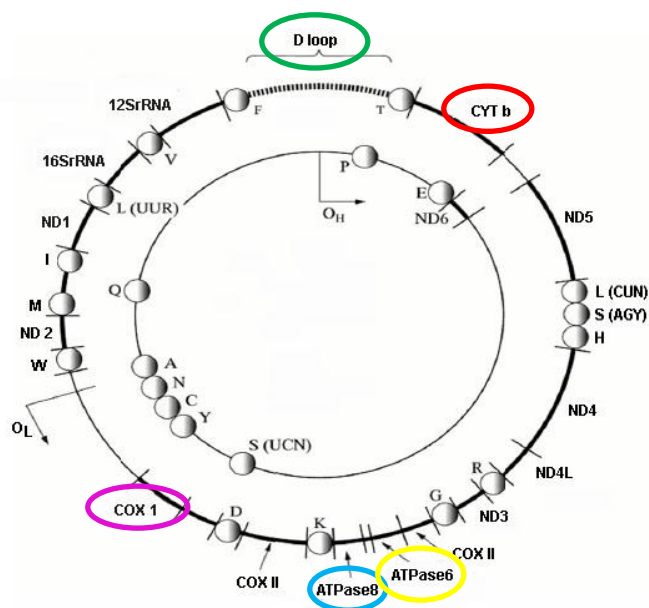


Figura 7 – Esquema da molécula de mtDNA mostrando a localização dos genes utilizados no presente estudo.

3.2.10 Visualização do DNA amplificado em gel de agarose

Os segmentos de DNA amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% (0,1g de agarose/1ml de tampão TAE 1X) e corados com *Blue Green Loading Dye I* (LGC Biotecnologia) na proporção 1:1. O Blue Green é um reagente que se une às fitas duplas do DNA emitindo coloração ao ser visualizado na luz UV. Os produtos amplificados foram comparados com o ladder 1kb plus (Invitrogen), sendo posteriormente visualizados em um transiluminador e fotografados com câmera digital.

3.2.11 Purificação das Amostras Amplificadas

Após checagem da amplificação, os produtos de PCR passaram por uma reação de limpeza através do kit ExoSap-IT® (USB Corporation) seguindo o procedimento padrão. Em um tubo Eppendorf prepara-se uma reação contendo 5,0µl do DNA amplificado juntamente com 2,0µl da solução de ExoSap e leva-se para o termociclador para a realização do seguinte programa:

Passo	Temperatura	Tempo
1	37° C	15'
2	80°C	15'

3.2.12 Reação de Sequenciamento

Para a reação de sequenciamento foi utilizado o Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems), seguindo o protocolo abaixo:

Prepara-se uma solução MIX, para cada uma das amostras, contendo:

Soluções	Volume
DNA (Amplificado e limpo pela ExoSap-IT)	2,0µl
<i>Primer</i>	2,0µl
Solução Pré-MIX (nucleotídeos marcados com fluorescência)	2,0µl
H ₂ O Autoclavada	3,0µl
Volume Final	18,0µl

Levam-se os Eppendorfs a um termociclador e realiza-se o seguinte programa:

Passo	Processo	Temperatura	Tempo
1	Desnaturação Inicial	96° C	2'
2	Desnaturação	96°C	30''
3	Anelamento	50°C	15''
4	Extensão	60°C	4'
5	Volta para o passo 2		30X

3.2.13 Limpeza do PCR de Sequenciamento

Este procedimento é realizado segundo o seguinte protocolo:

1. adicionar em cada tubo: 07 µl de EDTA (125mM);
2. adicionar em cada tubo: 07 µl de Acetato de Sódio (3 M)
3. homogeneizar e passar no spin brevemente;
4. adicionar 17,5 µl de Etanol 100%;
5. incubar por 15 minutos a temperatura ambiente;
6. centrifuga-se por 15 min a 13000 rpm à 25°C;
7. descartar o Etanol em papel toalha;
8. adiciona-se 24,5 µl de Etanol 70% Gelado;
9. centrifuga-se por 10':15'' a 13000 rpm à 20°C;
10. descartar o Etanol em papel toalha;
11. repetir passo 8 a 10 (lavagem com etanol 70%);

12. secar em termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa e com o termociclador aberto;
13. guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4°C envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

3.2.14 Sequenciamento de DNA

As sequências foram obtidas através da técnica de sequenciamento por capilaridade no sequenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Instituto de Biociências da UNESP, campus de Botucatu.

3.2.15 Análise dos dados mitocondriais

A variação e o padrão de substituição de nucleotídeos e a distância genética foram examinadas utilizando-se o programa MEGA v.4.0 (Tamura et al. 2007). A saturação de nucleotídeos foi analisada plotando-se o número absoluto de transições (Ti) e transversões (Tv) contra os valores de distância genética como uso do programa DAMBE v.4.1.27 (Xia & Xie 2001). Para a construção de dendrogramas, cujos parâmetros utilizados para verificar a divergência genética entre as sequências foram os recomendados na literatura para sequências *barcode*, sendo utilizado o modelo Kimura-2-parâmetros (K2P). Os agrupamentos foram testados através do método *bootstrap* (Felsenstein 1985) com 1.000 pseudoréplicas.

A rede de haplótipos foi construída empregando-se as sequências da região controle de todos os indivíduos de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. Os indivíduos foram hipoteticamente separados em diferentes populações tendo por base a sua distribuição geográfica. A rede de haplótipos foi elaborada para observar a existência de haplótipos compartilhados ou haplótipos característicos em cada população e conseguir observar a existência de estruturação populacional. A construção desta rede foi realizada através dos programas Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) e Network v.4.5 Fluxus Technology Ltd., assim como do DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas 2009).

3.2.16 Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A diversidade gênica é a medida que indica a heterozigosidade esperada para um dado *loci* sob Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e consiste na proporção esperada de indivíduos heterozigotos para as frequências alélicas observadas.

A verificação do EHW foi realizada pela comparação da Heterozigosidade observada (H_o) dos genótipos com a Heterozigosidade esperada (H_e), calculada com a utilização do programa ARLEQUIN 3.0, que aplica o método de Guo & Thompson (1992).

O princípio de EHW afirma que as frequências gênicas e genotípicas de um único *loci* estarão fixadas e em equilíbrio numa população numerosa que não está em processo evolutivo franco e após uma geração de acasalamento randômico. O *FIS* (coeficiente de endogamia) é utilizado para estimar a redução mínima de heterozigosidade nos indivíduos devido ao cruzamento aleatório dentro da população e foi calculado para testar as proporções do EHW entre os genótipos obtidos, de acordo com a fórmula:

$FIS = 1 - (\text{heterozigosidade observada} / \text{heterozigosidade esperada})$ onde,

- Se existe um excesso de heterozigotos, então $FIS < 0$;
- Se existe um excesso de homozigotos, então $FIS > 0$;
- O teste do qui-quadrado foi utilizado para testar a hipótese nula, onde $FIS=0$.

3.2.17 Frequências alélicas

As frequências alélicas foram obtidas por contagem direta através do pacote de programas ARLEQUIN 3.0. Este cálculo pode ser obtido somando-se o número de indivíduos heterozigotos para um determinado alelo mais duas vezes o número de indivíduos homozigotos, e dividindo-se o resultado pelo dobro do número total de indivíduos. De acordo com a fórmula:

$F(p) = (p + 2 pq)/2N$ onde:

- $F(p)$: frequência do alelo p ;
- p : número de indivíduos homozigotos do alelo p ;
- pq : número de indivíduos heterozigotos;
- N : número de indivíduos na amostra.

A avaliação da ocorrência de um alelo particular em uma população, chamada frequência gênica ou alélica, é considerada fundamental nos estudos evolutivos, pois a mudança genética de uma população pode ser avaliada pela mudança nas suas frequências gênicas (Nei, 1978).

3.2.18 Análise da estrutura genética populacional (mitocondrial)

A análise da estrutura populacional foi calculada empregando-se a análise de variância molecular (AMOVA) conforme descrito por Excoffier et al. (1992), utilizando-se o programa Arlequin 3.0 que permite verificar o grau de significância genética inter e intrapopulacional. Este método estatístico se baseia na geração de estimativas da variância genética em diferentes níveis hierárquicos, ou seja, de como a diversidade genética encontra-se distribuída dentro das populações e entre as populações, além de valores de estatística F , que indicam o grau de diferenciação genética.

Os parâmetros estatísticos foram calculados de acordo com Weir & Cockerham (1984). O F_{st} (índice de fixação) é utilizado para estimar a extensão da diferenciação genética entre as subpopulações (agrupamentos). Todos os valores foram verificados por meio de testes não paramétricos de permutação (Excoffier et al. 1992). O valor de P igual a 0,01 foi adotado como limiar de significância para todos os testes estatísticos realizados. Estas análises foram realizadas para as populações divididas temporal e espacialmente.

*R*esultados

4 Resultados

As informações obtidas dos estudos genéticos moleculares efetuados nas espécies de raias de água doce *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* são apresentados a seguir, na forma de capítulos:

4.1 - Capítulo I - Desenvolvimento de marcadores microssatélites por pirosequenciamento em raias de água doce *Potamotrygon motoro* e sua transferabilidade em *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).

4.2 - Capítulo II - Recente colonização e dinâmica genética em raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia do Rio Paraná, reveladas por marcadores genéticos.

4.3 - Capítulo III - Primeiro registro de hibridação entre espécies de raias de água doce *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia do Rio Paraná, Brasil.

As referências citadas nos capítulos encontram-se relacionadas no final da tese.

Capítulo I

Desenvolvimento de marcadores microssatélites por pirosequenciamento em raias de água doce, *Potamotrygon motoro* e sua transferabilidade em *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae).

Produção bibliográfica e científica relacionada com este capítulo

- Disciplina ministrada como colaboradora 2012: Desenvolvimento de marcadores microssatélites através de sequências obtidas por pirosequenciamento. Unesp - Botucatu / SP.
- Cruz VP, Mendes NJ, Mendonça FF, Pardo BG, Vera M, Martinez P, Oliveira C and Foresti F. 2013 Development of microsatellite markers by high-throughput pyrosequencing in the freshwater stingray (*Potamotrygon motoro*) and cross-species amplification. Molecular Ecology resources.

Resumo

As tecnologias de sequenciamento de nova geração oferecem um grande potencial para o desenvolvimento rápido e de baixo custo de marcadores moleculares, sendo um empreendimento particularmente promissor para os organismos ecologicamente importantes para os quais ainda não existem genomas de referência. Neste estudo foi utilizado o método de pirosequenciamento (454 GS-FLX Roche) para identificar sequências microssatélites na espécie de raia de água doce *Potamotrygon motoro*, de ocorrência na bacia do Rio Paraná. A técnica de pirosequenciamento abrangendo cerca de 20.997.063pb produziu 60.298 sequências com tamanho médio de 348pb, sendo o motivo tetranucleotídeo AGAT o mais frequente entre as repetições em tandem detectadas. Após a realização de análises para busca de microssatélites, foram selecionados e testados 20 *loci* microssatélites, com a realização de subsequente validação utilizando 40 indivíduos de uma amostragem de *P. motoro* da região de Foz do Iguaçu / PR. Foram identificados 10 *loci* polimórficos, com um total de 35 alelos que variaram de 2 a 10 alelos por *loci* (3,5 alelos em média). O teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg mostrou um desvio significativo em um único *loci* após a aplicação da correção Bonferroni. A transferabilidade dos *loci* de *P. motoro* foi testada para outra espécie de raia de água doce, *Potamotrygon falkneri*, sendo a transferabilidade bem sucedida. Por outro lado, 80% dos marcadores tiveram amplificação positiva e foram identificados polimorfismos em 60% dos *loci*. Considera-se que os marcadores genéticos identificados serão úteis para investigar a estrutura genética das populações destas espécies e também para inferir parâmetros demográficos em raias de água doce, com vistas à conservação e gestão deste recurso único da bacia do Rio Paraná.

Introdução

Os microssatélites têm sido relacionados como um dos marcadores genéticos mais populares para uma ampla gama de aplicações em genética populacional, biologia de conservação e biologia evolutiva, apresentando muitas vantagens em relação a outros marcadores como sua especificidade genética, natureza codominante, alto polimorfismo e fácil reprodutibilidade, entre outras (Powell et al. 1996, Goldstein & Schlotterer 1999).

A metodologia clássica de desenvolvimento de sequências microssatélite exigia a construção de uma biblioteca genômica enriquecida, isolamento e sequenciamento de clones contendo sequências repetitivas em tandem e, posteriormente, a validação dos *loci* polimórficos (Zane et al. 2002). Contudo, nos últimos anos os sequenciamentos de nova geração produziram um grande impacto na pesquisa genômica, por acelerar o processo de produção de um grande número de marcadores genéticos úteis à um custo muito baixo (Dutech et al. 2007, Blow et al. 2008, Mardis et al. 2008, Schuster et al. 2008).

Entre as novas tecnologias de sequenciamento, o pirosequenciamento está sendo muito utilizado na busca de marcadores microssatélites e estudos pioneiros já foram realizados em vários organismos, como em anfíbios (Nair et al. 2011); artrópodes (Pauchet et al. 2009, Rasmussen & Noor 2009, Zhang et al. 2010); aves (Abdelkrim et al. 2009, Allentoft et al. 2009, Lerner & Fleischer 2010); fungos (Santana et al. 2009, Magain et al. 2010); mamíferos (Vanpe et al. 2009, Michelizzi et al. 2010); peixes (Johansen et al. 2009, Boomer & Stow 2010, Dubut et al. 2010, Saarinen & Austin 2010) e répteis (Castoe et al. 2010).

Entre os Chondrichthyes, estudos recentes para o desenvolvimento de marcadores microssatélites também já têm utilizado a técnica de pirosequenciamento (Boomer et al. 2010, Chabot et al. 2011, Kang et al. 2012) porém, em raias de água doce da família Potamotrygonidae, os estudos para desenvolvimento destes marcadores são ainda relativamente escassos, mesmo se realizados por técnicas convencionais e clássicas.

A família Potamotrygonidae (Garman 1877) é constituída por quatro gêneros, *Helyotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon*, incluindo entre 21 e 26 espécies conhecidas (Rosa 1985, Rosa et al. 1987, Charvet-Almeida et al. 2002, Carvalho et al. 2003, Silva et al. 2011, Eschmeyer & Fong, 2013). As raias de água doce são restritas aos principais sistemas fluviais da costa Atlântica da América do Sul, desde a Venezuela até a Argentina (Achenbach & Achenbach 1976, Rosa 1985). No Brasil, o maior número de espécies é encontrado na Bacia Amazônica (cerca de 16 espécies), sendo que este número pode variar devido à possível existência de sinônimos e espécies ainda não descritas (Rosa 1985, Carvalho et al. 2003).

Na bacia do Rio Paraná, até o final de 1970, as raias eram observadas apenas em regiões a jusante da cachoeiras de Sete-Quedas, na região do médio Rio Paraná, devido a esta grande barreira geográfica localizada na região do município de Guaíra, Estado do Paraná (Vilela et al. 2004). Esta barreira natural, que isolou por um longo período a maioria dos peixes do alto Rio Paraná da fauna remanescente a jusante, deixou de existir devido à construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu em 1982. Tal fato permitiu que muitas espécies colonizassem ambientes na região a montante de Guaíra e neste novo cenário, as raias *Potamotrygon motoro*, *P. falkneri* e outras espécies de peixes locais começaram a desempenhar o papel de espécies invasoras. Considera-se atualmente que o impacto destas colonizações sobre a fauna aquática nativa ainda precisa ser melhor estudado e avaliado (Brasil 1998, Vilela et al. 2004, Makrakis et al. 2007). Desta forma, os dados moleculares e ecológicos sobre estas espécies e populações são de grande importância, uma vez que podem fornecer informações fundamentais relacionadas com a rota de invasão, dinâmica demográfica e a fonte das populações invasoras, como demonstrado em diversas espécies de peixes (Hansen & Mensberg 1996, Hansen et al. 1999, Beheregaray et al. 2001, Celroy et al. 2003, Caldera et al. 2008, Cruz et al. 2012).

No presente estudo é relatado o desenvolvimento dos primeiros marcadores microssatélites desenvolvidos para *Potamotrygon motoro* e sua transferabilidade para espécie do mesmo gênero, *P. falkneri*, utilizando sequenciamento de nova geração 454 GS-FLX Roche. Esta abordagem tem sido útil para reduzir o tempo e o custo no processo de isolamento de marcadores microssatélite, podendo proporcionar informações que permitam avaliar a aplicabilidade desta metodologia para estudar a diversidade genética e o processo de colonização de populações de raias na bacia do Rio Paraná.

Materiais e métodos

Amostras de 40 indivíduos da espécie *Potamotrygon motoro* foram coletados no Rio Paraná, região de Foz do Iguaçu / PR – Brasil. Alguns exemplares foram fixados em formol a 10% e posteriormente conservados em álcool etílico a 70%, identificados pela especialista Patrícia Charvet-Almeida e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), Botucatu, SP.

O DNA total foi extraído a partir de fragmentos de tecido muscular preservados em etanol a 95%, seguindo o protocolo apresentado no kit comercial "Genomic Assistente Kit de Purificação de DNA - Promega", com pequenas adaptações.

Um *pool* de 100mg (60ng/μl) de DNA de 2 indivíduos desta espécie foi agrupado para a realização do pirosequenciamento em 454 GS FLX Roche (sequenciador de placa de Titânio) no Instituto Agrobiotecnológico de Rosário/INDEAR, Argentina. Detalhes do procedimento de pirosequenciamento foram descritos segundo o autor Margulies et al. 2005. Para realização do teste de transferabilidade dos marcadores microssatélite, foram utilizados 20 indivíduos da espécie *P. falkneri*, sendo o DNA destas amostras extraído de acordo com as instruções existentes no kit (Promega).

Seleção de Marcadores

Para evitar a concepção de *primers* duplicados para o mesmo *loci*, todas as sequências de microssatélites selecionadas pelo programa BatchPrimer3 (You et al. 2008) foram agrupadas e alinhadas no programa Clustal X (Thompson et al. 1997), para identificar possíveis sequências redundantes. Microssatélites com uma boa probabilidade de amplificação (grau de confiança) foram identificados de acordo com os seguintes critérios: para repetições dinucleotídeo, número mínimo de repetição (nmr) = 8; trinucleotídeos (nmr = 5); tetranucleotídeo (nmr = 4); pentanucleótidos (nmr = 4) e hexanucleotide (nmr = 3).

Os *primers* foram desenhados pelo programa PRIMER 3.0 (Rozen & Skaletsky 2000) com base nos critérios de tamanho de *primer* ótimo de 20 pb (min = 18, max = 22 pb); temperatura ideal de anelamento 60 ° C (min = 55 ° C, max = 63 ° C); quantidade de GC ótimo de 60% (min = 40%, max = 80%) e do tamanho do produto amplificado, variando de 50 a 450bp. As cores dos fluorocromos foram definidas de acordo os tamanhos dos produtos de microssatélites, de modo que *loci* de diferentes tamanhos puderam ser marcados com o mesmo fluorocromo, para a adaptação da técnica de PCR-multiplex.

Teste dos marcadores

Os *primers* foram sintetizados com fluorocromos FAM (azul), NED (amarelo), PET (vermelho) e VIC (verde). Cada conjunto de *primer* foi inicialmente avaliado utilizando amostras de

DNA a partir de 5 indivíduos. Para a reação em cadeia de polimerase (PCR), foi utilizado o termociclador Applied Biosystems (Veriti, Thermal Cycler) nas seguintes condições: desnaturação inicial de 4min a 94°C; 34 ciclos de 94°C por 15s; temperatura de anelamento específica de cada *primer* por 25 s, 72°C por 25s, e extensão final de 10 min a 72°C. O volume total da reação de PCR foi de 12,5µl e consistia de: 1X Tampão, 1,5 mM MgCl, 0,2mM de cada dNTP, 0,5 unidades de polimerase de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 1,0pmol de cada um dos *primers* (Schuelke 2000) e 30ng de DNA. Os produtos de PCR foram visualizados com controle negativo e positivo por eletroforese em gel de agarose a 2%. Os *loci* que produziram bandas de tamanho esperado foram selecionados e analisados no sequenciador ABI 3730 XL (Universidad de Santiago de Compostela - Lugo, Espanha).

Após a identificação dos *loci* polimórficos, foram testadas as PCRs multiplex com as mesmas amostras anteriormente utilizadas e normalizadas para uma concentração de 5ng/µl usando o Type Master Mix PCR (Qiagen). As PCRs multiplex foram adaptadas com de 2µl de DNA, 2µl do mix de *primers* (cada *primer* de 2µl em TE pH 8,0) e 10µl de Type Master Mix. O programa utilizado para a amplificação da PCR multiplex foi: desnaturação de 5min a 95°C, 30 ciclos de 30s a 95°C, 60s a 57°C e 30s a 72°C, com extensão final de 30 min a 60°C. Os picos obtidos a partir de reações multiplex foram verificados no sequenciador Applied Biosystems (ABI) 3730 XL em relação à correspondência com um único *loci*.

A transferabilidade dos *loci* de *Potamotrygon motoro* foi testada para a espécie *P.falkneri* seguindo o mesmo protocolo de PCR anteriormente descrito para *P. motoro*, sendo utilizada amostra de 20 indivíduos coletados no Rio Paraná, região de Porto Rico / PR.

Os tamanhos dos alelos em ambas as espécies foram determinadas usando o 500 LIZ (Applied Biosystems) como padrão interno e para estimar o tamanho do alelo foi utilizado o programa GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems). Os dados sobre conteúdo de informação polimórfica (PIC), frequência de alelos e a frequência estimada de alelos nulos foram obtidos pelo programa Cervus 2.0 (Marshall et al. 1998). O número de alelos por loci (N_a), heterozigosidade observada (H_o),

heterozigosidade esperada (He) e de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram calculados utilizando o programa GENALEX 6.5 (Peakall & Smouse 2006).

Resultados e Discussão

Como resultado do pirosequenciamento (454 GS-FLX Roche) da espécie de raia de água doce *Potamotrygon motoro* foram produzidas 60.298 sequências contendo em média 348pb, a partir de um total de 20.997.063pb analisadas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados obtidos do pirosequenciamento 454 GS-FLX Roche para a espécie *Potamotrygon motoro*.

<i>Análises</i>	<i>Nº de sequências</i>
Número de sequências	60,298
Total de bases (bp)	20,997,063
Seleção primária de sequências microssatélites (programa <i>BatchPrimer3</i>)	1,510
Seleção secundária de microssatélites (programa <i>Primer 3.0</i>)	30
Amplificação e padronização dos produtos de PCR	30
Sintetize dos <i>loci</i> com fluorocromos	20
<i>Loci</i> polimórficos detectados no sequenciador	10

Após as análises realizadas com o programa *BatchPrimer3*, foi detectada a ocorrência de 2,5% de microssatélites perfeitos e destes, 491 repetições continham motivos dinucleotídeos (33%), 158 continham motivos trinucleotídeos (10%), 822 continham motivos tetranucleotídeos (54%), 27 continham motivos pentanucleotídeos (2%) e 12 continham motivos hexanucleotídeos (1%) (ANEXO 1). O motivo tetranucleotídeo AGAT / ATCT foi o mais abundante e o dinucleotídeo AC / GT o mais frequente (Figura 1). Em um estudo realizado para a espécie de raia marinha *Raja clavata*, os microssatélites desenvolvidos a partir de pirosequenciamento identificaram o dinucleotídeo CA / TG como o motivo mais frequente (Kang et al. 2012).

Entre um total de 1.510 sequências contendo microssatélites perfeitos, 30 *loci* foram selecionados (2%) e sintetizados de acordo com o número de repetições, motivos e adequação das regiões flancadoras (ANEXOS 2 e 3). Todos os *loci* foram amplificados utilizando *primers* não marcados e testados em 5 amostras da espécie *Potamotrygon motoro*.

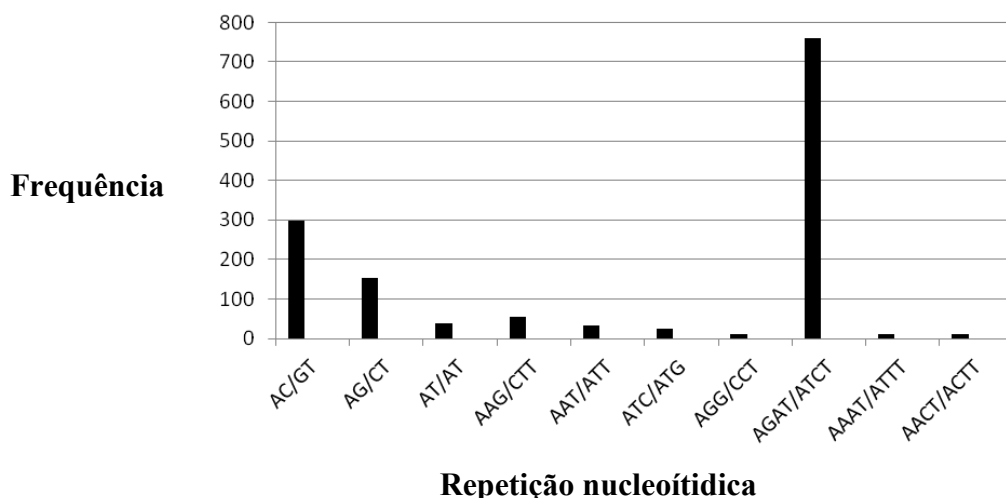


Figura 1. Frequência de repetições microssatélites identificadas em *Potamotrygon motoro*, obtidas por pirosequenciamento.

Sua validação foi confirmada e resultou em bandas de tamanhos esperados de acordo com cada microssatélite, em gel de agarose (ANEXO 4). Destes, 20 *loci* microssatélites (1,3%) com bandas de alta qualidade foram finalmente selecionados e *primers* marcados com fluorocromos foram sintetizados, sendo estes identificados como 15 dinucleotídeos, 3 trinucleotídeos e 2 tetranucleotídeos (ANEXO 5).

Entre os 20 conjuntos de *primers* sintetizados, 10 *loci* foram identificados com polimorfismos (ANEXOS 6 e 7). Em seguida, duas PCRs multiplex foram adaptadas com 5 *loci* em cada mix, sendo testadas com as mesmas amostras anteriormente utilizadas, apresentando o mesmo padrão de amplificação (ANEXO 8). Os dados contendo os motivos de cada microssatélite, sequências dos *primers*, temperatura de anelamento, tamanho do produto, fluorocromos utilizados e reação multiplex estão resumidos na Tabela 2.

O valor de PIC variou de 0.133 a 0.672, com uma média de 0.391, sendo o valor mais elevado associado com o *loci* Pm_18, que apresentou o maior número de alelos. A baixa variação encontrada em vários *loci* pode ser relacionada com o efeito fundador do processo de colonização das raias e ainda com o fato de que apenas uma população foi analisada. Entre os *loci* polimórficos, o número de alelos variou de 2 a 10 alelos, com média de 3,5 alelos / *loci* (Tabela 3).

Tabela 2. Características dos 10 marcadores microssatélites desenvolvidos para *Potamotrygon motoro*.

<i>Loci</i>	<i>Repetição</i>	<i>Sequência do primer (5'→3')</i>	<i>T(°C)</i>	<i>Tamanho (pb)</i>	<i>Fluorocromos Multiplex*</i>
Pm_5	(GT)11	F: TGGGTAGCAGGTTTCATGGT R: CGTGTGGTTTCCATCCATCT	57	245	1-FAM
Pm_8	(TC)9	F: CAGTCCATCCACCTGTACCA R: TGTCCATGCTAACAAGAAAGAG	57	173	1-NED
Pm_10	(GT)9	F: ATGTGCTCCTTTGGGATCTG R: CGTGTTGCATGTGAGTTATGTG	57	404	2-NED
Pm_11	(CA)11	F: CACGCTCCTCATCAGCCTAC R: AGTTGTTCCCTCTCCTGCAA	57	303	1-NED
Pm_12	(AC)11	F: TTGGAATCAACGATGGCTTA R: AAGGGAGAGGGAGCTGAGAG	57	316	1-PET
Pm_16	(TG)10	F: AGATTGATAGCTGGGCTCGT R: GAGCTGAAAGGTGCAAGTCC	57	197	2-FAM
Pm_17	(TG)9	F: AGAGGTGAGTGAGCGTGTTT R: GCTTCCGAGATCAGACGAGA	57	374	1-VIC
Pm_18	(GA)8	F: TTTGTGGGTGGCAAGGTTAT R: GCAAGTCCCAAGAAGAGTGG	57	225	2-NED
Pm_21	(AC)9	F: TTGTCATAAGGGTGCTCCAA R: TGCAGTTGTTTGGGACTCTG	57	119	2-VIC
Pm_25	(AAC)5	F: CCGAAAGTGATGGAGGACAT R: CCTGGTCTTCGTTTGGTTTG	57	183	2-PET

*Multiplex 1 – Pm_5, Pm_8, Pm_11, Pm_12, Pm_17. Multiplex 2 – Pm_10, Pm_16, Pm_18, Pm_21, Pm_25.

A heterozigosidade esperada variou entre 0.177 (Pm_21 e Pm_25) e 0.678 (Pm_18). O nível de diversidade genética neste estudo foi menor do que a encontrada entre outras espécies de Chondrichthyes (Chevolot et al. 2007b, Nagar et al. 2010, Mendonça et al. 2012, Kang et al. 2012).

Desvios significativos do EHW após a correção de Bonferroni foi detectada apenas no *loci* Pm_16, que pode estar relacionado à deficiência de heterozigotos, envolvendo fatores de endogamia, estruturação das amostras populacionais ou com a presença de alelos nulos. A ocorrência de alelos nulos foi identificada nos *loci* Pm_8, Pm_10, Pm_16 e Pm_18. Os marcadores desenvolvidos neste estudo foram testados em *Potamotrygon falkneri*, uma espécie simpátrica de *P. motoro* também envolvida no processo de colonização na bacia do Rio Paraná. Entre os 10 *loci* polimórficos identificados em *P. motoro*, 8 tiveram amplificação positiva e 6 (60%) foram polimórficos para *P. falkneri* (ANEXOs 9 e 10).

Tabela 3. Resultados da diversidade genética de 10 *loci* desenvolvidos para *Potamotrygon motoro* e sua transferabilidade em *P. falkneri*. Na: número de alelos, He: heterozigosidade esperada, Ho: heterozigosidade observada, HWE: Equilíbrio de Hardy-Weinberg; PIC: índice de conteúdo polimórfico; § não conformidade com HWE ($p < 0.010$, correção de Boferroni); *loci microssatélite com presença de alelos nulos.

<i>P. motoro</i>						<i>P. falkneri</i>	
<i>Locus</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>HWE</i>	<i>PIC</i>	<i>Na</i>	<i>HWE</i>
Pm_5	2	0.41207	0.51351	0.02201	0.314	7	0.84791
Pm_8	5*	0.62384	0.64865	0.03470	0.682	4	0.30810
Pm_10	1	0.47684	0.58684	0.04510	0.448	3	0.10184
Pm_11	3	0.20305	0.22222	0.02892	0.288	5	0.51917
Pm_12	2	0.36632	0.36842	0.02980	0.364	9	0.39154
Pm_16	5 [§] *	0.52105	0.31579	0.00891	0.522	2	0.69810
Pm_17	2	0.10367	0.10811	0.08805	0.358	-	-
Pm_18	10*	0.67790	0.59459	0.00430	0.672	-	-
Pm_21	2	0.17684	0.16895	0.10100	0.133	-	-
Pm_25	2	0.17684	0.16895	0.10100	0.133	-	-

Alguns loci apresentaram maiores valores de diversidade genética do que a espécie alvo. Este resultado mostra que o uso de marcadores descritos anteriormente para as espécies relacionadas constitui uma boa alternativa para a identificação de marcadores microssatélites em espécies relacionadas onde não há informação genômica disponível.

Marcadores microssatélites já foram desenvolvidos em muitas espécies de Chondrichthyes, como em *Carcharhinus plumbeus* (Heist & Gold 1999b), *Carcharodon carcharias* (Pardini et al. 2000), *Negaprion brevirostris* (Feldheim et al. 2001a; Feldheim et al. 2001b), *Isurus oxyrinchus* (Schrey & Heist 2003), *Carcharhinus limbatus* (Keeney & Heist 2003), *Ginglymostoma cirratum* (Heist et al. 2003), *Raja clavata* (Chevolot et al. 2005), *Raja montagui* (Nagar et al. 2010), *Dipturus batis* (Griffiths et al. 2010), *Aetobatus narinari* (Sellas et al. 2011), *Mustelus canis* (Giresi et al. 2011a), *Carcharhinus acronotus* (Giresi et al. 2011b), *Prionace glauca* (Mendonça et al. 2012), mas poucos estudos utilizaram tecnologias de sequenciamento de nova geração como o pirosequenciamento para prospecção de marcadores microssatélites (Boomer et al. 2010, Chabot et al. 2011, Kang et al. 2012).

Devido ao alto custo e tempo para o desenvolvimento de *primers* espécie-específicos para *loci* microssatélites como já citado neste trabalho, muitos estudos vêm utilizando cada vez mais *primers* heterólogos, descritos para uma determinada espécie e utilizados em outras espécies relacionadas que ainda não possuem sequências microssatélites descritas e validadas (Oliveira et al. 2006). A transferabilidade dos locos heterólogos de microssatélites pode ser extremamente alta quando realizada em espécies ou gêneros taxonomicamente relacionados e, dependendo de sua localização indicativa de que o loco está ou não presente em uma região codificadora do genoma, os índices podem ser ainda maiores (Oliveira et al. 2006).

Os dados obtidos no presente trabalho também sugerem que os *loci* Pm_17 e Pm_18, que não amplificam as sequências alvo de *Potamotrygon falkneri*, podem, contudo, ser utilizados para a caracterização molecular, diferenciação de espécies e identificação de híbridos interespecíficos (Azevedo et al. 2012). Portanto, os marcadores moleculares desenvolvidos neste estudo poderão ser úteis para futuras avaliações e monitoramento das tendências populacionais destas espécies invasoras. Este é o primeiro estudo realizado para o desenvolvimento de marcadores microssatélites em espécies de raias de água doce.

Conclusões

Este estudo relata o desenvolvimento de 10 marcadores microssatélites a partir da aplicação da técnica de pirosequenciamento utilizando equipamento 454 GS-FLX (Roche) na espécie de raia de água doce *Potamotrygon motoro*. A transferabilidade dos *loci* de microssatélites obtidos, quando realizada para outra espécie de raia do mesmo gênero, *P. falkneri*, apresentou uma taxa de sucesso de 60%.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo de desenvolvimento de marcadores microssatélites entre representantes da família Potamotrygonidae e considera-se que estes marcadores podem ser utilizados para uma melhor compreensão do processo de colonização de populações de *Potamotrygon* na Bacia do Rio Paraná, comparando a composição e estrutura genética de populações à jusante e montante da barragem da Hidrelétrica de Itaipú. O conjunto de dados obtidos poderá também contribuir para um melhor conhecimento genômico em espécies de raias de água doce.

Capítulo II

Recente colonização e dinâmica genética em raias de água doce (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia do Rio Paraná, reveladas por marcadores genéticos.

Produção bibliográfica e científica relacionada com este capítulo

Produção Bibliográfica relacionada ao conteúdo deste capítulo:

_Cruz VP, Oliveira C, Foresti F. 2012. The genetic dynamics and recent colonization of Southeastern Brazil by stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Science Med, Medimond Fascículo 3, 179-185pg.

_Cruz VP, Mendes NJ, Oliveira C, Foresti F. 2012. Recent Colonization and population genetics structure in the *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) of southeastern Brazil as revealed by microsatellite genotypes. Menção Honrosa pela participação do Prêmio Silvio de Almeida Toledo Filho - Evento: 58º Congresso Brasileiro de Genética.

Resumo

Espécies de raias de água doce da família Potamotrygonidae (*Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*) passaram a desempenhar o papel de espécies invasoras no médio Rio Paraná (bacia do Rio Paraná), após a construção da Usina Hidrelétrica de Itaipu onde havia uma importante barreira geográfica formada pelas cachoeiras de Sete-Quedas. Com o alagamento da região em decorrência do represamento, esta barreira geológica deixou de existir, permitindo que muitas espécies aquáticas passassem a colonizar um novo ambiente. As raias atualmente estão estabelecidas até a região do alto Paraná, na altura da junção dos rios Grande e Paranaíba, a montante do reservatório de Ilha Solteira-SP. Com o objetivo de analisar o processo de colonização das espécies de raias *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* na bacia hidrográfica do Rio Paraná, foram realizados estudos genéticos moleculares utilizando o gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade I (COI) para a identificação molecular das espécies. Posteriormente, foram realizadas amplificações e sequenciamentos dos genes ATPase 6/8, Cyt-B e região controle D-loop, para análises populacionais das espécies. A divergência genética encontrada para o gene COI entre as espécies foi de 2,0%. Nas análises populacionais de *P. motoro*, de modo geral, a diversidade intra-específica foi muito baixa para todos os genes, com vários indivíduos compartilhando os mesmos haplótipos. *P. falkneri* também apresentou resultados semelhantes aos detectados em *P. motoro*, mas com índices de diferenciação genética populacional mais elevados, porém não significativos. Diante dos resultados obtidos a partir das análises com marcadores mitocondriais entendemos que a baixa diferenciação genética detectada para as duas espécies em estudo pode estar relacionada ao pouco tempo de colonização, de cerca de 30 anos, ou pelo fato do marcador não ser sensível o suficiente para detectar tais diferenciações genéticas. Com isso, tornou-se necessário buscar outros marcadores para verificar, de forma mais minuciosa, a diversidade genética das novas populações de raias distribuídas no Rio Paraná. Com o uso da tecnologia de pirosequenciamento foram desenvolvidos 10 marcadores polimórficos do tipo microssatélite para a espécie *P. motoro* e posteriormente analisada e realizada a transferabilidade destes *loci* para a espécie *P. falkneri*, para a qual 6 *loci* foram identificados como polimórficos. Em *P. motoro*, 100 indivíduos distribuídos em quatro localidades ao longo do Rio Paraná foram

genotipados, correspondendo a amostras coletadas em localidades de Foz do Iguaçu, Porto Maringá, Ilha Solteira e Rio Sucuriú, afluente do Rio Paraná. A amostragem de Foz do Iguaçu apresentou maior variedade genética quando comparada com Ilha Solteira. A média do F_{st} em todas as localidades foi de 0.50, indicando uma baixa diferenciação populacional. Outros índices genéticos analisados indicaram que as regiões amostradas estão tendo fluxo gênico, sem perda de variabilidade genética detectável, caracterizando *P. motoro* como uma única unidade panmítica até o momento na bacia do Rio Paraná. Com relação a *P. falkneri*, 77 indivíduos identificados como pertencentes a três localidades e correspondentes a amostras coletadas nas localidades de Porto Camargo, Porto Rico e Ilha Solteira foram genotipados. Os índices genéticos revelaram que as regiões amostradas indicam que as populações colonizadoras perderam variabilidade genética ao longo do processo de invasão, sendo de Porto Camargo a região que apresenta maior diversidade genética, quando comparada a de Ilha Solteira, porém com número efetivo populacional elevado, sugerindo estar esta espécie em uma situação de expansão populacional.

Introdução

Invasões biológicas são iniciadas quando ocorre uma ou mais introduções de espécies em uma nova área e este processo pode ocorrer envolvendo muitos ou apenas alguns indivíduos (Sakai et al. 2001, Gaskin et al. 2005, Gozlan et al. 2010). O número de introdução de indivíduos durante cada evento exerce amplo efeito no sucesso de determinada espécie em se tornar invasora (Dlugosh & Parker 2008, Marrs et al. 2008). O entendimento sobre a conexão entre fatores como múltiplas introduções, número de indivíduos e efeitos genéticos, representados por gargalo, efeito fundador, seleção e deriva genética no resultado de invasões biológicas constituem aspectos muito importantes a serem considerados (Dlugosh & Parker 2008).

Em geral, quando uma espécie é introduzida, apenas uma pequena amostra de indivíduos da população original chega ao local receptor (Sakai et al. 2001) e estes indivíduos não devem, portanto, representar toda a variabilidade genética mantida na população fonte, sendo este fenômeno denominado de “efeito fundador” (Hartl & Clark 1997). Caso uma nova amostra desses

indivíduos introduzidos seja transportada para outro local receptor, deverá ocorrer redução secundária da diversidade genética na nova população introduzida. O decréscimo nessa variação genética pode ser acompanhado em conjunto com a assinatura genética de cada população.

O caminho percorrido no processo de invasão biológica pode, portanto, ser deduzido (Muirhead et al. 2008) e assim fornecer informações sobre as possíveis rotas de colonização (Sved et al. 2008), uma vez que a diversidade genética é o elemento básico necessário para a evolução adaptativa. Tem sido proposto que múltiplas introduções de espécies exóticas sejam responsáveis pela transformação destas em espécies invasoras, especialmente problemáticas e capazes de acelerar a resposta evolutiva à pressão de seleção (Kolar & Lodge 2001, Dlugosch & Parker 2008).

Entre os elementos mais importantes que podem impedir o intercâmbio de espécies de organismos de água-doce entre diferentes regiões estão as barreiras naturais, representadas por cordilheiras, bacias hidrográficas e cachoeiras, entre outros. Essas barreiras naturais são denominadas como barreiras biogeográficas e, historicamente, têm se constituído num fator dominante na determinação e composição de faunas regionais, promovendo endemismos (Cox & Moore 1980, Ricklefs & Schluter, 1993). No entanto, as ações humanas têm alterado o isolamento anteriormente imposto por barreiras biogeográficas e o resultado tem sido uma mistura sem precedentes de comunidades biológicas (Lockwood & McKinney 2001, Rahel 2002, McKinney, 2006). Muito tem sido escrito sobre a perda ou ligação de conectividade em ecossistemas aquáticos devido à construção de barragens e diques (Agostinho et al. 1992, 1994; Pringle 2003) e, dependendo do grau de alteração da conectividade, podendo impedir a realização de migrações sazonais e reduzir a diversidade de habitats aquáticos.

Embora raramente mencionadas, algumas espécies de raias de água-doce da família Potamotrygonidae também passaram a desempenhar o papel de espécies invasoras em determinados ambientes, devido à ação antrópica. Na região da bacia hidrográfica do Rio Paraná o marco da invasão ocorreu com o enchimento do reservatório da Usina Hidrelétrica de Itaipu, em 1982. Nesse período, as cachoeiras de Sete-Quedas que isolaram por muito tempo a ictiofauna do Alto Paraná da fauna remanescente dos sistemas a jusante desta barreira natural, foram submersas pelo lago de inundação, permitindo com isso que muitas espécies aquáticas pudessem colonizar novos habitats à montante

(Vazzoler et al. 1997, Brasil 1998, Britto 2004, Vilela et al. 2004, Makrakis et al. 2011). Com o tempo, outras hidrelétricas foram construídas ao longo do Rio Paraná, favorecendo ainda mais a dispersão das raia nas áreas invadidas (Garrone et al 2007). Entre as raia colonizadoras estão às espécies *Potamotrygon motoro* e *P.falkneri*, sendo que até o momento, poucos estudos genéticos foram realizados para o conhecimento da estrutura populacional destas espécies invasoras (Cruz et al. 2012).

Nos últimos tempos, técnicas de análises genéticas moleculares estão sendo desenvolvidas para responder a questões específicas relacionadas ao entendimento do processo de colonização (Estoup & Guillemaud 2010, Geller et al. 2010), bem como sobre os mecanismos envolvidos no sucesso de estabelecimento das espécies invasoras (Hanfling 2007, Miura 2007, Geller et al. 2010).

No presente trabalho foram realizadas análises de amostras de raia de água doce das espécies *Potamotrygon motoro* e *P.falkneri* utilizando marcadores genéticos moleculares de DNA mitocondrial (COI, Cytb, ATPase e a região controle) e marcadores nucleares (microsatélites), para acessar a diversidade genética das populações colonizadoras nos componentes da bacia hidrográfica do Rio Paraná. Pretende-se, com as informações obtidas, estabelecer uma nova abordagem de compreensão dos mecanismos envolvidos nos processos de colonização e dispersão dos organismos aquáticos, com base em marcadores genéticos moleculares.

Materiais e Métodos

Amostragem

Amostras de tecido muscular de raia do gênero *Potamotrygon* foram coletadas de espécimes provenientes da bacia do Rio Paraná e fixadas em etanol 90%. As amostras de *P. motoro* foram provenientes de 4 localidades de captura, sendo elas na região de Foz do Iguaçu (FI, n=54), em Porto Maringá (PM, n=19), em Ilha Solteira (IS, n=45) e no Rio Sucuriú (SU, n=22), um afluente do Rio Paraná. As amostras de *P. falkneri* foram provenientes de três localidades, situadas em Porto Camargo (PC, n=22), Porto Rico (PR, n=18) e Ilha Solteira (IS, n=52). Alguns exemplares foram

fixados em formol a 10% e posteriormente conservados em álcool etílico a 70%, identificados pela especialista Patrícia Charvet-Almeida e depositados na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes (LBP), UNESP, Botucatu, SP. As sequências do gene COI (*DNA Barcoding*) do DNA mitocondrial foram utilizadas para realizar a identificação molecular das espécies.

O DNA total foi extraído com a utilização do kit da DNeasy Tissue (Qiagen), de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante. Entre as amostras de raias coletadas, alguns espécimes apresentaram padrão fenotípico de identificação duvidosa e foram retirados nas análises para futuros estudos sobre hibridação (Cap. III).

Análises com DNA mitocondrial

Para realização das análises de diversidade populacional, foram utilizados os genes Cytb, ATPase e a região D-loop, identificada como região controladora do mtDNA. Os *primers* utilizados e os protocolos moleculares para todos os genes estão descritos em Materiais e Métodos desta Tese. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose a 1% e posteriormente preparados para o serem submetidos ao sequenciador automático ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, em Botucatu, São Paulo. As regiões foram sequenciadas nas direções sense e anti-sense da molécula de DNA, os cromatogramas foram conferidos e as sequências foram alinhadas no software ClustalW (Thompson et al. 1997) implementado no programa BioEdit.

Genotipagem

As genotipagens foram realizadas com os *primers* desenvolvidos para *Potamotrygon motoro* (Cap. I). Para otimizar a técnica foi realizada a PCR-multiplex, com cinco pares de *primers* combinados em duas multiplex, com um total de 10 microsatélites (ANEXO 8). As condições de reação das PCRs-multiplex consistiram em 2µL de DNA, 2µL de cada mix de *primer* (cada *primer* com 2µM em TE pH 8.0), 10µL de Type-it Microsatellite PCR Master Mix (Qiagen). O programa de amplificação utilizado foi de desnaturação a 5 min por 95°C; 30 ciclos de 30 s a 95°C, 60 s a 57 °C e 30 s a 72°C, com extensão final de 30 minutos a 60°C.

Os produtos da PCR foram detectados no aparelho ABI 3730 (Applied Biosystems) nas instalações da Universidade de Santiago de Compostela (Lugo, Espanha). Os microssatélites também foram utilizados nas análises da espécie *Potamotrygon falkneri* seguindo os mesmos critérios descritos acima. Os perfis dos microssatélites obtidos foram examinados no software Genemapper 4.0 (Applied Biosystems), sendo o resultado da genotipagem conferido manualmente.

Análises em genética de populações

Para quantificar a diversidade genética com marcador de DNA mitocondrial foram identificados fatores como o número de haplótipos (H), diversidade haplotípica (HD) e diversidade nucleotídica (PI), além dos índices de *Fst* (Arlequin 3.0). A rede de haplótipos foi construída empregando-se as sequências obtidas da região controle D-loop de todos os indivíduos de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. Os indivíduos foram separados em diferentes populações com base na sua distribuição geográfica. A construção desta rede foi realizada com ajuda do programa Arlequin v.3.5.1.2 (Excoffier et al. 2005) e do programa Network v.4.5 Fluxus Technology Ltd., assim como do DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas 2009). E existência de desequilíbrio de ligação foi estimada para todos os *loci* com o uso do programa GENEPOP 4.0.1 (Raymond & Rousset 1995).

Para os cálculos de diferenciação populacional, foram calculados os índices de fixação *Fst* (Weir & Cockerham 1984), assumindo o *infinite allele model* (IAM, Kimura & Crow 1964) e *Rst* (Slatkin 1995), assumindo o *stepwise mutation model* (SMM, Kimura & Ohta 1978) e a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) calculada para todos os *loci* e para todas as populações com 16.000 permutações (Guo & Thomson 1992), sendo os cálculos realizados com o uso do programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier et al. 2005). O número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o), presença de alelos nulos (R), presença de alelos privados, frequências alélicas e os índices de endogamia *FIS*, *Fst* e *Rst* foram estimados utilizando-se a o programa GENALEX (Peakall & Smouse, 2006).

Os índices de distância genética de *chord* (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) corrigidos para o tamanho amostral foram calculados com auxílio do programa GENECLASS2 (Piry et al. 2004). O programa STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard et al. 2000) foi usado para calcular o nível de estrutura

populacional por meio de uma análise bayesiana. Um modelo ancestral *admixture* com frequências alélicas correlacionadas foi usado para determinar a estrutura das populações. Corridas independentes foram realizadas para cada K , sendo $K = 1$ a 4 em *Potamotrygon motoro* e $K = 1$ a 3 em *P. falkneri*. Todas as corridas consistiram de um “burn-in” de 100.000 passos, seguidos por 500.000 MCMC (Monte Carlo via Cadeias de Markov).

Resultados

DNA mitocondrial

A divergência genética média dentro das populações da bacia do rio Paraná foi calculada utilizando o modelo Kimura- 2-parâmetros, tendo sido encontrado o valor de 0.3% de distância genética entre as amostras de *P. motoro* analisadas. Já a divergência genética média encontrada entre as populações de *P. falkneri* foi de 0.2% (Figura 1). A divergência genética entre as espécies em estudo (*P. motoro* e *P. falkneri*) foi de 2.0%, sendo que o segmento correspondente ao gene COI apresenta uma alta taxa mutacional, mesmo para um DNA mitocondrial (Saccone 2009).

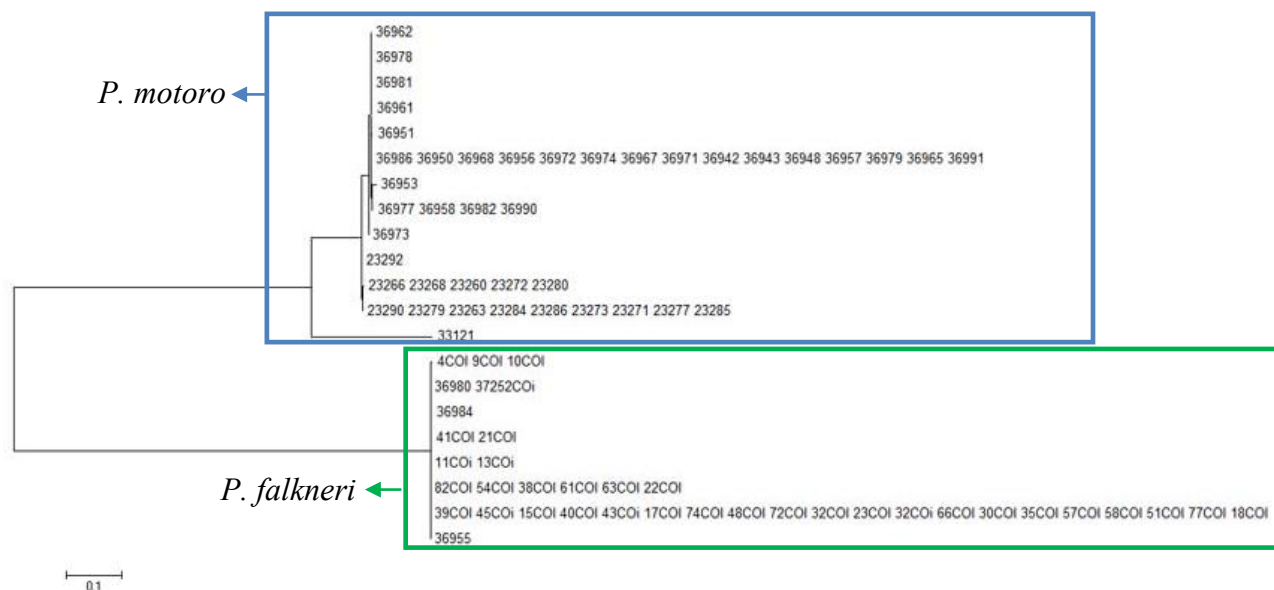


Figura 1. Dendrograma obtido por Neighbour-joining (MEGA 4.0) a partir das sequências do gene COI em espécimes de raias das espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* capturadas em componentes da bacia do Rio Paraná.

ATPase - Foram amplificados e sequenciados fragmentos de DNA correspondentes à região *ATPase* 6/8 de 91 exemplares de *Potamotrygon motoro* e 75 exemplares de *P. falkneri*. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 1.000pb e após o alinhamento, foram obtidas sequências consenso de 720pb em ambas espécies. A média da composição nucleotídica em *P. motoro* foi de 31,6% de Adenina, 32,2% de Citosina, 9,4% de Guanina e 26,8% de Timina. Em *P. falkneri* a média da composição nucleotídica foi de 29% de Adenina, 32% de Citosina, 12,8% de Guanina e 26,2% de Timina. Na espécie *P. motoro*, foram identificados quatro haplótipos compartilhados por todas as amostras analisadas, apresentando baixos índices de diversidade nucleotídica. Em *P. falkneri* foram detectados cinco haplótipos, sendo todos compartilhados pelas três amostras amostradas (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados da análise do gene *ATPase* 6/8 em indivíduos das espécies de raias *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. N- número de indivíduos, H – número de haplótipos, HD – diversidade haplotípica, PI – diversidade nucleotídica.

Localidade	<i>Potamotrygon motoro</i>				<i>Potamotrygon falkneri</i>			
	N	H	HD	PI	N	H	HD	PI
Foz do Iguaçu - PR	29	4	0.1250	0.0009	-	-	-	-
Porto Maringá – PR	16	4	0.0981	0.0007	-	-	-	-
Porto Camargo – PR	-	-	-	-	19	3	0.3000	0.0010
Porto Rico – PR	-	-	-	-	20	3	0.2891	0.0006
Ilha Solteira – SP	31	4	0.0877	0.0009	36	2	0.1542	0.0009
Sucuriú - MS	15	4	0.0788	0.0006	-	-	-	-

Cyt b - Foi amplificado e sequenciado um segmento parcial do gene Citocromo b (*Cyt b*) de 106 exemplares de *Potamotrygon motoro* e 88 exemplares de *P. falkneri*. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 800pb. Após realização do alinhamento foi obtida uma sequência de 609pb para ambas as espécies, que em *P. motoro* apresentou frequências nucleotídicas de 29% de Adenina, 28% de Timina, 30% de Citosina e 12% de Guanina e em *P. falkneri* as frequências nucleotídicas foram de 22% de Adenina, 22% de Timina, 32% de Citosina e 24% de Guanina. Na espécie *P. motoro*, a localidade que apresentou maior diversidade haplotípica foi

a de Foz do Iguaçu (FI) com cinco haplótipos, todos compartilhados com Porto Maringá (PM) e quatro haplótipos compartilhados com Ilha Solteira (IS) e Rio Sucuriú (SU). Em *P. falkneri*, a localidade PC apresentou quatro haplótipos, sendo compartilhados com Porto Maringá (PM) e três haplótipos compartilhados com Ilha Solteira (IS) (Tabela 2).

D-loop - Foram amplificados e sequenciados fragmentos de mtDNA correspondentes à região controle (D-loop) de 78 exemplares de *Potamotrygon motoro* e 64 exemplares de *P. falkneri*. A amplificação resultou em um fragmento de aproximadamente 800pb. Após o alinhamento, foram obtidas sequências consenso de 521pb. Em *P. motoro*, a média da composição nucleotídica foi de 29,0% de Adenina; 19,4% Citosina; 18,7% Guanina e 32,4% para Timina. O DNA de *P. falkneri* apresentou média da composição nucleotídica de 24% de Adenina; 18,5% Citosina; 27,4% Guanina e 30,1% para Timina. Os índices de diversidade nucleotídica e número de haplótipos foram relevantes para ambas as espécies (Tabela 3 e figura 2).

Tabela 2 – Resultados da análise do gene Cyt b em indivíduos das espécies de raias *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. N- número de indivíduos; H – número de haplótipos; HD – diversidade haplotípica, PI – diversidade nucleotídica.

Localidade	<i>Potamotrygon motoro</i>				<i>Potamotrygon falkneri</i>			
	N	H	HD	PI	N	H	HD	PI
Foz do Iguaçu – PR	31	5	0.3801	0.0011	-	-	-	-
Porto Maringá – PR	17	5	0.0874	0.0008	-	-	-	-
Porto Camargo – PR	-	-	-	-	19	4	0.3940	0.0012
Porto Rico – PR	-	-	-	-	20	3	0.2752	0.0009
Ilha Solteira – SP	37	5	0.2145	0.0010	36	2	0.2310	0.0009
Sucuriú - MS	18	5	0.1974	0.0009	-	-	-	-

Os índices de *Fst* em populações de *Potamotrygon motoro* foram relativamente baixos, indicando pouca diferenciação genética entre as amostras analisadas (Tabela 4). *P. falkneri* apresentou índices de *Fst* mais altos, porém ainda indicando fraca estruturação genética (Tabela 5).

Tabela 3 – Resultados da análise da região controle (D-loop) em indivíduos das espécies de raias *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. N- número de indivíduos; H – número de haplótipos; HD – diversidade haplotípica, PI – diversidade nucleotídica.

Localidade	<i>Potamotrygon motoro</i>				<i>Potamotrygon falkneri</i>			
	N	H	HD	PI	N	H	HD	PI
Foz do Iguaçu - PR	24	8	0.4050	0.0018	-	-	-	-
Porto Maringá – PR	18	8	0.1090	0.0007	-	-	-	-
Porto Camargo – PR	-	-	-	-	19	7	0.4001	0.0019
Porto Rico – PR	-	-	-	-	17	4	0.2891	0.0006
Ilha Solteira – SP	23	5	0.2117	0.0012	28	2	0.1542	0.0010
Sucuriú - MS	13	5	0.2487	0.0010	-	-	-	-

Tabela 4 – Diferenciação genética F_{st} entre os pares de populações de *Potamotrygon motoro*, com base na região controle (D-loop). Nível de significância de $p < 0,05$, * dados significativos. Localidades FI – Foz do Iguaçu, PM – Porto Maringá, IL – Ilha Solteira, SU – Sucuriú.

	FI	PM	IS	SU
FI	-			
PM	0.010	-		
IS	*0.051	0.025	-	
SU	0.045	0.028	0.009	-

Tabela 5 – Diferenciação genética F_{st} entre os pares de populações de *Potamotrygon falkneri*, com base na região controle (D-loop). Nível de significância de $p < 0,05$ em 16.000 permutações, * dados significativos. Localidades PC – Porto Camargo, PR – Porto Rico, IS – Ilha Solteira.

	PC	PR	IS
PC	-		
PR	0.011	-	
IS	*0.052	0.044	-

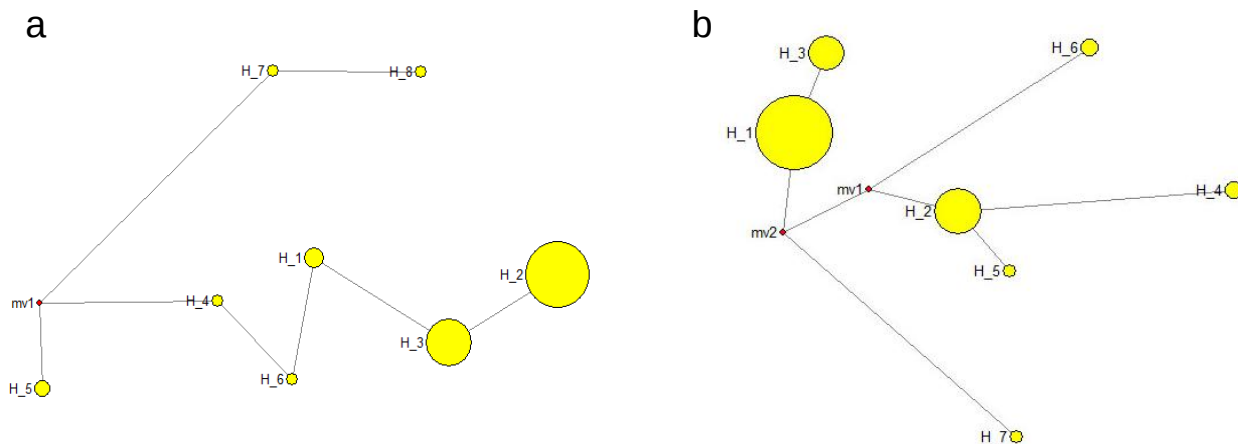


Figura 2 – Rede de haplótipos das espécies de raias *Potamotrygon motoro* (a) e *P. falkneri* (b) a partir de sequências da região controle (D-loop). Os círculos estão apresentados em proporção correspondente às frequências haplotípicas.

Marcadores microsatélites

Potamotrygon motoro

Genótipos de 110 espécimes resultantes de 4 amostragens obtidas em localidades componentes da bacia do Rio Paraná foram analisados. Nove entre os 10 *loci* analisados de microsatélites mostraram-se polimórficos. Um total de 34 alelos foi detectado para todos os *loci* em todas as amostragens. O número de alelos por *loci* variou de 2 (Pm_5, Pm_17, Pm_21, Pm_25) a 10 (Pm_18), com 3,4 alelos como média geral (Tabela 6).

Foram identificados 13 alelos privados, sendo 6 destes alelos com frequência acima de 0,05 (Anexo 11). Os índices de *Ho* e *He* variaram de 0.079 (Pam_21, Pm_25) a 0.800 (Pm_8) e de 0.076 (Pm_21,m_25) a 0.746 (Pm_18), respectivamente (Tabela 6). Das 36 estimativas de *FIS*, 9 apresentaram valores positivos, identificando deficiência de heterozigotos e 21 apresentaram valores negativos, que correspondem a excesso de heterozigotos.

A hipótese nula (H_0) de Equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aceita em 33 das 36 estimativas, com valores significantes de $P > 0.001$ após correção de Bonferroni. Assim, foi verificada significância de desvio em 3 estimativas, todas no *loci* Pm_16 (Tabela 6).

Em todas as ocorrências, os valores significantes de desequilíbrio estavam associados à presença de alelos nulos (Tabela 6). Não foi observada evidência de desequilíbrio de ligação em quaisquer dos *loci* analisados, permitindo com que a variação alélica fosse tratada como independente.

A média geral para todos os *loci* e em todas as populações foi de $FIS = 0.180$ com $P < 0.008$ (Tabela 7). A diversidade genética total de FIT variou de -0.293 (Pm_18) a 0.277 (Pm_16) (Tabela 7).

Tabela 6. Dados de nove *loci* microssatélites para cada amostra de *Potamotrygon motoro* analisada. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; FIS = índice de fixação (endogamia); EHW = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,01$ ajustados com a correção de Bonferroni; R = frequência de alelos nulos por *loci*.

População	<i>Loci</i>								
	Pm_5	Pm_8	Pm_11	Pm_12	Pm_16	Pm_17	Pm_18	Pm_21	Pm_25
FI									
N	37	37	36	38	38	37	37	38	38
Na	2	5	3	2	3	2	7	2	2
Ho	0,514	0,649	0,222	0,368	0,316	0,108	0,595	0,079	0,079
He	0,407	0,615	0,200	0,361	0,514	0,102	0,669	0,076	0,076
FIS	-0,263	-0,054	-0,110	-0,019	0,386	-0,057	0,111	-0,041	-0,041
HWE	0,109	0,797	0,905	0,906	*0,000	0,728	0,401	0,800	0,800
R	-	-	-	-	0,2284	-	-	0,0704	-
PM									
N	17	18	18	16	21	16	15	20	19
Na	2	3	2	2	3	2	3	1	1
Ho	0,409	0,612	0,403	0,254	0,371	0,300	0,555	0,000	0,000
He	0,321	0,555	0,481	0,199	0,422	0,462	0,670	0,000	0,000
FIS	-0,200	-0,151	0,110	-0,134	-0,180	-0,300	0,140	0,000	0,000
HW									
R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IS									
N	29	30	31	31	28	30	30	31	31
Na	2	4	2	2	5	2	6	1	1
Ho	0,414	0,800	0,226	0,323	0,393	0,500	0,600	0,000	0,000
He	0,400	0,704	0,331	0,312	0,692	0,375	0,746	0,000	0,000
FIS	-0,036	-0,136	0,319	-0,033	0,432	-0,333	0,196	0,000	0,000
HW	0,847	0,486	0,076	0,853	*0,000	0,068	0,009	0	0
R	-	-	-		0,1895	0,2792	-	0,1072	-
SU									
N	17	18	18	16	21	16	15	20	19
Na	2	4	2	2	3	2	3	1	1
He	0,412	0,667	0,444	0,188	0,524	0,750	0,533	0,000	0,000
Ho	0,327	0,568	0,494	0,170	0,452	0,469	0,651	0,000	0,000
FIS	-0,259	-0,174	0,100	-0,103	-0,158	-0,600	0,181	0,000	0,000
HW	0,285	0,763	0,671	0,679	*0,000	0,016	0,568	0	0
R	-	-	-	0,0526	0,0920	-	-	-	-

Tabela 7. Índices de fixação *FIS*, *FIT*, *Fst* e *Rst* em *Potamotrygon motoro*.

	<i>FIS</i>	<i>FIT</i>	<i>Fst</i>	<i>Rst</i>
Pm_5	-0,182	-0,174	0,006	0,379
Pm_8	-0,121	0,032	0,136	0,009
Pm_11	0,130	0,222	0,106	0,047
Pm_12	-0,041	-0,015	0,025	0,148
Pm_16	0,257	0,277	0,027	-0,012
Pm_18	-0,436	-0,293	0,080	0,127
Pm_17	0,164	0,198	0,041	0,182
Pm_21	-0,041	-0,013	0,027	0,023
Pm_25	-0,041	-0,013	0,027	0,080
Média	-0,035	0,024	0,050	0,119

O índice de diferenciação genética *Fst* entre as amostras de *Potamotrygon motoro* para todos os *loci* não foi significativo, com média de $Fst = 0.05$, sugerindo uma baixa diferenciação populacional. A análise do índice *Fst* par-a-par para as populações também evidenciou valores relativamente baixos, variando de 0.008 (FI com PM) a 0.068 (FI com SU) (Tabela 8). O índice de diferenciação genética *Rst* total evidenciou valores relativamente mais elevados para todos os *loci*, com média de $Rst = 0.119$. O mesmo índice par-a-par também apresentou valores mais elevados entre as amostras, variando de 0.021 (FI com PM) a 0.132 (FI com SU).

Tabela 8. Índices comparativos de fixação *Fst* (acima) e *Rst* (abaixo) entre cada localidade de *Potamotrygon motoro*.

	FI	PM	IS	SU
FI	-	0,008	0,042	0,068
PM	0,021	-	0,021	0,037
IS	0,078	0,034	-	0,018
SU	0,132	0,087	0,023	-

A análise de variância molecular (AMOVA) considerando todas as amostras revelou que a maior parte da variância total ocorreu dentro destas, com $Fst = 92.0\%$, enquanto que a variância

entre as amostras foi de apenas 8.0%. Quando utilizado o índice *Rst*, a variação genética dentro das amostras mostrou valor inferior (88.0%) ao do *Fst*, enquanto a variação entre estas aumentou consideravelmente (12.0%). A ausência de estruturação genética entre as amostras foi confirmada pela análise bayesiana pelo STRUCTURE, evidenciando a existência de uma única unidade panmítica, como evidenciado pela distribuição igual das probabilidades no gráfico apresentado na Figura 3. Os valores de distância genética de *chord* (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) foram estimados par-a-par e variaram de 0.051 (FI – PM) a 0.186 (FI – SU) (Tabela 9).

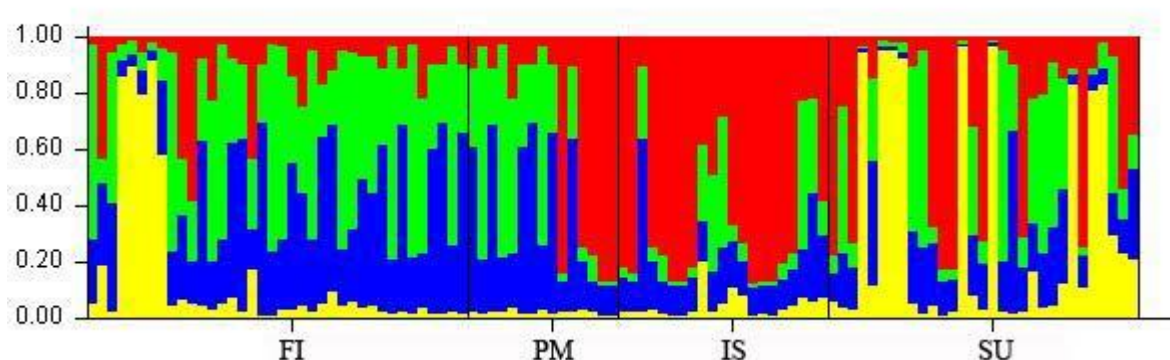


Figura 3. Gráfico de barras representando a análise bayesiana e evidenciando a ausência de estruturação entre as quatro amostragens de *Potamotrygon motoro* na bacia do Rio Paraná. FI – Foz do Iguaçu, PM – Porto Maringá, IS – Ilha Solteira, SU – Sucuriú.

Tabela 9. Valores de distância genética de *chord* (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) entre todas as localidades analisadas de *Potamotrygon motoro*.

	FI	PM	IS	SU
FI				
PM	0,051	-		
IS	0,162	0,107	-	
SU	0,186	0,121	0,073	-

Potamotrygon falkneri

Genótipos de 77 espécimes resultantes de 3 amostragens obtidas em localidades componentes da bacia do Rio Paraná foram analisados. 6 *loci* analisados de microssatélites mostraram-se polimórficos. Um total de 32 alelos foi detectado para todos os *loci* em todas as

amostragens. O número de alelos por locus variou de (Pm_10) a 11 (Pm_11) com 3,66 alelos como média geral (Tabela 10). Foram identificados 14 alelos privados, sendo que 9 alelos apresentaram frequência acima de 0.05 (Anexo 12).

Tabela 10. Dados de seis *loci* microssatélites para cada amostra de *Potamotrygon falkneri* analisada. PR – Porto Rico, PM – Porto Maringá, *N* = número de indivíduos; *Na* = número de alelos; *Ho* = heterozigosidade observada; *He* = heterozigosidade esperada; *FIS* = índice de fixação (endogamia); *EHW* = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,01$ ajustados com a correção de Bonferroni; *R* = frequência de alelos nulos por *loci*.

Populações	<i>Loci</i>					
	Pm_5	Pm_8	Pm_10	Pm_11	Pm_12	Pm_16
PC						
N	20	20	18	19	21	20
Na	3	5	5	11	4	6
Ho	0,412	0,883	0,063	0,789	0,750	0,340
He	0,750	0,670	0,410	0,898	0,885	0,590
<i>FIS</i>	0,051	-0,244	0,879	-0,274	0,152	0,280
HWE	*0,004	0,303	*0,001	0,591	0,392	0,700
R	0.8315	-	0.1667	0.1900	-	-
PR						
N	17	18	18	18	18	18
Na	2	3	2	5	3	2
Ho	0,309	0,877	0,120	0,781	0,619	0,350
He	0,780	0,670	0,570	0,633	0,711	0,490
<i>FIS</i>	0,121	-0,244	0,879	-0,171	0,180	0,271
HW	*0,009	0,303	0,023	0,291	0,200	0,240
R	0.2611	-	-	-	-	-
IS						
N	38	38	36	38	37	37
Na	2	5	1	3	2	3
Ho	0,514	0,510	0,000	0,222	0,368	0,316
He	0,707	0,615	0,000	0,200	0,361	0,514
<i>FIS</i>	-0,263	-0,054	0,000	-0,110	-0,019	0,386
HW	0,109	0,797	0	0,905	0,906	0,000
R	-	-	-	-	-	-

Os índices de *Ho* e *He* variaram de 0.222 (Pm_11) a 0.889(Pm_11) e de 0.200 (Pm_11) a 0.885 (Pm_12) (Tabela 10). A hipótese nula (*H0*) de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aceita em 16 das 18 estimativas, com valores significantes de $P > 0,010$ após correção de Bonferroni. Assim, foi verificada significância de desvio em 2 estimativas, nos *loci* Pm_5 e Pm_10 (Tabela 10). Em todas as ocorrências os valores significantes de desequilíbrio estavam associados à presença de alelos nulos. Não foi observada evidência de desequilíbrio de ligação em quaisquer dos *loci* analisados ($P > 0.05$), permitindo com que a variação alélica fosse tratada como independente.

Das 18 estimativas de *FIS*, 11 apresentaram valores positivos, identificando deficiência de heterozigotos e 7 apresentaram valores negativos que correspondem a excesso de heterozigotos. A média geral para todos os *loci* e em todas as populações de *FIS* foi de -0.236 (Tabela 11). A diversidade genética total de *FIT* variou de *FIT* = -0,307 (Pm_11) a 0.316 (Pm_10) (Tabela 11).

O índice de diferenciação genética *Fst* entre as populações de *Potamotrygon falkneri* foi inicialmente significativo, com média de *Fst* = 0.15, sugerindo a ocorrência de diferenciação populacional. A análise do índice *Fst* par-a-par para todas as populações mostrou valores variando de 0.051 (PC com PR) a 0.279 (PC com IS) (Tabela 12). O índice de diferenciação genética *Rst* total, realizado com base no modelo SMM evidenciou valores relativamente mais elevados, com média de *Rst* = 0.441. O mesmo índice par-a-par também apresentou valores mais elevados entre as populações, variando de 0.102 (PC com PR) a 0.586 (PC com IS).

Tabela 11. Valores dos índices de fixação *FIS*, *FIT*, *Fst* e *Rst* em *Potamotrygon falkneri*.

	<i>FIS</i>	<i>FIT</i>	<i>Fst</i>	<i>Rst</i>
Pm_5	-0,258	-0,153	0,083	0,226
Pm_8	-0,353	-0,289	0,047	0,492
Pm_10	-0,342	0,316	0,491	0,579
Pm_11	-0,375	-0,307	0,049	0,167
Pm_12	-0,047	0,072	0,113	0,117
Pm_16	-0,041	0,120	0,155	0,020
Média	-0,236	-0,040	0,156	0,441

Tabela 12. Valores dos índices de fixação *Fst* (acima) e *Rst* (abaixo) comparativos entre as localidades de *Potamotrygon falkneri*.

	PC	PR	IS
PC	-	0,051	0,279
PR	0,102	-	0,095
IS	0,586	0,290	-

A análise de variância molecular (AMOVA) considerando todas as populações revelou que a maior parte da variância total ocorreu dentro das amostras, com $F_{st} = 78.0\%$, enquanto que a variância entre as amostras foi de apenas 22.0% . Quando utilizado o índice R_{st} , a variação genética dentro das populações foi inferior (55.0%) ao F_{st} e a variação entre as amostras aumentou consideravelmente (45.0%). A estruturação genética das populações foi confirmada pela análise bayesiana pelo STRUCTURE, evidenciando a existência de três populações inicialmente estruturadas (Figura 4). Os valores de distância genética de *chord* (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) foram estimados par-a-par e se apresentaram relativamente altos, variando de 0.144 (PC – PR) a 0.491 (PR – IS). A Tabela 13 mostra os índices de distância genética para todos os *loci* em todas as populações de *Potamotrygon falkneri*.

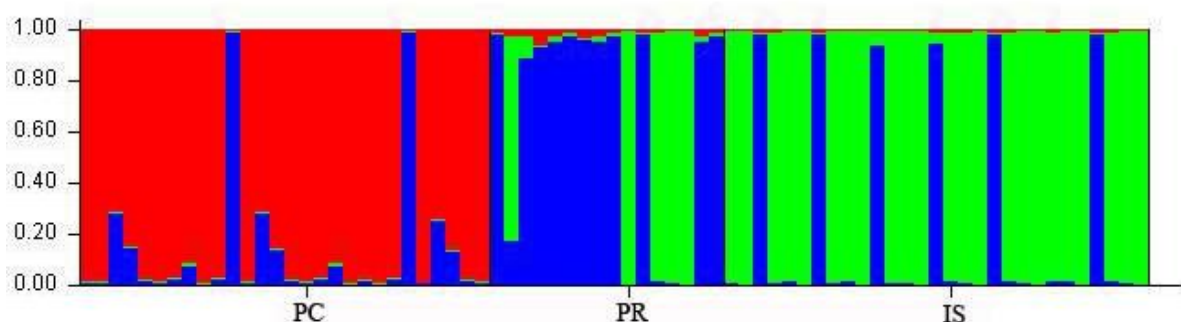


Figura 4. Gráfico de barras representando a análise bayesiana e evidenciando uma moderada estruturação entre as três amostras de *Potamotrygon falkneri* na bacia do Rio Paraná. PC – Porto Camargo, PR – Porto Rico, IS – Ilha Solteira.

Tabela 13. Valores de distância genética de *chord* (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) entre todas as localidades de *Potamotrygon falkneri*.

	PC	PR	IS
PC	-		
PR	0,144	-	
IS	0,491	0,310	-

Discussão

Padrões genético-populacionais o mtDNA encontrados em Potamotrygon motoro e P. falkneri

As divergências genéticas encontradas para o gene COI entre as espécies em estudo foram compatíveis com as divergências interespecíficas de acordo com os critérios do *barcoding* (Hebert et al. 2003). A distância genética média entre indivíduos da mesma espécie foi geralmente menor do que a média de distância genética entre indivíduos de espécies distintas, como identificado em outras espécies de raias de água-doce (Toffoli et al. 2008).

Os valores de diferenciação genética populacional encontrados nas análises das sequências ATPase 6/8 não foram significativos em ambas as espécies em estudo. Em trabalho realizado por Frederico et al. (2012) com populações da raia *Paratrygon aiereba* na Amazônia foram encontrados valores significativos de diversidade genética populacional. Provavelmente este seja um indicativo de que as frequências haplotípicas para ATPase 6/8 em raias da bacia do Rio Paraná sejam mais conservadas e que estas populações ainda estejam em processo de diferenciação genética.

Em estudos de diversidade genética realizados em Chondrichthyes, Schluessel et al. (2010) encontraram grande variabilidade com relação ao gene Cyt-b, sugerindo que este poderia ser apropriado como um marcador molecular. Entretanto, os índices de diversidade nucleotídica e haplotípica encontrados para as duas espécies no presente estudo foram extremamente baixos, uma vez que variaram de 0.0009 a 0.0011 em *P. motoro* e 0.0009 a 0.0012 em *P. falkneri*. Pereyra et al. (2010), ao realizarem estudos de identificação molecular em peixes da bacia do Alto Rio Paraná também encontraram baixa diversidade genética na espécie *M. schmitti* (0.0015).

Estudos utilizando o segmento D-loop do DNA mitocondrial têm se mostrado muito eficientes em análises populacionais de tubarões e raias marinhas (Heist 2004, Mendonça et al. 2009). No entanto, existe apenas um estudo populacional utilizando este eficiente marcador molecular com raia de água-doce na Bacia do Rio Paraná (Maniglia 2010). Os resultados do presente trabalho corroboram a hipótese proposta por este autor, segundo a qual a espécie *Potamotrygon motoro* apresentou uma baixa taxa de divergência genética entre as amostras analisadas com relação à diversidade nucleotídica, que variou de 0.0009 à 0.0018, tendo a população FI apresentado os valores

mais elevados de diversidade. Em *P.falkneri*, a amostra da localidade PC apresentou os maiores valores de diversidade haplotípica (0.0008 a 0.0019) em relação às demais.

Quando foram realizadas comparações de todos os genes mitocondriais aqui estudados, a região controle apresentou-se como a mais informativa, sendo o índice *Fst* na espécie *P. falkneri* mais significativo quando comparado à *P. motoro*. Porém, os resultados obtidos não permitiram diferenciar as populações colonizadoras para ambas as espécies, pois muitos haplótipos são ainda compartilhados entre elas.

Em peixes cartilaginosos, a taxa de substituição em genes mitocondriais é de sete a oito vezes mais lenta que em primatas ou ungulados, provavelmente devido à existência de menores taxas metabólicas (Martin et al. 1993). Em geral, a região controle é uma região bastante variável do mtDNA. Segundo Donaldson & Wilson (1999), este sítio tem sido a região mais frequentemente utilizada em estudos genéticos de peixes, seja no estabelecimento de relações interespecíficas como filogenias (e.g. Koblmuller et al. 2006; Bremer et al. 1997) ou intraespecíficas, como em estudos de genética populacional (e.g. Bay et al. 2004, Dudgeon et al. 2000, Rocha-Olivares et al. 2000).

Utilizando o mtDNA, os resultados do presente trabalho indicam a ausência de estruturação populacional entre as populações de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* nas amostras analisadas ao longo do Rio Paraná. A ausência de estruturação nas populações analisadas pode ser explicada por duas hipóteses: as populações analisadas estariam proximamente ligadas, existindo fluxo gênico entre elas e que o pouco tempo de colonização causado pelas barragens, provavelmente pode não ter sido suficiente para estabelecer diferenciação genética entre as populações; uma segunda explicação possível seria a de que a ausência de estruturação populacional seria consequência da escolha de um marcador que não apresentou sensibilidade suficiente para a detecção de eventos de colonização recente ocorridos nos últimos 30 anos, com o término da construção da Hidrelétrica de Itaipu, como no presente caso. Assim um marcador genético com taxa de evolução mais rápida, como os microssatélites, poderia auxiliar com mais acuracidade a detecção de diferenciação populacional intraespecífica nas raías invasoras da bacia do alto Rio Paraná.

Padrões genético-populacionais (microsatélites)

Os níveis de variabilidade dos *loci* microsatélites em *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* na bacia do Rio Paraná apresentaram uma média de 3.40 e 3.68 alelos por *loci* respectivamente, valores estes inferiores quando comparados com espécies de peixes teleósteos de água doce que apresentam média de 9.1 alelos por *loci* (DeWoody & Avise 2000, Oliveira et al. 2009). O baixo grau de polimorfismo pode ser explicado mais uma vez pela baixa taxa mutacional detectada em várias espécies de Chondrichthyes (Martin et al. 1992).

Os resultados obtidos no presente trabalho utilizando microsatélites em *Potamotrygon motoro* corroboram aqueles detectados com o uso de mtDNA, onde as localidades amostradas não apresentaram estruturação genética; já em *P. falkneri* os resultados encontrados foram diferentes, sendo que com o marcador microsatélite foi possível identificar diferentes genótipos nas amostragens realizadas.

De acordo com Wright (1978), índices *Fst* com valores abaixo de 0.05 indicam pequena diferenciação genética; entre 0.05 e 0.15, moderada diferenciação; entre 0.15 e 0.25, grande diferenciação; e para valores acima de 0.25, diferenciação muito elevada. Índices significativamente baixos de diferenciação populacional foram detectados entre as quatro amostras analisadas de *Potamotrygon motoro* provenientes da bacia do Rio Paraná, como indicado por diferentes testes estatísticos nos quais o índice *Fst* mostrou valor inferior (0.05) quando comparado ao *Rst* (0,11).

Em amostragens de *Potamotrygon falkneri*, o *Fst* apresentou índices mais significativos (0.15), indicando uma diferenciação moderada entre as três amostragens, o que foi também comprovado por outros testes estatísticos, onde novamente o índice *Rst* apresentou valores mais elevados (0.441) quando comparado com o *Fst*. Os índices estatísticos utilizados neste trabalho são baseados em modelos de mutações distintas, sendo o *Fst* associado ao IAM e o *Rst* associado ao SMM. É esperado que os valores de *Rst*, sob o modelo SMM, sejam mais elevados que os valores de *Fst* (Slatkin 1995), embora o inverso já tenha sido verificado em outras espécies de peixes (e.g. Pereira et al. 2009).

Potamotrygon motoro

Embora a média dos índices de *Fst* da espécie *Potamotrygon motoro* terem apresentado baixa diferenciação populacional, nossos resultados demonstram uma pequena diferenciação genética baseada em valores *Fst* par-a-par entre amostras da região de Foz do Iguaçu (FI) e Sucuriú (SU), e apresentaram distintos alelos privados em cada amostragem (ANEXO 11).

Desvios significantes no EHW ($P < 0,01$ após correção de Bonferroni) foram encontrados em apenas três estimativas, mostrando que a grande maioria das populações (91,7%) estão em equilíbrio. Desvios de HWE são comuns em regiões microssatélites (Alam & Islam 2005, Carreras-Carbonell et al. 2005, Chevolut et al. 2006). Causas de desvios de EHW podem estar associadas ao alto número de alelos por locus, ocorrência de alelos nulos, *stuttering* ou *drop-out*, efeito Wahlund, seleção de alelos específicos e endocruzamento (Pereira et al. 2009). A hipótese de ocorrência de alelos nulos e *stuttering* serem os causadores dos desvios parece ser a mais provável, uma vez que em todas as estimativas com desvios significantes de HWE em nossos resultados, existe ocorrência de alelos nulos.

Em 66% de nossas estimativas, os valores de heterozigosidade observada foram maiores que o esperado, indicando que essas populações não apresentam deficiência de heterozigotos, e que os acasalamentos são randômicos dentro e entre as populações. Os baixos índices de homozigosidade e altos índices de heterozigotos em relação ao esperado e F_{IS} negativo dão indícios da ocorrência de um efeito gargalo (*bottleneck*) recente, como o encontrado em *Potamotrygon motoro*, que apresentou 70% das estimativas F_{IS} negativo, porém a alta frequência de heterozigotos também está associada a altas taxas de sobrevivência, crescimento, resistência a doenças.

Resultados interessantes referem-se às comparações par-a-par com o índice *Rst*, as quais apresentaram níveis moderados de estruturação (Tabela 8). Estes valores foram detectados entre os indivíduos de FI e IS (0.078), entre FI e SU (0.132), entre PM e SU (0.087), enquanto que entre FI e PM, que caracterizam localidades com menor distância geográfica, os valores encontrados foram menores (0.021), bem como entre PM e SI (0.034). Pode ser sugerido então que, com base nos valores *Rst* as populações de localidades mais distantes geograficamente entre si possuem uma moderada estruturação do que em relação às amostras coletadas mais proximamente.

A distância genética de *chord* revelou valores similares aos detectados pelo cálculo do índice *Rst* par-a-par, quando realizadas comparações entre FI e as demais localidades. Para ambos os índices (*Fst* e *Rst*) de AMOVA, a variação interpopulacional apresentou-se mínima (8.0% à 12.0%), enquanto a variação detectada dentro das localidades foi significativamente expressiva (73.0% à 88.0%). Estes resultados indicam que as amostras pertencentes ao médio Rio Paraná (Foz do Iguaçu) não estão isoladas das populações colonizadoras.

Outra questão interessante refere-se à forma homogênea ou proporcional com que os genótipos estão distribuídos ao longo do Rio Paraná, sugerindo diferentes hipóteses. Segundo uma delas, haveria uma situação de estabilidade ao longo da região de ocorrência das espécies, refletindo o perfil genético da grande população ancestral. Por outro lado, pode ser considerado que a contribuição da população colonizadora em diferentes momentos sucessivos, possivelmente com eventos de introduções múltiplas ou invasões em grupo de indivíduos com a mesma origem, poderiam ter diluído substancialmente o efeito gargalo (Kolbe et al. 2004). Assim, poderia ser provável que as populações de *Potamotrygon motoro* estejam ainda em um processo inicial de diferenciação genética, mas que no momento existiria apenas uma unidade panmítica desta espécie. Uma terceira hipótese que não pode ser descartada seria a de que a colonização de novos ambientes estaria ocorrendo de forma massal, com a perda eventual de alguns haplótipos específicos.

Potamotrygon falkneri

Os valores encontrados nas comparações de *Fst* par-a-par na espécie *P. falkneri* apresentaram índices relevantes entre as três localidades em estudo. Foi possível observar diferentes índices entre as amostragens de acordo com a distância geográfica, sendo que as amostras de PC e PR, que foram coletadas em locais de menor distância geográfica, apresentaram menor índice *Fst*, enquanto entre PC e IS, que possuem uma maior distância geográfica, os índices foram maiores. Segundo Frankham et al. (2004), os riscos relacionados com a distância geográfica de uma população estão associados com a quantidade de fluxo gênico existente entre as partes distantes e com a capacidade de migração dos indivíduos, sendo assim, quanto menor for o fluxo entre as populações, maiores serão os riscos de perda de variabilidade.

A presença de alelos privados foi identificada em todas localidades, sendo que PC apresentou 10 alelos privados, PR apresentou 2 alelos privados e IS apresentou 2 alelos privados (ANEXO 12). A perda de alelos privados pode ser resultado de um evento de gargalo populacional, que provavelmente ocorreu ao longo do processo de invasão. Apesar disso, o número efetivo da população colonizadora na região de IS é mais elevado quando comparado com a região de PC, indicando que apesar da perda de alelos privados, essas populações podem estar em extensivo processo de expansão. No entanto, em 50% das estimativas calculadas, os valores de heterozigosidade observados foram menores que o esperado, com resultados de F_{IS} positivos, sugerindo uma pequena deficiência de heterozigotos nas populações. A deficiência de heterozigotos é bastante comum em peixes e frequentemente tem sido associada à ocorrência de subdivisão populacional (efeito Wahlund) e à endogamia (O'Connell & Wright 1998).

Desvios significantes no EHW ($P < 0,01$ após correção de Bonferroni) foram encontrados em apenas três estimativas, mostrando que a grande maioria das amostragens (91.7%) estão em equilíbrio. A hipótese de ocorrência de alelos nulos, *stuttering* e efeito wahlund (subdivisão das populações) parecem ser a causa dos desvios de EHW, uma vez que nas três estimativas com desvios significantes, existe a ocorrência de alelos nulos e índice F_{IS} positivo.

Os resultados detectados em comparações par-a-par com o índice Rst corroboraram os valores encontrados para o índice de Fst , nas quais as amostragens apresentaram níveis moderados de estruturação (Tabela 8). Esses valores foram detectados entre a os indivíduos de PC e PR (0.102), entre PC e IS (0.586) e entre PR e IS (0.290). A distância genética de *chord* também corrobora valores detectados no índice Rst par-a-par, entre PC e as demais localidades. A estimativa da variação interpopulacional obtida pela AMOVA com o índice Fst (20.0%), apresentou valores menores quando comparada com o valor de Rst (45%). A variação detectada dentro das amostragens também foi distinta em ambos os índices, sendo que em Fst foi de 78.0% e em Rst de 55.0%. Estes resultados mostram que indivíduos pertencentes à região de Porto Camargo (PC) no Rio Paraná, possuem um inicial isolamento genético entre as populações colonizadoras.

A distância geográfica entre as populações pode ser um fator de grande importância nas comparações, atentando para o fato de que podem resultar em diminuição do fluxo gênico e,

naturalmente, determinar a perda de variabilidade genética, como verificado em relação aos índices de alelos privados. Porém, devido à capacidade de adaptação e estabelecimento na região colonizada, no caso Ilha Solteira, pode propiciar também a chance de ocorrer uma expansão populacional, como identificado pelo índice N_e .

Conclusão

Os resultados obtidos para as duas espécies de raias de água doce, *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*, de ocorrência em simpátria nos componentes da bacia hidrográfica do Rio Paraná são similares nas análises moleculares envolvendo marcadores genéticos do mtDNA, onde não foi detectada diferenciação genética significativa entre as localidades amostradas.

Com base nos resultados obtidos com marcadores nucleares do tipo microssatélite em *P. motoro* e utilizando os índices de diferenciação genética, AMOVA, fluxo gênico, distância genética e análise bayesiana, foi possível concluir que a espécie *P. motoro* é representada por apenas uma unidade reprodutiva panmítica em toda sua área de distribuição na bacia do Rio Paraná, desde a região do lago de Itaipú até Ilha Solteira-SP, não ocorrendo perda de variabilidade genética durante o processo de colonização.

Já para a espécie *P. falkneri*, todos os índices estatísticos usados com marcadores nucleares do tipo microssatélite revelaram uma elevada diferenciação entre as três populações amostradas. Uma significativa perda de variabilidade genética foi detectada nas populações colonizadoras, à medida que se distanciam da população basal existente nas localidades mais abaixo da bacia hidrográfica. As populações colonizadoras apresentam, porém, um número populacional efetivo elevado, indicando que a espécie se encontra em um possível processo de expansão populacional.

Capítulo III

Primeiro registro de hibridação entre espécies de raias de água doce *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) na bacia do Rio Paraná, Brasil.

Resumo

Na bacia hidrográfica do Rio Paraná, as espécies de raias *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* ocorrem com maior abundância e ambas possuem características fenotípicas únicas. *P. motoro* apresenta um padrão marron ou cinza, com presença de fileiras de ocelos tricolores distribuídos por todo o disco corporal, sendo estes ocelos constituídos de pequena mancha central amarela envolta por um anel laranja intermediário e um anel periférico negro. *P. falkneri* apresenta na superfície do disco dorsal uma coloração de fundo marrom escuro que pode variar em tons claros, com numerosos e pequenos ocelos redondos ou ovais de tom laranja ou manchas amarelas distribuídos por todo o dorso. Contudo, em coletas realizadas ao longo do rio Paraná, foram encontrados espécimes com total ausência de ocelos. Diante da história de ocorrência de um processo de invasão e colonização concomitante das espécies de raias de água doce na bacia do Rio Paraná, foi realizada a análise molecular comparativa das espécies existentes e dos tipos diferenciados de coloração, utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, para detecção da possível ocorrência de híbridos. Os resultados das análises dos espécimes com ausência de ocelos na região dorsal permitiram sua identificação como *P. motoro*, ampliando ainda mais os casos de policromatismo desta espécie. Porém, outros indivíduos amostrados e identificados com padrão fenotípico de *P. motoro* apresentaram mtDNA de *P. falkneri* e DNA nuclear de *P. motoro*, confirmando a existência de híbridos entre as duas espécies neste ambiente.

Introdução

As raias da família Potamotrygonidae são os únicos elasmobrânquios permanentemente adaptados à vida na água-doce e ocorrem exclusivamente na região Neotropical (Carvalho et al. 2003). Quatro gêneros são reconhecidos nesta família, *Heliotrygon*, *Paratrygon*, *Plesiotrygon* e *Potamotrygon* (Rosa 1985, Carvalho et al. 2003, Deynat 2006, Rosa & Carvalho 2007, Rosa et al. 2008, Carvalho & Lovejoy 2011), que contém 26 espécies (Eschmeyer & Fong 2013).

Na bacia do rio Paraná, as espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* ocorrem com maior abundância, segundo Castex (1963). A coloração da região dorsal da espécie *P. motoro* consiste em um padrão marron ou cinza, com a presença de fileiras de ocelos tricolores distribuídas por todo o disco, sendo estes ocelos constituídos de uma pequena mancha central amarela, envolta por um anel intermediário laranja e um anel periférico negro. A outra espécie de raia, *P. falkneri*, apresenta na superfície do disco dorsal uma coloração de fundo marrom escuro que pode variar em tons claros,

contendo numerosos e pequenos ocelos redondos ou ovais de tom laranja ou manchas amarelas distribuídos por todo o dorso (Silva et al. 2011). Embora a diferenciação fenotípica das espécies pareça ser relativamente fácil, estudos taxonômicos mostraram uma forte variação entre indivíduos, com a ocorrência de policromatismo de diferentes dimensões, relacionados a diferentes habitats (Carvalho et al. 2003).

Até os anos de 1980 não havia registro da ocorrência de raias na planície de inundação do Alto Rio Paraná, na região Sudeste do Brasil. No entanto, depois do fechamento das comportas da Usina Hidrelétrica de Itaipu e surgimento de extenso represamento, uma importante barreira geográfica natural representada pelas cachoeiras de Sete-Quedas, foi eliminada, unindo cerca de 150 km do médio Rio Paraná com regiões do alto Rio Paraná, promovendo a mistura de espécies anteriormente alocadas em distintos ecossistemas (Agostinho et al. 1992). Embora as raias *P. motoro* e *P. falkneri* já ocorressem em simpatria no médio Rio Paraná, estudos recentes identificaram diferentes grupos ecomorfológicos (Lonardoni et al. 2009, Silva et al. 2011) e variações no padrão de coloração em ambas as espécies (Carvalho et al. 2003, Cruz et al. 2012).

A constatação de grande variação nas características de identificação fenotípica existente em *P. motoro* e *P. falkneri*, onde alguns caracteres aparecem em sobreposição nas duas espécies, além das diferenças nas fases do ciclo de vida e dimorfismo sexual, quando considerados em associação com a distribuição simpátrica e o expressivo processo de expansão populacional que estas espécies estão passando, tem permitido considerar também a ocorrência de hibridação entre as formas existentes.

A hibridação interespecífica é um fenômeno de ocorrência comum em muitas espécies de peixes (Mayr 1942, Grant 1981, Harrison 1990, Grant & Grant 1992, 1996, Levin et al. 1996, Rhymer & Simberloff 1996, Arnold 1997), mas a sua identificação com base em caracteres morfológicos, ecologia e comportamento das espécies pode ser difícil e a maior parte das vezes, confuso e incerto. Assim, como uma alternativa aos métodos tradicionais de identificação de híbridos, os marcadores genéticos nucleares e mitocondriais têm se mostrado uma ferramenta de grande aplicação na detecção de eventos de hibridação (Scribner & Avise 1993).

Tendo em vista o potencial efeito evolutivo da hibridização em populações naturais, além de mudanças antropogênicas, neste caso eliminando as barreiras geográficas e promovendo o crescimento populacional de espécies invasoras, o presente trabalho teve como objetivo a verificação da ocorrência de hibridização entre as espécies de raias de água doce *Potamotrygon motoro* e *P.*

falkneri de ocorrência nos componentes da bacia do Rio Paraná, utilizando marcadores genéticos mitocondriais e nucleares.

Materiais e métodos

Um total de 65 indivíduos foram amostrados ao longo do Rio Paraná (Brasil), nas regiões de Foz do Iguaçu – PR (S 25°24'03.37" - W 54°34'45.14") e em Porto Rico – PR (S 22° 47'42.4" - W 53° 20'29.7"), correspondentes a 38 espécimes de *Potamotrygon motoro*, 22 espécimes de *P. falkneri* e 5 indivíduos que apresentavam um padrão de coloração dorsal marron escuro, mas com total ausência de ocelos, sendo denominado no presente estudo como *Potamotrygon* sp. (Figura 1). A identificação das espécies foi feita de acordo com seus aspectos fenóticos e os alguns indivíduos foram depositados na coleção do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes da Universidade Estadual Paulista, UNESP, Botucatu - SP, Brasil. O DNA total foi extraído a partir de fragmentos de tecido muscular preservados em etanol a 95%, seguindo o protocolo apresentado no kit comercial "Genomic Assistente Kit de Purificação de DNA - Promega", com pequenas adaptações.

DNA mitocondrial

A identificação das linhagens parentais foi realizada com base em fragmentos de DNA mitocondrial (mtDNA) a partir do Citocromo Oxidase Subunidade I (COI) e Citocromo B (Cyt B). Estes segmentos foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR), em termociclador Applied Biosystems Veriti. Para a amplificação do gene COI foi utilizado *primers* F1 e R1 descritos por Ward et al. (2005). Para o gene Cytb B foi utilizado os *primers* CytbF e CytbR desenvolvidos por Oliveira et al. (2011). As reações de PCR foram realizadas num volume total de 25µl, contendo os seguintes reagentes: 2,5µl de (10X) de tampão, 4µl de dNTP (1,25 mM), 1µl de MgCl₂ (50 mM), 1,0 a 2,0µl de DNA (50-100ng/ml), 0,25µl de cada *primer* e 0,2µl de Taq polimerase (5U/µl) e água purificada, a fim de completar o volume final da reação.

O programa utilizado para as reações de PCR em ambos os genes consistiu de desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, temperatura de anelamento variando de 50°C à 55°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 2 minutos e uma extensão final a 72 °C durante 7 minutos. As sequências de genes COI e Cyt b foram alinhadas

com o programa BioEdit (Hall, 1999) e a distância genética foi calculada utilizando-se o programa MEGA v.4.0 (Tamura et al. 2007), segundo o modelo de Kimura-2-parâmetros (Kimura, 1978).

Microsatélites

A identificação de espécimes e a definição do seu estado de espécie selvagem ou de híbrido foi realizada com o uso de marcadores microsatélites. Foram selecionados 10 *loci* microsatélites descritos para a espécie *Potamotrygon motoro*, sendo Pm_5, Pm_8, Pm_10, Pm_11, Pm_12, Pm_16, Pm_17, Pm_18, Pm_21, Pm_25 (Cap. I).

As reações em cadeia da polimerase (PCRs) foram realizadas no termociclador Applied Biosystems Veriti nas seguintes condições: desnaturação inicial por 4 minutos a 94°C; 34 ciclos de 94°C por 15s; temperatura de anelamento específica de cada *primer* por 25s, 72°C por 25s e extensão final de 10 min a 72°C. O volume total da reação foi de 12,5µl e consistiu de: PCR 1X Tampão, 1,5mM MgCl, 0,2mM de cada dNTP, 0,5unidades de polimerase de AmpliTaq Gold (Applied Biosystems), 1,0pmol de cada um dos *primers* e 2µl de DNA (30ng/µl). Os produtos de PCR foram visualizados com controle negativo e positivo por electroforese num gel de agarose a 2%. Os *loci* que produziram bandas de tamanho esperado foram selecionados e a leitura dos fragmentos foi realizada no sequenciador de capilar da Applied Biosystems 3130, no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, UNESP, Botucatu – SP e posteriormente analisados no programa GeneMapper versão 4.0 (Applied Biosystem).

O programa GENALEX 6.1 (Peakall & Smouse 2006) foi usado para estimar proporções do equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW), número de alelos (A), heterozigosidade observada (Ho) e esperada (He). Níveis de significância foram ajustados pela correção de Bonferroni para múltiplos testes (Rice 1989).

Os possíveis híbridos foram examinados para verificar a presença de alelos privados de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* e seus genótipos. Os alelos privados foram definidos como ocorrendo apenas em uma espécie ou que ocorrem em ambas as espécies, mas com uma frequência inferior a 1% em um deles, para incorporar a possibilidade de genótipo e/ou amostragem de erro (Oliveira et al. 2006).

Resultados

Um total de 59 indivíduos do gênero *Potamotrygon* foram analisados utilizando sequências parciais de genes COI e Cyt B, sendo 34 indivíduos identificados como sendo *P. motoro* e 20 como *P. falkneri*, de acordo com critérios fenotípicos; porém 5 indivíduos tiveram uma identificação duvidosa devido ao padrão de coloração dorsal diferenciado das demais espécies, apresentando coloração marron escura e ausência de ocelos, sendo denominados de *Potamotrygon* sp. (Figura 1).



Figura 1. Exemplares de raias das espécies *Potamotrygon motoro* (a); *Potamotrygon* sp. (b) e *Potamotrygon falkneri* (c).

Com base na variação da sequência COI e nas análises utilizando máxima parcimônia e máxima verossimilhança, foram definidos dois grupos distintos denominados de haplogrupo A, com 30 indivíduos identificados morfologicamente como *Potamotrygon motoro* e haplogrupo B, composto por 20 indivíduos identificados morfologicamente como *P. falkneri*. Os 5 indivíduos com coloração diferenciada (*Potamotrygon* sp.) foram agrupados no haplogrupo A. Os 4 indivíduos restantes, previamente identificados por característica morfológicas como *P. motoro*, foram agrupados no haplogrupo B (Figura 2). A divergência genética média encontrada entre os grupos foi de 2,1% e a diversidade de nucleotídica encontrada para haplogrupo A (*P. motoro*) foi de 0.00115 ± 0.00011 e de 0.00044 ± 0.00008 para o haplogrupo B (*P. falkneri*).

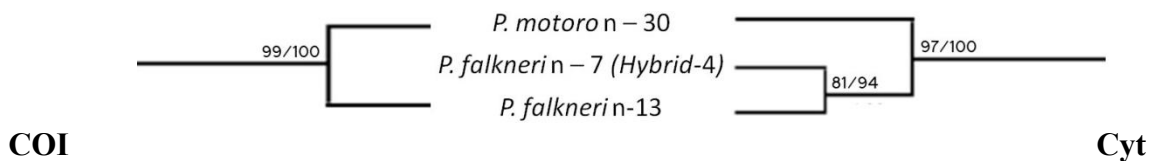


Figura 2. Análise de Máxima Parcimônia com os genes mitocondriais COI e Cyt b de amostras de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. Números nos nós representam valores de bootstrap (1.000 pseudoréplicas) de Máxima Parcimônia seguido de Máxima Verossimilhança.

A análise de sequências do gene Cyt B também identificou dois haplogrupos separando as duas espécies *P. motoro* e *P. falkneri*. Utilizando a mesma classificação anterior, as raías do primeiro grupo correspondem a *P. motoro* (haplogrupo A), enquanto as raías do segundo grupo correspondem a *P. falkneri* (haplogrupo B). A análise realizada utilizando o gene Cyt b revelou um haplótipo em *P. motoro* com 30 indivíduos e dois haplótipos em *P. falkneri*, com 20 indivíduos. Novamente os indivíduos com coloração diferenciada foram agrupados no haplogrupo A, enquanto os 4 indivíduos restantes foram agrupados no haplogrupo B. A diversidade nucleotídica do gene Cyt B foi baixa para ambos os grupos, sendo de 0.00292 ± 0.0004 para haplogrupo A (*P. motoro*) e de 0.00039 ± 0.00017 para o haplogrupo B (*P. falkneri*).

Os marcadores microsatélites foram aplicados em 63 amostras de raías (59 dos quais também foram sequenciadas para o mtDNA). Os 10 *loci* selecionados para este estudo em ambas as espécies resultaram em um total de 51 alelos, sendo que 0,87% foram identificados como alelos privados para *P. motoro* e 3,8% como alelos privados para *P. falkneri*.

A genotipagem realizada identificou 8 *loci* polimórficos e 1 *loci* monomórficos em *P. motoro*, sendo Pm_10 (401pb) (Tabela 1). Oito dos 10 *loci* originalmente projetados para *P. motoro* tiveram amplificação positiva em *P. falkneri*, sendo que destes, 6 *loci* mostraram-se polimórficos (Tabela1). Nesta espécie, os *loci* Pm_21 (113pb) e Pm_25 (187pb) apresentaram um padrão monomórfico.

Tabela 1 – Características de 10 *loci* microssatélites de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*. *Loci* estudados, tamanho do alelo, número de alelos detectados (Na), heterozigosidade esperada (He) e observada (Ho).

<i>P. motoro</i>					<i>P. falkneri</i>			
<i>Locus</i>	<i>Size</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>	<i>Size</i>	<i>Na</i>	<i>He</i>	<i>Ho</i>
	<i>range</i>				<i>range</i>			
Pm_5	244-246	2	0,420	0,543	244-266	4	0,732	0,750
Pm_8	172-198	5	0,589	0,629	194-204	4	0,670	0,833
Pm_10	401	1	0,000	0,000	405-411	2	0,518	0,063
Pm_11	299-301	2	0,206	0,187	332-336	4	0,698	0,889
Pm_12	307-313	2	0,389	0,375	343-347	3	0,885	0,750
Pm_16	196-198	2	0,333	0,302	198-200	2	0,490	0,350
Pm_17	369	2	0,451	0,440	-	-	-	-
Pm_18	220-234	6	0,689	0,701	-	-	-	-
Pm_21	115-117	2	0,083	0,080	113	1	0,000	0,000
Pm_25	183-197	2	0,083	0,80	187	1	0,000	0,000

Os espécimes com padrão de coloração diferenciada (*Potamotrygon* sp.) apresentaram exatamente os mesmos alelos privados para a espécie *P. motoro*. No entanto, nos 4 indivíduos que apresentaram os padrões fenotípicos de *P. motoro* e DNA mitocondrial de *P. falkneri* (COI e Cyt b), foi possível identificar com marcadores microssatélites os mesmos alelos privados de *P. motoro* e um alelo privado de *P. falkneri* caracterizando, assim, as amostras como espécimes híbridos. (Tabela 2).

Discussão

A espécie de raia de água doce *Potamotrygon motoro* (Müller and Henle, 1841) foi descrita originalmente na bacia hidrográfica do Rio Paraná-Paraguai, tendo como localidade tipo o Rio Cuiabá (Muller & Henle 1841), sendo que estudos realizados nessa região não identificaram qualquer variação no padrão de coloração nos espécimes analisados (Castex 1963). A espécie *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 também foi descrita no Rio Paraná, na região de Santa Fé, Argentina (Castex & Maciel 1963) sendo restrita à Bacia do Rio Paraná-Paraguai, ocorrendo atualmente desde as regiões do Pantanal, nos rios Cuiabá e Piquiri, entre outros até o Alto Rio Paraná (Silva et al. 2011).

Tabela 2 – Identificação de alelos privados das espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* e sua frequência nos híbridos.

Locus	Allele	<i>P. motoro</i> (%)	<i>P. falkneri</i> (%)	Hybrid (%)
Pm_5	244	0,71	0,10	1,00
Pm_8	190	0,17	0,00	0,50
	192	0,16	0,00	0,00
Pm_10	401	1,00	0,09	1,00
Pm_11	299	0,88	0,00	0,86
Pm_12	307	0,76	0,00	1,00
Pm_16	196	0,64	0,05	0,50
	197	0,09	0,22	0,50
Pm_21	115	0,96	0,00	1,00
Pm_25	183	0,96	0,00	1,00

Na bacia do Rio Paraná, ambas as espécies acima descritas ocorrem em simpatria e estudos realizados nesta bacia identificaram diferenças ecomorfológicas entre e dentro dessas espécies. Lonardon et al. (2009) detectou dois grupos ecomorfológicos distintos de *Potamotrygon falkneri* no Rio Paraná, enquanto que, neste mesmo ambiente Silva et al. (2011) encontrou dois grupos de *P. motoro* com características morfométricas substancialmente diferentes. Contudo, os caracteres usados na taxonomia deste grupo tais como a presença de sulco labial e diferenças de coloração na região dorsal não têm sido eficazes na diferenciação de espécies (Maniglia 2010). No presente estudo foi verificado que alguns espécimes apresentaram distintas variações na coloração dorsal do disco, principalmente se tratando da espécie *Potamotrygon motoro*, ao passo que *P. falkneri* apresentou uma menor variação no padrão de coloração para todos os indivíduos amostrados. Alguns espécimes com coloração intermediária entre *P. motoro* e *P. falkneri* foram considerados como portadores de policromatismo intra-específico; contudo, não pode ser descartada a existência de prováveis híbridos naturais entre estas espécies.

Os marcadores moleculares mitocondriais e nucleares de DNA têm contribuído para a identificação de espécies crípticas, assim como de possíveis ocorrências de hibridização entre elas (Avisé 2004, Oliveira et al. 2002, 2006). Com relação às raias de água doce de ocorrência na bacia do Rio Paraná, os estudos genéticos realizados para o entendimento da dinâmica genética das espécies ainda são escassos (Toffoli et al. 2008, Frederico et al. 2012, Cruz et al. 2012). Nas espécies em estudo, os baixos índices de variabilidade genética encontrados foram semelhantes a outras espécies de

Chondrichthyes (Portnoy et al. 2012, Mendonça et al. 2012, Graves 1998, Duncan et al. 2006). A taxa de substituição de genes mitocondriais em peixes cartilagosos tem sido caracterizado como 7 à 8 vezes mais lenta do que em outros vertebrados, provavelmente devido a uma menor taxa metabólica e, por conseguinte, os Chondrichthyes exibem baixos níveis de divergência entre as espécies (Martin et al. 1993).

Neste estudo alguns espécimes denominados como *Potamotrygon* sp. por apresentarem um padrão de coloração dorsal distinto do descrito para as espécies, foram identificados pelos marcadores mitocondriais e nucleares como sendo, na realidade, *P. motoro*, o que amplia ainda mais a extensa variação de coloração apresentada normalmente pelos exemplares e, consequentemente, caracteriza o policromatismo desta espécie.

A análise genética molecular de quatro indivíduos que apresentaram fenótipo de *P. motoro* revelou que o marcador de mtDNA correspondeu ao da espécie *P. falkneri*, enquanto o marcador nuclear para microssatélite foi correspondente ao da espécie *P. motoro*, caracterizando assim estes espécimes como híbridos. Dado que a herança do mtDNA é materna, pode-se deduzir que a linhagem materna seria *P. falkneri*. As espécies *P. motoro* e *P. falkneri* compartilham poucos alelos entre si, apresentando especificamente um grande número de alelos privados que podem ser utilizados na identificação dos híbridos.

Em elasmobrânquios, a ocorrência de híbridos já foi identificada entre as espécies de tubarões *Carcharhinus tilstoni* e *C. limbatus*. Estas espécies ocorrem em simpatria e a identificação dos híbridos foi confirmada com sequências de DNA mitocondrial, nuclear e por identificação das espécies por caracteres morfológicos (Morgan et al. 2011). Arnold & Hodges (1995) e Seehausen (2004) enfatizam o papel que desempenha a hibridação na diversificação evolutiva, sendo que híbridos de alta aptidão podem facilmente se adaptar à novidade ambiental e levar a novas linhagens evolutivas.

As hibridações podem ser devidas a causas naturais ou antropogênicas e a gestão destas últimas é constitui um enorme desafio para a conservação da biodiversidade (Allendorf et al. 2001). Duas possíveis consequências podem ocorrer ao longo das gerações se as formas híbridas reduzem a aptidão e tornam-se comuns: a produtividade da população será menor que o previsto. Contudo, se a aptidão dos híbridos é a mesma ou superior a das espécies parentais, ao longo do tempo as duas espécies poderão fundir-se em uma única espécie e a biodiversidade deste grupo poderá ser perdida (Morgan et al. 2011).

Conclusões

O presente estudo resultou na identificação da ocorrência de hibridização natural entre as espécies de raias de água doce, *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* na bacia do Rio Paraná. Também ficou confirmada a existência de extensivo polimorfismo cromático na espécie *Potamotrygon motoro*, uma vez que alguns espécimes da amostra apresentaram padrão de coloração dorsal distinto do descrito para a espécie. Análises destes exemplares utilizando marcadores de mtDNA e microssatélites confirmaram a identidade destas amostras como pertencentes à espécie *P. motoro*. Por outro lado, a mesma análise genética de 4 indivíduos da amostra com fenótipo de *P. motoro* revelou que, enquanto o marcador nuclear para microssatélite foi correspondente ao da espécie *P. motoro*, o marcador de mtDNA correspondeu ao da espécie *P. falkneri*, caracterizando assim, estes espécimes como híbridos.

*D*iscussão *G*eral

6 DISCUSSÃO GERAL

Até o final dos anos 70, a ocorrência de muitas espécies aquáticas era assinalada no Rio Paraná apenas para os trechos situados à jusante das cachoeiras de Sete-Quedas, situada na região do médio Rio Paraná, no Município de Guaíra, Estado do Paraná, constituindo-se numa importante barreira geográfica (Vilela et al. 2004). Historicamente, essas barreiras são um fator dominante na determinação e composição de faunas regionais promovendo endemismo (Cox & Moore 1980, Ricklefs & Schluter, 1993). No entanto, as ações humanas têm reduzido o isolamento imposto por barreiras biogeográficas e o resultado tem sido uma mistura sem precedentes de comunidades biológicas (Lockwood & McKinney 2001, Rahel 2002, McKinney, 2006).

Em meados de 1972 foi iniciada a construção da maior Usina Hidrelétrica do Brasil, a Hidrelétrica de Itaipu no médio Rio Paraná. Com isso o obstáculo natural interposto pelas cachoeiras de Sete-Quedas que isolou por muito tempo a maioria dos componentes da ictiofauna do alto Rio Paraná deixou de existir, permitindo que muitas espécies aquáticas até então limitadas à região do médio Paraná, passassem a ocupar novos ambientes situados à montante da barreira natural, mais que isto, certas espécies passaram a se movimentar também de um lado para outro através da construção de escada de peixes, aumentando as possibilidades de colonização do trecho situado à montante de Guaíra por novas espécies.

As escadas de peixes são um exemplo de como a falta de conhecimento específico sobre o funcionamento do ecossistema de um determinado ambiente pode provocar incriveis danos à sua fauna. Escadas são estruturas construídas artificialmente para interligarem as regiões à montante e à jusante de um rio que foram separadas pela construção de uma represa. Trata-se, à primeira vista, de uma estratégia bastante interessante; porém, se não estiver bem embasada, pode se tornar extremamente prejudicial para a fauna de peixes de uma determinada região, principalmente das espécies migradoras (Agostinho et al. 2007a). Além disso, os modelos de construção de escadas adotados no Brasil são originários de países Norte-Americanos, os quais tiveram seus projetos baseados nos padrões de migração de salmonídeos, peixes abundantes e de grande importância comercial naquela região (Agostinho et al. 2007a).

Evidentemente, os mesmos modelos não deveriam ser utilizados diretamente em rios da região Neotropical sem um estudo detalhado ou, pelo menos, sem o devido monitoramento genético, visto que estes possuem um grau de diversidade e complexidade muito maior quando comparados aos anteriores. A captura de algumas espécies de raias já foi registrada nas proximidades da Usina Hidrelétrica de Jupiá, na foz do rio Tietê no Estado de São Paulo, nas regiões do baixo Paranapanema (Britto 2004), próximo aos municípios de Castilho no Estado de São Paulo e no Rio Sucuriú, na região de Três Lagoas no Estado do Mato Grosso do Sul (Garrone et al. 2007). Há indicações de que estas espécies já estão sendo encontradas também nos reservatórios do Rio Tietê mais próximos à foz e em localidades situadas à montante da represa de Ilha Solteira.

Neste contexto pode ser considerado que monitoramentos genéticos se fazem extremamente necessários e essenciais para garantir a manutenção dos estoques, visto que muitas vezes a taxa de mutação em uma população pode ser bastante lenta, como sugerem os resultados deste trabalho e as mudanças causadas nas populações podem demorar a ser percebidas. Assim, no sentido de melhor conhecer as populações de raias existentes neste ambiente e desenvolver melhor compreensão sobre os mecanismos genéticos envolvidos no processo de colonização, determinado pelo aparecimento de novos ambientes originados em decorrência da construção de represas hidrelétricas, este estudo buscou identificar padrões gerais de impacto sobre a variabilidade e estrutura genética nas espécies de raias de água doce *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* que ocorrem ao longo do Rio Paraná.

Vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de sequências de mtDNA para elucidar problemas relativos à genética de populações invasoras (Bermingham & Martin 1998, Wang et al. 2004, Chen et al. 2008, Lessios 2008, Haney et al. 2010, entre outros). Porém, os resultados iniciais do presente trabalho utilizando o marcador mtDNA não resultaram em indicações sobre a existência de estruturação genética detectável entre as amostras de *P. motoro* e *P. falkneri* analisadas, provenientes de diferentes pontos no Rio Paraná.

A ausência de estruturação observada é passível de diferentes interpretações, sendo a primeira delas uma conclusão mais tradicional neste tipo de estudo, segundo a qual as populações estariam proximamente ligadas, existindo fluxo gênico entre elas e que provavelmente o pequeno

espaço de tempo de colonização poderia não ter sido suficiente para permitir diferenciação genética entre os animais dos sítios amostrados. Uma segunda interpretação que não poderia ser descartada é que a não detecção de estruturação populacional poderia ser consequência do marcador utilizado, que não apresentaria sensibilidade suficiente para a detecção de eventos de colonização recente, como ocorrido no presente caso onde o processo de diferenciação estaria se estabelecendo nos últimos 30 anos, após o término da construção da Hidrelétrica de Itaipú.

Uma alternativa utilizada foi a busca de um marcador mais sensível para a detecção de possível diferenciação genética das populações colonizadoras. Com isso foram identificados e desenvolvidos *loci* microssatélites para os estudos populacionais com a aplicação da técnica de pirosequenciamento (454 GS-FLX Roche) na espécie *Potamotrygon motoro*, uma vez que com os marcadores mitocondriais não foi possível detectar o verdadeiro estado genético das populações em ambas espécies. Entre um total de 1.510 sequências contendo microssatélites perfeitos e após a realização de várias análises, foi confirmado o polimorfismo em 10 conjuntos de *primers* espécie-específicos, que foram testados também em *P. falkneri*, tendo sido obtidos valores de 60% de transferabilidade bem sucedida. Assim, estudos populacionais utilizando esses marcadores puderam ser realizados, sendo que distintos resultados foram obtidos quando comparados com as análises utilizando marcadores mitocôndrias.

Os níveis de variabilidade dos *loci* microssatélites nas amostras de *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri* coletadas ao longo da bacia do Rio Paraná apresentaram médias de 3.40 e 3.68 alelos por *loci*, respectivamente, sendo, contudo inferiores aos valores encontrados nas comparações com outras espécies de peixes de água doce, que apresentam média de 9.1 alelos por *loci* (DeWoody & Avise 2000, Oliveira et al. 2009). Estudos do marcador microssatélite em *P. motoro* apresentaram índices estatísticos similares àqueles obtidos para o marcador mtDNA, nos quais as amostras testadas não apresentaram estruturação genética; já em *P. falkneri* os resultados encontrados foram diferentes, sendo que com o marcador microssatélite foi possível distinguir distintos genótipos nas amostras analisadas.

Na análise das amostras de *P. falkneri*, o índice *Fst* apresentou valores mais significativos (0.15), indicando uma diferenciação moderada entre as três populações amostradas, o

que também foi confirmado por outros testes estatísticos. Embora as médias dos índices de F_{st} da espécie *P. motoro* terem apresentado baixa diferenciação populacional, os resultados demonstram uma pequena diferenciação genética, quando visualizadas com base nos valores F_{st} das comparações par-a-par obtidos entre as amostras da região de Foz do Iguaçu (FI) e Sucuriú (SU). As amostras se caracterizaram também por apresentarem distintos alelos privados, provavelmente identificando a existência de valores de distâncias genéticas específicas.

Em 66% das estimativas realizadas os valores de heterozigosidade observada em *P. motoro* foram maiores que a esperada, indicando que essas amostras não apresentam deficiência de heterozigotos e que os acasalamentos são randômicos dentro e entre as populações. Os baixos índices de homozigosidade e altos índices de heterozigotos encontrados em relação ao esperado e a constatação de valores de F_{IS} negativos dão indícios da ocorrência de um efeito gargalo (*bottleneck*) recente, como o encontrado em *P. motoro*, que apresentou 70% das estimativas F_{IS} negativo. Pode ser sugerido então que as amostras de localidades geograficamente mais distantes entre si possuem uma moderada estruturação, tendo por base os valores R_{st} , nas comparações com aquelas decorrentes de amostras de localidades mais próximas. Os índices genéticos obtidos confirmam que as amostras pertencentes ao médio Rio Paraná (Foz do Iguaçu), não são isoladas das populações colonizadoras.

Além disso, a forma homogênea ou proporcional com que os genótipos estão distribuídos ao longo do Rio Paraná para *Potamotrygon motoro*, parece sugerir duas hipóteses, sendo que a primeira expressa uma situação de estabilidade e refletindo o perfil genético da grande população ancestral; num segundo caso, as populações colonizadoras seriam decorrentes de eventos de introduções múltiplas, ou seja, com a invasão em grupo de populações com a mesma origem, o que poderia diluir substancialmente e até mesmo ofuscar o efeito gargalo (Kolbe et al. 2004). Neste caso, muito provavelmente as populações de *P. motoro* ainda estariam em um processo inicial de diferenciação genética, fazendo com que no momento ainda existisse apenas uma unidade panmítica de *P. motoro*.

Os valores de F_{st} par-a-par na espécie *P. falkneri*, apresentaram índices relevantes entre as três populações em estudo. Foi possível estabelecer associação entre os diferentes valores encontrados nas amostras com sua distância geográfica, sendo que a comparação entre as amostras de

PC e PR foi aquela que resultou em menor índice *Fst*; estas localidades estão separadas por pequena distância geográfica. Por outro lado, apresentou maior índice *Fst* a comparação entre PC e IS, que estão separadas pela maior distância geográfica. Segundo Frankham et al. (2004), a distância geográfica que separa as populações podem se transformar em riscos para a manutenção da variabilidade genética, uma vez que esta está associada à quantidade de fluxo gênico existente entre as partes distantes da distribuição de uma espécie e com a capacidade dos indivíduos migrarem. Sendo assim, quanto menor for o fluxo gênico entre as populações, maiores serão os riscos de perda de variabilidade.

A perda de alelos privados foi significativa nas populações colonizadoras de *P. falkneri*, podendo ser resultado de um evento claro de gargalo populacional, provavelmente estabelecido ao longo do processo de invasão. Apesar disso, o número efetivo da população colonizadora que ocupa a região de IS é mais elevado quando comparado com a região de PC, indicando que apesar da perda de alelos privados, essas populações estão em expansão. Estes resultados mostram que indivíduos pertencentes à região de Porto Camargo no Rio Paraná, possuem um isolamento genético ainda em fase inicial entre as populações colonizadoras desta espécie. Se a distância geográfica entre as populações pode ser um fator de grande importância na possibilidade de diminuição do fluxo gênico, quando naturalmente ocorre perda de variabilidade genética, conforme verificado nas análises com a frequência de alelos privados, pode, porém, propiciar a chance de ocorrer uma expansão populacional devido à adaptabilidade e capacidade de estabelecimento na região de colonização, no caso Ilha solteira, como identificado pelos valores encontrados para o índice N_e .

Considerando a grande variação nas características morfológicas que podem permitir a discriminação das espécies *Potamotrygon motoro* e *P. falkneri*, com algumas destas em estado de sobreposição, associada a outros fatores como sua distribuição simpátrica, as mudanças antropogênicas a que estão sujeitas, neste caso eliminando promovendo a eliminação de barreiras geográficas e causando o crescimento populacional de espécies invasoras, o presente trabalho desenvolveu também análises específicas, com a utilização de marcadores genéticos mitocondriais e nucleares comparativos, para a identificação de possíveis casos de hibridização entre as espécies *P. motoro* e *P. falkneri*.

Durante as atividades de amostragem foi verificado que alguns espécimes da espécie *Potamotrygon motoro* apresentaram distintas variações na coloração dorsal do disco, enquanto a variação em *P. falkneri* mostrou-se normal com relação ao padrão de coloração. Alguns indivíduos com coloração intermediária entre *P. motoro* e *P. falkneri* apontaram para a confirmação de extensivo policromatismo que caracteriza estas espécies, bem como para a provável ocorrência de hibridação natural interespecífica, uma vez que estas espécies estão compartilhando ambientes recentemente colonizados.

Através dos marcadores morfológicos visuais e morfométricos, estes espécimes diferenciados foram identificados com o fenótipo de *P. motoro*. Porém, os marcadores genéticos moleculares revelaram identidade materna compatível com a da espécie *P. falkneri* pela análise do mtDNA, enquanto as análises realizadas utilizando marcadores nucleares do tipo microsatélite revelaram sua compatibilidade com o genoma de *P. motoro*. Tais fatos levam à conclusão de que estes indivíduos são realmente híbridos entre *P. motoro* e *P. falkneri*, que têm como origem materna a espécie *P. falkneri*. O número de alelos privados identificados nestas espécies pode ser considerado como uma excelente ferramenta para auxiliar na identificação de híbridos. Em elasmobrânquios, a ocorrência de híbridos foi confirmada anteriormente também pela análise de sequências de DNA mitocondrial, nuclear e por caracteres morfológicos (Morgan et al. 2011) entre espécies de tubarões, *Carcharhinus tilstoni* e *C. limbatus* que ocorrem em simpátria.

Estudos de hibridização sugerem que esta pode ocorrer quando as espécies estão em expansão. Neste caso, a oportunidade dessas espécies invadirem, se estabelecerem e colonizarem toda uma bacia hidrográfica poderia ter possibilitado o processo de hibridização. Arnold & Martin (2010) e Seehausen (2004) enfatizam o papel que desempenha a hibridação na diversificação evolutiva, sendo que híbridos de alta aptidão podem facilmente se adaptar às novidades do ambiente colonizado e levar ao aparecimento de novas linhagens evolutivas.

Alternativamente, a plasticidade fenotípica em populações introduzidas parece ser outra característica importante a considerar, como identificado neste estudo. A espécie *P. motoro* apresenta características fenotípicas únicas, com um alto grau de policromatismo que varia dentro de um padrão marrom ou cinza com a presença de fileiras de ocelos tricolores distribuídas por todo o disco. Tais

ocelos são constituídos de uma pequena mancha central amarela, cercada por um anel intermediário laranja e um anel periférico negro. A outra espécie *P. falkneri* apresenta no disco dorsal uma coloração de fundo marrom escuro, que pode variar em tons claros, com numerosos e pequenos ocelos redondos ou ovais de tons laranja para manchas amarelas distribuídos por todo o dorso (Silva et al. 2011).

Embora a diferenciação fenotípica das espécies possa parecer relativamente fácil, estudos taxonômicos mostraram uma forte variação entre indivíduos, policromatismo de diferentes dimensões e de adaptação a diferentes habitats (Carvalho et al. 2003). Tais evidências foram também identificadas no presente estudo, no qual foram encontrados espécimes com coloração dorsal marrom, porém com total ausência de ocelos, que foram identificados geneticamente como *P. motoro*.

Os estudos genéticos que têm sido realizados em raias de água doce são ainda incipientes até o momento, principalmente para o entendimento da dinâmica genética destas espécies na região da bacia do Rio Paraná (Toffoli et al. 2009, Frederico et al. 2012, Cruz et al. 2012). Os dados obtidos no presente trabalho resultaram em informações de interesse, uma vez que, além de corroborar outros estudos sobre os efeitos diretos causados principalmente nas populações de organismos aquáticos pela construção de barragens.

Tais informações apontam diretamente para a necessidade da realização de extensivos estudos prévios, seguidos de monitoramento contínuo destes ambientes, uma vez que as decisões podem afetar o tamanho da população, interromper ou diminuir o fluxo gênico entre populações, reduzir a diversidade genética e aumentar as diferenças populacionais entre grupos isolados ou colonizadores (Jager et al. 2001, Neraas & Spruell 2001, Meldgaard et al. 2003, Yamamoto et al. 2004, Heggenes & Roed 2006,).

*C*onsiderações *F*inais

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados apresentados no presente trabalho permitem concluir que:

1 – Os marcadores moleculares desenvolvidos para a espécie de raia de água doce, *Potamotrygon motoro*, mostraram-se como eficientes ferramentas para as análises de estrutura populacional neste grupo de organismos. A transferabilidade do marcador do tipo microssatélite foi confirmada com sua aplicação no estudo de espécie simpátrica, *Potamotrygon falkneri*;

2 – *Potamotrygon motoro* é representada por apenas uma única unidade panmítica em toda a bacia hidrográfica do Rio Paraná, ou seja, durante o processo de colonização parece não ter havido perda significativa de variabilidade genética em relação ao genótipo básico das populações originais, como observado com a aplicação de vários índices genéticos. Tal constatação poderia ser determinada por uma característica específica, identificada por um processo rápido de colonização e efeito demixagens sucessivas em curto espaço de tempo, com componentes do pool original, numa intensa atividade de fluxo gênico;

3 – *Potamotrygon falkneri* apresentou diferenciação genética com evidências de estruturação em fase inicial em três amostras analisadas ao longo do Rio Paraná. Tal diferenciação ocorreu provavelmente em decorrência do processo de colonização dos novos ambientes pela espécie, estando associada com a distância geográfica entre as amostras. Nesta espécie, o processo de colonização parece ocorrer de modo mais lento e estável, com o estabelecimento da diferenciação entre os estoques colonizadores na fase inicial. Não pode ser descartado o fato de este processo ocorrer de forma mais rápida para esta espécie na fase inicial, com a tomada dos novos ambientes por genótipos específicos e únicos e que posteriormente podem ser mixados por novas cargas migratórias;

4 – A ocorrência de hibridação foi constatada com a aplicação de técnicas de análise de genética molecular, uma vez que a existência de extenso policromatismo nestes organismos dificulta a

identificação de híbridos por métodos morfológicos. As análises com marcadores moleculares em alguns indivíduos com coloração intermediária entre *P. motoro* e *P. falkneri* revelaram identidade com a espécie *P. falkneri* pela análise do mtDNA, enquanto os marcadores nucleares do tipo microsatélitemostraram sua compatibilidade com o genoma de *P. motoro*. Trata-se, pois, da constatação de que estes indivíduos são realmente híbridos entre *P. motoro* e *P. falkneri* e que têm como origem materna a espécie *P. falkneri*.

*R*eferências

8 REFERÊNCIAS

- Abercrombie DL, Clarke SC, Shivji MS (2005). Global-scale genetic identification of hammerhead sharks: application to assessment of the international fin trade and law enforcement. *Conserv. Genet.* 6:775–788.
- Abdelkrim J, Robertson BC, Stanton JAL, Gemmell NJ (2009). Fast, cost effective development of species-specific microsatellite markers by genomic sequencing. *Biology Technicians*, 46, 185–191.
- Achenbach GM, Achenbach SVM (1976). Notas acerca de algunas espécies de “raya fluvial” (Batoidei, Potamotrygonidae) que frecuentan el sistema hidrográfico del rio Paraná médio em el departamento La Capital (Santa Fé – Argentina). *Comunicaciones del Museo Provincial de Ciências Naturales*, 8:1-3.
- Agah A, Aghajan M, Mashayekhi F, Amini S, Davis RW, Plummer JD, Ronaghi M, Griffin PB (2004). A multi-enzyme model for Pyrosequencing. *Nucleic Acids Res.* 32.
- Agostinho AA, Julio Jr. F, Borguetti JR & Domaninski JR (1992). Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: Reservatório de Itaipu. *Rev. Unimar, Maringá*, 14(supl): 89-107.
- Agostinho AA, Gomes LC, Verissimo S, Okada EK (2004). Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Parana’ River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 14, 11–19.
- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007a). *Ecologia e manejo de recursos pesqueiros em reservatórios do Brasil*. Eduem, Maringá, 501p
- Alam MS & Islam MS (2005). Population genetic structure of *Catla catla* (Hamilton) revealed by microsatellite DNA markers. *Aquaculture*, 246: 151-160.
- Allentoft ME, Schuster SC, Holdaway RN, Hale ML, Mclay E, Oskam C, Gilbert MTP, Spencer P, Willerslev E, Bunce M (2009). Identification of microsatellites from an extinct moa species using high-throughput (454) sequence data. *Biotechniques*, 46, 195–200.
- Allendorf FW, Spruell P, Utter FM (2001). Whirling disease and wild trout: Darwinian fisheries management. *Fisheries* 26(5):27–29. wild trout: Darwinian fisheries management. *Fisheries* 26(5):27–29.
- Ana – Agência Nacional De Águas. Bacias brasileiras do Rio da Prata: avaliações e propostas. Brasília, DF (2001). 102 p. Disponível em: <<http://www5.prossiga.br/recursoshidricos/pdf/relprata.pdf>>. Acesso em: 10 set. 2004.
- Arnold ML (1997). *Natural hybridization and evolution* Oxford University Press, New York.

Arnold ML, Hodges SA (1995). Are natural hybrids fit or unfit relative to their parents? Trends in Ecology and Evolution, 10(2):67-71.

Arthington AH (1991). Ecological and genetic impacts of introduced and translocated freshwater fishes in Australia. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 48 (suppl. 1): 33-43.

Avise JC (2004). Molecular markers, natural history and evolution. 2nd edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Bardakci F, Skibinski DOF (1994). Application of the RAPD technique in tilapia fish: species and subspecies identification. Heredity, v. 73, p. 117-123.

Bay LK, Choat JH, van Herwerden L, Robertson DR (2004) High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): evidence of an unstable evolutionary past? Marine Biology, 144, 757–767.

Beachan TD, Woo CC (1999). Application of the microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of Nass river sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 56: 297-310.

Beheregara LB, Sunncks P (2001). Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. Molecular Ecology, 10, 2849-2866.

Bermingham E, Martin AP (1998). Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. Molecular Ecology 7 (4), 499–517.

Billington N, Hebert PDN (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 48(Suppl. 1): 80-94.

Blanchet S (2012). The use of molecular tools in invasion biology: an emphasis on freshwater ecosystems. Fisheries Management and Ecology, 2012, 19, 120–132

Blow N (2008). DNA sequencing: Generation next-next. Nature, Meth. 5, 267–274.

Bonneaud C, Burnside J, Edwards SV (2008). High-speed developments in avian genomics. BioScience 58, 587–595.

Boomer J, Stow A (2010). Rapid isolation of the first set of polymorphic microsatellite *loci* from the Australian gummy shark, *Mustelus antarcticus* and their utility across divergent shark taxa. Conservation Genetics Resources, 2, 393–395.

Bouza C, Vilas ER, Castro EJ, Martinez P (2007). Mitochondrial haplotype variability of brown trout population from Northwestern Iberian Peninsula, a secondary contact area between lineages. Conserv Genet DOI 10.1007/s10592-007-9398-8.

Brasil (1998). Portaria nº 145/98, de 29 de outubro de 1998: dispõe sobre introduções, reintroduções e transferências de espécies aquáticas no Brasil. Diário Oficial da União, Brasília.

Britto SGC (2004). Peixes do Rio Paranapanema. 1ª ed. Horizonte Geográfico, S. Paulo.

Bremer JRA, Naseri I, Ely B (1997) Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology*, 50, 540–554.

Brown WM, George M, and Wilson AC (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1967-1971.

Caccone A, Allegrucci G, Fortunato C, Sbordoni V (1997). Genetic differentiation within the European sea bass (*D. labrax*) as revealed by RAPD-PCR Assays. *Journal of Heredity* 88: 316-324.

Calcagnotto D, Russello M, Desalle R (2001). Isolation and characterization of microsatellite *loci* in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Mol. Ecol. Notes* 1: 245-247.

Caldera EJ, Bolnick DI (2008). Effects of colonization history and landscape structure on genetic variation within and among threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations in a single watershed. *Evolutionary Ecology Research*, 10, 575–598.

Cândido-Silva AG (2006). Morfometria e ecologia de *Potamotrygon motoro* e *Potamotrygon falkneri* (Chondrichthyes:Potamotrygonidae) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. Tese de Mestrado. Universidade Estadual de Maringá.

Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M (2005). Rapid radiation and cryptic speciation in Mediterranean triplefin blennies (Pisces: Tripterygiidae) combining multiple genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37, 751–761.

Carvalho MR, Lovejoy NR, Rosa RS (2003). Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (orgs.). *Check List the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre: Edipucrs. 329-347.

Carvalho DC, Beheregaray LB (2011). Rapid development of microsatellites for the endangered Neotropical catfish *Conorhynchus conirostris* using a modest amount of 454 shot-gun pyrosequencing. *Conservation Genetics Research*, 3, 373–375.

Carvalho MR, Lovejoy NR, Rosa RS (2003). Family Potamotrygonidae (river stingrays). In: Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris Jr., C.J. (orgs.). *Check List the Freshwater Fishes of South and Central America*. Porto Alegre. Edipucrs, 3, 329-347.

Castoe TA, Poole AW, Gu WJ, De Koning APJ, Daza JM, Smith EN, Pollock DD (2010). Rapid identification of thousands of copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*) microsatellite *loci* from modest amounts of 454 shotgun genome sequence. *Molecular Ecology Resources*, 10, 341–347.

Cavalli-Sforza LL & Edwards AWF (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *American Journal of Human Genetics*, 19: 233-257.

Castex M N (1963). La Raya Fluvial – Notas Histórico-Geográficas. Santa Fé, Librería y Editorial Castellví S.A., 119p.

Castex MN & Maciel I (1963). Características del *Potamotrygon falkneri* sp. n., In: El género *Potamotrygon* en el Paraná medio. Anales del Museo Provincial de Ciencias Naturales Florentino Ameghino, Zoologia, 2(1): 56-61

Chabot C, Nigenda S (2011). Characterization of 13 microsatellite *loci* for the tope shark, *Galeorhinus galeus*, discovered with next-generation sequencing and their utility for eastern Pacific smooth-hound sharks (Mustelus). Conservation Genetics Resources, 3, 553–555.

Chambers GK, Macavoy ES (2000). Microsatellites: consensus and controversy. Comp. Biochem. Phys.. Part B 126: 455-476.

Charvet-Almeida P, Araújo MLG, Rosa RS, Rincón G (2002). Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. Shark News, 14: 47-51.

Chen, SP, Liu T, LI ZF, Gao TX (2008). Genetic population structuring and demographic history of red spotted grouper (*Epinephelus akaara*) in South and East China Sea. Afr. J. Biotechnol. 7, 3554–3562.

Chevolot M, Reusch TBH, Boele-Bos S, Stam WT, Olsen JL (2005). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers in *Raja clavata* L. (thornback ray, Rajidae) Mol. Ecol. Notes 5: 427-429.

Chevolot M, Ellis JR, Hoarau G, Rijnsdorp WTS, Olsen JL (2006). Population structure of the thornback ray (*Raja clavata* L.) in British waters. J. Sea Res. 56: 305-316.

Chevolot M, Wolfs PHJ, Palsson J, Rijnsdorp AD, Stam WT, Olsen JL (2007b). Population structure and historical demography of the thorny skate (*Amblyraja radiata*, Rajidae) in the North Atlantic. Marine Biology, 151, 1275–1286.

Clarke AD, Telmer KH, Shrimpton JM (2007). Habitat use and movement patterns for a fluvial species, the Arctic grayling, in a watershed impacted by a large reservoir: evidence from otolith microchemistry. Journal of Applied Ecology, 44, 1156–1165.

CIC – Comité Intergubernamental Coordinador De Los Países De La Cuenca Del Plata (2004). La Cuenca del Plata: Información General. Buenos Aires. Disponible em: <http://www.cicplata.org/?id=lc_infogen#lcdp>. Acesso em: 08 abr. 2005

Compagnon LJ, Cook SF (1995). The exploitation and conservation of freshwater elasmobranchs: status of taxa and prospects for the future. Journal of Aquaculture & Aquatic Sciences, 7: 62-90.

Cooke JM, Chao NL, Beheregaray LB (2011). Marine incursions, cryptic species and ecological diversification in Amazonia: the biogeographic history of the croaker genus *Plagioscion* (Sciaenidae). Journal of Biogeography Early View, Article first published online: 28 NOV 2011. East China Sea. Afr. J. Biotechnol. 7, 3554–3562.

- Copp GH, Bianco PG, Bogutskaya NG, Eros T, Falka I, Ferreira MT et al. (2005). To be, or not to be, a nonnative freshwater fish? *Journal of Applied Ichthyology* 21, 242–262.
- Copp GH, Vilizzi L, Mumford J, Fenwick GV, Godard MJ, Gozlan RE (2009). Calibration of FISK, an invasive-ness screening tool for non-native freshwater fishes. *Risk Analysis* 29, 457–467.
- Cox CB, Moore PD (1980). *Biogeography: An Ecological and Evolutionary Approach*. Halsted Press, NY. U.S.A.
- Cruz VP, Oliveira C, Foresti F (2012). The genetic dynamics and recent colonization of Southeastern Brazil by stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *ScienceMED*, 3, 179-185.
- Csencsics D, Brodbeck S, Holderegger R (2010). Cost-effective, species-specific microsatellite development for the endangered Dwarf Bulrush (*Typha minima*) using next-generation sequencing technology. *Journal of Heredity*, 101, 789–793.
- Delmas CE, Lhuillier E, Pornon A, Escaravage N (2011). Isolation and characterization of microsatellite *loci* in *Rhododendron ferrugineum* (Ericaceae) using pyrosequencing technology. *American Journal of Botany*, 98, 120–122.
- Dergan JA, Suzuki HI, Shibatta OA (1998). Molecular biogeography of the Neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguazu, Tibagi and Paraná rivers. *Genetics and Molecular Biology*, 21, 493-496.
- Deynat P (2006). *Potamotrygon marinae* n. sp., une nouvelle espèce de raies d'eau douce de Guyane (Myliobatiformes, *Potamotrygonidae*). *Comptes Rendus Biologies*, 329(2006) 483-493.
- DeYoung RW, Honeycutt RL (2005). The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management* 69, 1362–1384.
- Dewoody JA, Avise JC (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromus fishes compares with other animals. *J. Fish Biol.* 56: 461-473.
- Dlugosch KM, Parker IM (2008). Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.*, v. 17, p. 431–449.
- Donaldson KA, Wilson RRJ (1999). Amphi-panamic geminates of snook (Percoidae: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 13: 208–213.
- Dubut V, Grenier R, Meglecz E, Chappaz R, Costedoat C, Danancher D, Descloux S, Malausa T, Martin Jf, Pech N, Gilles A (2010). Development of 55 novel polymorphic microsatellite *loci* for the critically endangered *Zingel asper* L. (Actinopterygii: Perciformes: Percidae) and cross-species amplification in five other percids. *Eur. J. Wildlife Resources*, 56, 931–938.
- Dudgeon D (2000a). Large-scale hydrological alterations in tropical Asia: prospects for riverine biodiversity. *BioScience* 50, 793–806

- Dudgeon D, Arthington AH, Gessner MO, Kawabata ZI, Knowler DJ, Leveque C et al. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews* 81, 163–182.
- Duncan KM, Holland KN (2006). Habitat use, growth rates and dispersal patterns of juvenile scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in a nursery habitat. *Marine Ecology Progress Series*.
- Duran C, Appleby N, Edwards D, Batley J (2009B). Molecular genetic markers: discovery, applications, data storage and visualisation. *Current Bioinformatics*, 4, 16–27.
- El-Nagar A, Mchugh M, Rapp T, Sims DW, Genner MJ (2010). Characterisation of polymorphic microsatellite markers for skates (Elasmobranchii: Rajidae) from expressed sequence tags. *Conservation Genetics*, 11, 1203–1206
- Ellegren H, Sheldon BC (2008). Genetic basis of fitness differences in natural populations. *Nature* 452, 169–175.
- Englbrecht CC, Largiadèr CR, Hänfling B, Tautz D (1999). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in the European bullhead *Cottus gobio* L. (Osteichthyes) and their applicability to related taxa. *Mol. Ecol.* 8: 1957-1969.
- Eschmeyer WN & Fong JD (2013). Species of Fishes by family/ subfamily. Available at: <http://research.calacademy.org/redirect?url=http://researcharchive.calacademy.org/research/Ichthyology/catalog/fishcatmain.asp>. Accessed 2013.
- Estoup A, Guillemaud T (2010). Reconstructing routes of invasion using genetic data: why, how and so what? *Molecular Ecology* 19, 4113–4130.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Farias IP, Hrbek T, Brinkmann H, Sampaio I, Meyer A (2003). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaimas gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Mol. Ecol. Notes* 3: 128-130.
- Fagan WF, Aumann C, Kennedy CM, Unmack PJ (2005). Rarity, fragmentation, and the scale dependence of extinction risk in desert fishes. *Ecology*, 86, 34–41.
- Fagan WF, Unmack PJ, Burgess C, Minckley WL (2002). Rarity, fragmentation, and extinction risk in desert fishes. *Ecology*, 83, 3250–3256.
- Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV (2001a). Population genetic structure of the lemon shark (*Negaprion brevirostris*) in the western Atlantic: DNA microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 10, 295–303.

Feldheim KA, Gruber SH, Ashley MV (2001b). Multiple paternity of a lemon shark litter (Chondrichthyes: Carcharhinidae). *Copeia*, 7, 781–786.

Felsenstein J (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap Evolution . Vol. 39, No. 4, Jul.

Fitzpatrick S, Shivji Ms, Chapman Dd, Prodohl PA (2011). Development and characterization of 10 polymorphic microsatellite *loci* for the blue shark, *Prionace glauca*, and their cross shark-species amplification. *Conservation Genetics Resources*, 3, 523–527.

Fonseca GLP (2005). O MERCOSUL e sua rede hidrográfica. Informativo nº 4. Brasília, DF, Congresso Nacional, Comissão Parlamentar Conjunta do MERCOSUL, Representação Brasileira, fev.-mar (1997). Disponível em: <http://www.camara.gov.br/mercosul/Informativo/info_4.htm#Mercosul>. Acesso em: 08 abr. 2005.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004). *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 220 p.

Frederico RG, Farias IP, Araújo MLG, Charvet-Almeida P, Alves-Gomes JA (2012). Phylogeography and conservation genetics of the Amazonian freshwater stingray *Paratrygon aiereba* Müller & Henle, 1841 (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) *Neotropical Ichthyology*, 10(1): 71-80.

Garcez R, Calcagnotto D, Almeida-Toledo LF (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from rio Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 21: 268–275.

García De León JF, Chikhi L, Bonhomme F (1997). Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Mol. Ecol.* 6: 51-62.

Gardner MG, Fitch AJ, Bertozzi T, Lowe AJ (2011) Rise of the machines - Recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Research*, 11, 1093–1101.

Garman SW (1877). On the pelvis and external sexual organs of selachiens, with special reference to the new genera *Potamotrygon* and *Disceus*. *Proc. Boston Soc. Nat. Hist.*, 19, 197-215.

Garrone Neto D, Haddad Jr V, Vilela MJA, Uieda VS (2007). Registro de ocorrência de duas espécies de potamotrígonídeos na região do Alto Rio Paraná e algumas considerações sobre sua biologia. *Biota Neotrópica* 7; 1-4.

Gaskin JF, Zhang DY, Bon MC (2005). Invasion of *Lepidium draba* (Brassicaceae) in the Western United States: distributions and origins of chloroplast haplotypes. *Mol. Ecol.*, v. 14, p. 2331–2341.

Geller JB, Darling JA, Carlton JT (2010). Genetic perspectives on marine biological invasions. *Annual Review of Marine Science* 2, 367–393.

- Giresi M, Renshaw MA, Portnoy DS, Gold JR (2011a). Isolation and characterization of microsatellite markers for the dusky smoothhound shark, *Mustelus canis*. Conservation Genetics. doi: 10.1007/s12686-011-9484-6
- Giresi M, Renshaw MA, Portnoy DS, Gold JR (2011b) Isolation and characterization of microsatellite markers for the blacknose shark, *Carcharhinus acronotus*. Conservation Genetics. doi: 10.1007/s12686-011-9494-4.
- Gharrett AJ, Mecklenburg CW, Seeb LW, Li L, Matala AP, Gray AK, Heifetz J (2006). Do genetically distinct rougheye rockfish sibling species differ phenotypically? Trans. Am. Fish. Soc. 135:792-800.
- Goldstein Db, Schlotterer C (1999). Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford.
- Gomes PC, Ribeiro RP, Sirol RN, Lopera-Barrero NM, Moreira HLM, Povh JA, Mangolin CA, Vargas L, Jacometo C.B., Streit JR (2011). Diversidade genética de dourado utilizado em programas de repovoamento no rio Paranapanema. Pesq. agropec. bras., Brasília, v.46, n.2, p.167-173.
- Gozlan RE (2008). Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? Fish Fish 9:106–115
- Gozlan RE, Andreou D, Asaeda T et al. (2010). Pan-continental invasion of *Pseudorasbora parva*: towards a better understanding of freshwater fish invasions. Fish F.
- Grant V (1981). Plant Speciation (2nd ed.)Columbia University Press, New York.
- Grant PR, Grant BR (1992).Hybridization of bird species Science, 256 (1992), pp. 193–197.
- Grant PR, Grant BR (1996). Speciation and hybridization in island birds. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 351 (1996), pp. 765–772
- Graves JE (1998) Molecular insights into the population structure of cosmopolitan marine fishes. Journal of Heredity, 89, 427–437.
- Griffiths AM, Sims DW, Cotterell SP, Nagar AE, Ellis JR, Lynghammar A, Mchugh M, Neat FC, Pade NGg, Queiroz N (2010). Molecular markers reveal spatially segregated cryptic species in a critically endangered fish, the common skate (*Dipturus batis*). Proceedings of the Royal Society B, 277, 1497–1503.
- Guichoux E, Lagache L, Wagner S, Chaumeil P, Léger P, Lepais O, Lepoittevin C, Malausa T, Revardel E, Salin F (2011). Current trends in microsatellite genotyping. Molecular Ecology Resourch, 211, 591–611.
- Guo S, Thomson E (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. Biometrics, 144: 1933-1940.
- Hall TA (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp. Ser. 41, 95–98.

- Hamilton MB, Pincus EL, DiFiore A, Fleischer RC (1999). Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *Biotechniques* 27:500–507.
- Hänfling B (2007). Understanding the establishment success of non-indigenous fishes: lessons from population genetics. *Journal of Fish Biology* (2007) 71 (Supplement D), 115–135
- Hänfling B, Hellemans F, Volckaert AM, Carvalho GR (2002). Late glacial history of the cold-adapted freshwater fish *Cottus gobio* revealed by microsatellites. *Mol. Ecol.* 11: 1717-1729.
- Hansen MM, Ruzzamante DE, Nielsen EE, Mensberg KD (2000). Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology* 9: 583-594.
- Hansen MM, Mensberg KLD (1996). Founder effects and genetic population structure of brown trout (*Salmo trutta*) in a Danish river system. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53, 2229-2237.
- Hansen MM, Mensberg KLD, Berg S (1999). Postglacial recolonization patterns and genetic relationships among whitefish (*Coregonus* sp.) populations in Denmark, inferred from mitochondrial DNA and microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 8, 239–252.
- Hartl DL, Clark AG (1997). *Principles of population genetics*. 3 ed. Canada: Sinauer. 542p
- Harrison RG (1989). Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in populational and evolutionary biology. *Trends in Ecology & Evolution*, v .46, p. 06-11.
- Harrison RG (1990). Hybrid zones, windows on evolutionary processes ,in: D. Futuyma, J. Antonovics (Eds.), *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7Oxford University Press, Oxford (1990), pp. 69–128
- Hatanaka T, Henrique-Silva F, Galetti Jr. PM (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes,Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126:1-7.
- Hebert PD, Ratnasingham S, Dewaard JR (2003a). Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B* 270(Suppl.), S96–S99.
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, Dewaard JR (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc.*
- Heggenes J, Roed KH (2006). Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish*, 15, 366–375.
- Heist EJ, Gold JR (1999). Microsatellite variation in sandbar sharks (*Carcharhinus plumbeus*) from the Gulf of Mexico and Mid-Atlantic Bight. *Copeia* 1999: 182-186.
- Heist EJ (2004). Genetics of sharks, skates and rays. In: Carrier JC, Musick JA, Heithaus MR, editors. *Biology of sharks and their relatives*. New York: CRC Press. p. 471–485.

- Heist EJ, Jenkot JL, Keeney DB (2003). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in nurse shark (*Ginglymostoma cirratum*). Mol. Ecological Notes, 3, 59–61.
- Helyar S, Coscia I, Sala-Bozano M, Mariani S (2011). New microsatellite *loci* for the longnose velvet dogfish *Centroselachus crepidater* (Squaliformes: Somniosidae) and other deep sea sharks. Conservation Genetics Resources, 3, 173–176.
- Hochberg ME & Gotelli NJ (2005). An invasions special issue. Trends in Ecology & Evolution 20, 211.
- Hoffman JI, Nichols HJ (2011). A novel approach for mining polymorphic microsatellite markers in silico. PLoS One 2011, 6, doi:10.1371/journal.pone.0023283.
- Hubert N, Hanner R, Holm E, Mandrak NE, Taylor E (2008). Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. Public Library of Science, 3, e2490.
- Iyengar A, Piyapattanakorn S, Heipel DA, Stone DM, Howell BR, Child AR, Maclean N. (2000). A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) with potential for use across several flatfish species. Mol. Ecol. 9: 365-378.
- Jager HI, Chandler JA, Lepla KB, Winkle WV (2001). A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. Environmental Biology of Fishes, 60, 347–361.
- Johansen SD, Coucheron DH, Andreassen M, Karlsen BO, Furmanek T, Jorgensen TE, Emblem A, Breines R, Nordeide JT, Moum T, Nederbragt AJ, Stenseth NC, Jakobsen KS (2009). Large-scale sequence analyses of Atlantic cod. New Biotechnology, 25, 263–271.
- John MV, Parez I, Sivaram MVS, Mehta S, Marwah N, Ali S (1996). Analysis of VNTR *loci* in fish genomes using synthetic oligodeoxyribonucleotide probes. Gene 172: 191-197.
- Jones AG, Avise JC (1997). Microsatellite analysis of maternity and the mating system in the Gulf pipefish *Syngnathus scovelli*, a specie with male pregnancy and sex-role reversal. Mol. Ecol. 6: 203-213.
- Kamonrat W, Mcconnell KJ, Cook DI (2002). Polymorphic microsatellite *loci* from the Southeast Asian cyprinid, *Barbodes gonionotus* (Bleeker). Mol. Ecol. Notes 2: 89-90.
- Kang JH, Park JY, Jo HS (2012). Rapid Development of Microsatellite Markers with 454 Pyrosequencing in a Vulnerable Fish, the Mottled Skate, *Raja pulchra*. International Journal of Molecular Science, 13, 7199-7211.
- Keeney DB, Heist E J (2003). Characterization of microsatellite *loci* isolated from the blacktip shark and their utility in requiem and hammerhead sharks. Molecular Ecology Notes, 3, 501–504.
- Kimura M, Crow JF (1964). The number of alleles that can maintained in a finite populations. Genetics, 49: 725-738.

- Kimura M & Ohta T (1978). Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite populations. *Proceedings of Natural Academy of Sciences of the USA*, 75: 2868-2872.
- Kircher M, Kelso J (2010). High-throughput DNA sequencing-concepts and limitations. *BioEssays*, 32, 524–536.
- Kocher TD, Stepien CA (1997). *Molecular Systematics of Fishes*. Academic Press, London, U.K.
- Kocher TD, Thomas WK, Meyer A, Edwards SV, Paabo S, Villablanca FX, Wilson A (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved *primers*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86, 6196-6200.
- Kolar CS, Lodge DM (2001). Progress in invasion biology: predicting invaders. *Trends Ecol. Evol.*, v. 16, p. 199–204.
- Koo W, Mattson W (2004). *Economics of Detection and Control of Invasive Species: Workshop Highlights*. Fargo, N.D: Centre for Agricultural Policy and Trade Studies, Department of Agribusiness and Applied Economics.
- Kotlik P, Berrebi P (2002). Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. *Mol Phylog. Evol*, 24, 10-18.
- Koblmüller S, Sturmbauer C, Verheyen E, Meyer A, Salzburger W (2006) Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes: Synodontis). *Evolutionary Biology*, 6, 49-65.
- Krieg F, Estoup A, Triantafyllidis A, Guyomard R (1999). Isolation of microsatellite *loci* in European catfish, *Silurus glanis*. *Mol. Ecol.* 8: 1957-1969.
- Lee WJ, Kocher TD (1996). Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology* 49: 169-171.
- Lerner HRL, Fleischer RC (2010). Prospects For The Use Of Next Generation Sequencing Methods In Ornithology. *Auk*, 127, 4–15.
- Lessios HA (2008). The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the Central American isthmus. *Annu. Rev. Ecol. Evol. S.* 39, 63-91.
- Lewin B (1994). *Genes V*. Oxford University Press. ISBN 0-19-854287-9. 1272 pp.
- Li E, Beard C, Forster AC, Bestor TH, Jaenisch R (1993). DNA Methylation, Genomic Imprinting, and Mammalian Development. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*. 58:297-305.
- Librado P, Rozas J (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.

- Levin DA, Francisco-Ortega J, Jansen RK (1996). Hybridization and the extinction of rare plant species. *Cons. Biol.*, 10 (1996), pp. 10–16.
- Leuzzi MSP, Almeida FS, Orsi ML, Sodré LMK (2004). Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 27, 3, 355-362.
- Lockwood JL, McKinney ML (2001). *Biotic Homogenization*. Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY, U.S.A.
- Lodge D. (1993) Biological invasions: lessons for ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 8, 133–137.
- Lonardon AP, Oliveira EF, Goulart E (2009). Trophic ecomorphology of *Potamotrygon falkneri* and *Potamotrygon motoro* (Chondrichthyes - Potamotrygonidae) on the upper Paraná river floodplain, Brazil. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences* (2009), 4(4):436-445
- Lovejoy NR, Bermingham E, Martin AP (1998). Marine incursions into South America. *Nature* 396: 421-422.
- Magain N, Forrest LI, Serusiaux E, Goffinet B (2010). Microsatellite primers in the *Peltigera dolichorhiza* complex (lichenized Ascomycete, Peltigerales). *American Journal of Botany*, 97, 102–104.
- Malausa T, Gilles A, Meglécz E, Blanquart H, Duthoy S, Costedoat C, Dubut V, Pech N, Castagnone-Sereno P, Délye C (2011). High-throughput microsatellite isolation through 454 GS-FLX Titanium pyrosequencing of enriched DNA libraries. *Molecular Ecology Research*, 11, 638–644.
- Makrakis S, Miranda LE, Gomes LC, Makrakis MC, Junior HMF (2011). Ascent of Neotropical Migratory Fish in the Itaipu Reservoir Fish Pass. *River Research and Applications*, 27: 511-519.
- Maniglia TC (2010). Caracterização molecular de espécies de *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) da planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil: variabilidade e diferenciação genética, hibridação e filogeografia. Dissertação de Mestrado.
- Mardis ER (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genetics*, 24, 133–141
- Margulies M, Egholm M, Altman We, Attiya S, Bader Js, Bembem La (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*, 437, 376–380.
- Marrs RA, Sforza R, Hufbauer RA (2008). When invasion increases population genetic structure: a study with *Centaurea diffusa*. *Biol Invasions* 10:561–572
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7, 639–655.

- Martin AP & Palumbi RS (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4087–4091.
- Martin AP (1999). Substitution rates of organelle and nuclear genes in sharks: implicating metabolic rate (again). *Mol. Biol. Evol.* 16, 996–1002.
- Martin AP, Pardini AT, Noble LR, Jones CS (2002). Conservation of a dinucleotide simple sequence repeat locus in sharks. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 23, 205–213.
- Martinez P, Bouza C, Castro J, Hermida M, Pardo BG, Sánchez L (2007). Analysis of a secondary contact between divergent lineages of brown trout *Salmo trutta* L. from Duero basin using microsatellites and mtDNA RFLPs. *Journal of Fish Biology* 71 (Supplement B), 195–213.
- Mayr E (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- McElroy TC, Kandl KL, Garcia J, Trexler JC (2003). Extinction-colonization dynamics structure genetic variation of spotted sunfish (*Lepomis punctatus*) in the Florida Everglades. *Molecular Ecology*, 12, 355–368.
- McConnell SK, O’relly P, Hamilton L, Wright JM, Bentzen P (1995). Polymorphic microsatellite *loci* from Atlantic salmon (*Salmo salar*): genetic differentiation of North American and European Populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 52: 1863–1872.
- McKinney ML (2006). Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation*, 127, 247–260.
- Meldgaard T, Nielsen EE, Loeschcke V (2003). Fragmentation by weirs in a riverine system: a study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics*, 4, 735–747.
- Mendonça FF, Ussami LHF, Hashimoto DT, Pereira LHG, Porto-Foresti F, Oliveira C, Gadig OBF, Foresti F (2012). Identification and characterization of polymorphic microsatellite *loci* in the blue shark *Prionace glauca*, and cross-amplification in other shark species. *Journal of Fish Biology*, doi:10.1111/j.1095-8649.2012.03291.x.
- Mendonça FF, Oliveira C, Burgess G, Coelho R, Piercy A, Gadig OBF, Foresti F (2009). Species delimitation in sharpnose sharks (genus *Rhizoprionodon*) in the western Atlantic Ocean using mitochondrial DNA. *Conservation Genetics*. Volume 12, Number 1, 193–200.
- Mezerra M, Largiader CR (2001). Comparative analysis of introgression at three marker classes: a case study in a stocked population of brown trout. *J. Fish. Biol.* 59: 298–305.
- Michelizzi Vn, Dodson Mv, Pan Zx, Amaral Mej, Michal Jj, Mclean Dj, Womack Je, Jiang Zh (2010). Water buffalo genome science comes of age. *Internat J. of Biology Science*, 6, 333–349.
- Miura O (2007). Molecular genetic approaches to elucidate the ecological and evolutionary issues associated with biological invasions. *Ecological Research* 22, 876–883.

- Morita K, Yokota A (2002). Population viability of stream-resident salmonids after habitat fragmentation: a case study with white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) by an individual based model. *Ecological Modelling*, 155, 85–94.
- Morizot DC, Clahoun SW, Clepper LL, Schmidt ME (1991). Multispecies hybridization among native and introduced centrarchid basses in central Texas. *Trans. Amer. Fish. Soc.* 120:283-289.
- Morgan JAT, Harry AV, Welch DJ, Street R, White J, Geraghty PT, Macbeth WG, Tobin NA, Simpfendorfer CA, Ovenden JR (2011). Detection of interspecies hybridisation in Chondrichthyes: hybrids and hybrid offspring between Australian (*Carcharhinus tilstoni*) and common (*C. limbatus*) blacktip shark found in an Australian fishery. *Conservation genetics*. Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/147031537857tx27>
- Moura CJ, Harris D J, Cunha MR, Rogers AD (2008). DNA barcoding reveals cryptic diversity in marine hydroids (Cnidaria, Hydrozoa) from coastal and deep-sea environments. *Zoologica Scripta*, 37, 93–108.
- Muirhead JR, Gray DK, Kelly DW, Ellis SM, Heath DD, Macisaac HJ (2008). Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Molecular Ecology* 17, 1020–1035.
- Murray BW, Wang JY, Yang SC, Stevens JD, Fisk A, Svavarsson J (2008). Mitochondrial cytochrome b variation in sleeper sharks (Squaliformes: Somniosidae). *Mar. Biol.* 153 (6), 1015–1022.
- Nair A, Kumar K, George S, Gopalan S, Li Mh, Leder E, Merilä J (2011). Sixty-two new microsatellite markers for an endemic frog *Indirana beddomii* from the Western Ghats biodiversity hotspot. *Conservation Genetics Resources*, 3, 167–171.
- Neraas LP, Spruell P (2001). Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Mol. Ecol.* 10: 1153-1164.
- Nilsson J, Schmitz M (1995). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) in Artic char. *Nordic J. Freshwater Res.* 71: 372-377.
- Novak SJ (2007). The role of evolution in the invasion process. *PNAS USA* 104, 3671–3672.
- O’connell M, Dillon MC, Wright JM (1998). Development of primers for polymorphic microsatellite loci in the Pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Mol. Ecol. Notes* 7: 357-363.
- Olivatti AM, Boni TA, Silva-Júnior NJ, Resende LV, Gouveia FO, Telles MPC (2011). Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. *Genetics and Molecular Research* 10 (3): 1403-1408.
- Oliveira AV, Prioli AJ, Prioli SMAP, Bignotto TS, Julio Jr HF, Carrer H, Agostinho CS, Prioli LM (2006). Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *Journal of Fish Biology*, v. 69, p. 260-277.

- Oliveira AV, Prioli AJ, Prioli SMAP, Pavanelli CS, Júlio Jr.HF, Panarari RS (2002). Diversity and genetic distance in populations of *Steindachnerina* in the upper Paraná river floodplain of Brazil. *Genetica*, n.115p. 259-267.
- Oliveira C, Foresti F, Hilsdorf AWS (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35: 81-100.
- Oliveira, C.; Avelino, G.S.; Abe, K.T.; Mariguela, T.C.; Benine, R.C.; Ortíz, G.; Vari, R.P.; Corrêa e Castro, R.M. 2011. Phylogenetic relationships within the speciose family Characidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes) based on multilocus analysis and extensive ingroup sampling. *BMC Evolutionary Biology* 11: 275. 25Pp.
- O'reilly PT, Canino MF, Bailey KM, Bentzen P (2000). Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye pollock and other gadoids. *Journal of Fish Biology* 56: (5) 1074-1086.
- Ostrander EA, Jong PM, Rine J, Duck G (1992). Construction of small insert genomic libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 3419–3423
- Paes ADNVA (2011). Caracterização citogenética das espécies matrinxã (*Brycon amazonicus*), piraputanga (*Brycon hilarii*) e sua geração filial, utilizados na piscicultura brasileira. Dissertação – Unesp, Botucatu/SP.
- Palti Y, Fincham MR, Rexroad I (2002). Characterization of 38 polymorphic microsatellite markers for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol. Ecol. Notes* 2: 449-452.
- Parker KM, Sheffer RJ, Hedrick PW (1999). Molecular variation and evolutionarily significant units in the endangered Gila topminnow. *Conserv. Biol.* 13 (1): 108-116.
- Pauchet Y, Wilkinson P, Van Munster M, Augustin S, Pauron D, French-Constant RH (2009). Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. *Insect Bioch. and Molecular Biology*, 39, 403–413.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M, And Rafalski A (1998). Cross-species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (microsatellites) within the genus and other legume genera - implications for the transferability of microsatellites in plants. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 1275–1287.
- Peakall R & Smouse PE (2006). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pereira LHG (2011). Identificação Molecular dos Peixes da bacia do Alto rio Paraná. Tese, Unesp – Botucatu/SP.
- Pereira LHG, Foresti F & Oliveira C (2009). Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggest homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 215-225.

- Pereyra S, García G, Millerb PC, Oviedoa S, Domingo A (2010). Low genetic diversity and population structure of the narrownose shark (*Mustelus schmitti*). *FISheries Research* 106 (2010) 468–473
- Perry JD, Riley G, Johnston S, Dark JH, Gould Fk (2002). Activity of disinfectants against Gram-negative bacilli isolated from patients undergoing lung transplantation for cystic fibrosis. *J Heart Lung Transplant*; 21: 1230-1231.
- Piry S, Alapetite A, Cornuet JM, Paetkau D, Baudouin L & Estoup A (2004) GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539.
- Plank SM, Lowe CG, Feldheim KA, Wilson Jr.RR, Brusslan JA (2010). Population genetic structure of the round stingray *Urobatis halleri* (Elasmobranchii: Rajiformes) in southern California and the Gulf of California. *Journal of Fish Biology* Volume 77, 2.
- Pringle CM (2003). What is hydrologic connectivity and why is it ecologically important? *Hydrological Processes*, 17, 2685–2689.
- Pompeu PS, Godinho HP (2006). Effects of extended absence of flooding on the fish assemblages of three floodplain lagoons in the middle Sao Francisco River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 4, 427-433.
- Portnoy DS (2010). Molecular insights into elasmobranch reproductive behavior for conservation and management. In *Sharks and Their Relatives II: Biodiversity, Adaptive Physiology, and Conservation*, 4, 435–457.
- Portnoy DS & Heist EJ (2012). Molecular markers: progress and prospects for understanding reproductive ecology in elasmobranchs. *Journal of Fish Biology* (2012) 80, 1120–1140.
- Powell W, Morgante M, Andre C (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breed*, 2, 225–238.
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rahel FJ (2002). Homogenization of freshwater faunas. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 33, 291–315.
- Rasmussen DA, Noor MAF (2009). What can you do with 0.1× genome coverage? A case study based on a genome survey of the scuttle fly *Megaselia scalaris* (Phoridae). *B.M.C. Genomics*, 10, 382.
- Raymond M & Rousset F (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249.
- Revaldaves E (2001). Variabilidade genética e estrutura populacional de *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) na bacia do rio Paraná evidenciadas por marcadores moleculares. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR. 38p.

- Rice WR (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Ricciardi A (2007). Are modern biological invasions an unprecedented form of global change? *Conservation Biology* 21, 329–336.
- Ricklefs RE & Schluter D (1993). Species diversity: regional and historical influences. In: *Species Diversity in Ecological Communities: Historical and Geographical Perspectives* (Eds R.E. Ricklefs & D. Schluter), pp. 350– 363. The University of Chicago Press, Chicago, IL, U.S.A.
- Rincon GF (2006). Aspectos taxonômicos, alimentação e reprodução da raia de água doce (*Potamotrygon orbignyi*, Castelnau) (Elasmobranchii: Potamotrygonidae) no Rio Paraná – Tocantins. Tese de Doutorado. Unesp, Rio Claro-SP.
- Rhymer JM, Simberloff D (1996). Extinction by hybridization and introgression. *Ann. Rev. Ecol. and Syst.*, 27 (1996), pp. 83–109
- Ronaghi M, Karamohamed S, Pettersson B, Uhlen M, Nyren P (1996). Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem.* 242: 84–89
- Ronaghi M, Uhlen M, Nyren P (1998). A sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science* 281:363–365
- Ronaghi M (2001). Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Res* 11:3–11.
- Rocha-Olivares A, Moser HSG, Stannard J (2000). Molecular identification and description of pelagic young of the rock-fishes *Sebastes constellatus* and *Sebastes ensifer*. *Fish. Bull.* 98: 353-363.
- Rosa RS (1985). A systematic revision of the South American freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). PhD thesis. The College of William and Mary, Williamsburg. 523p.
- Rosa RS, Castello H P, Thorson TB (1987). Plesiotrygon iwamae, a New Genus and Species of Neotropical Freshwater Stingray (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). *Copeia*, 2, 447 – 458.
- Rosa RS & Carvalho MRd (2007) Família Potamotrygonidae. In: Buckup PA, Menezes NA and Ghazzi MSA (eds) Catálogo das Espécies de Peixes de Água Doce do Brasil. Museu Nacional, Rio de Janeiro, pp 17-18.
- Rozen S, Skaletsky H (2000). *Primer 3* on the WWW for general users and for biologist programmers. In: *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology* (eds KrawetzS, MisenerS), 365–386.
- Saarinen EV, Austin JD (2010). When technology meets conservation: Increased microsatellite marker production using 454 genome sequencing on the endangered *Okaloosa darter* (*Etheostoma okaloosae*). *Journal of Heredity*, 101, 784–788.
- Sakai AK, Allendorf FW, Holt JS, Lodge DM, Molofsky J, With KA, Baughman S, Cabin RJ, Cohen JE, Ellstrand NC, Mccauley DE, O'neil P, Parker IM, Thompson JN & Weller SG (2001). The population biology of invasive species. *Annual Review Ecology and Systematics* 32, 305-332.

- Santana QC, Coetzee MPA, Steenkamp ET, Mlonyeni OX, Hammond GNA, Wingfield MJ, Wingfield BD (2009). Microsatellite discovery by deep sequencing of enriched genomic libraries. *Biotechniques*, 46, 217–223.
- Sax DF, Stachowicz JJ, Brown JH, Bruno JF, Dawson MN, Gaines SD et al. (2007). Ecological and evolutionary insights from species invasions. *Trends in Ecology & Evolution* 22, 465–471.
- Schluessel V, Broderick D, Collin SP, Ovenden JR (2010). Evidence for extensive population structure in the white-spotted eagle ray within the Indo-Pacific inferred from mitochondrial gene sequences. *J. Zool.* 281, 46–55.
- Schrey AW, Heist EJ (2003). Microsatellite analysis of population structure in the shortfin mako (*Isurus xyrinchus*). *Search Results. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 60, 670–675.
- Schuelke M (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol*, 18, 233–234
- Schuler GS, Boguski MS, Stewart EA, Stein LD, Gyapay G, Rice K, White RE, Aggarwal A, Bajorek E et al. (1996). A gene map of the human genome. *Science* 274: 540–546.
- Schuster SC (2008). Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature*, 5, 16–18.
- Scribner KT & Avise JC (1993). Cytonuclear genetic architecture in mosquitofish populations and the possible roles of introgressive hybridization. *Molecular Ecology* 2:139-149.
- Scribner KT, Page KS, Bartron ML (2001). Hybridization in freshwater fishes: a review of case studies and cytonuclear methods of biological inference. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, v.10, p.293-323.
- Seehausen O (2004). Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 19:198–207
- Selkoe KA & Toonen RJ (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9, 615–629.
- Sellas AB, Bassos-Hull K, Hueter RE, Feldheim K (2011). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers from the spotted eagle ray (*Aetobatus narinari*). *Conservation Genetics Resources* 3, 609–611.
- Shikano T, Taniguchi N (2002). Heterosis for neonatal survival in the guppy. *J. Fish Biol.* 60: 715-725.
- Shivji MS, Clarke S, Pank M, Natanson L, Kohlmann Stanhop E M (2002). Genetic identification of pelagic shark body parts for conservation and trade monitoring. *Conserv Biol* 16:1036-1047.
- Silva JPCB, Carvalho MRV (2011). A taxonomic and morphological redescription of *Potamotrygon falkneri* Castex & Maciel, 1963 (Chondrichthyes: Myliobatiformes: Potamotrygonidae). *Neotropical Ichthyology*, 9, 209-232.

- Slatkin M (1985). Rare alleles as indicators of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65.
- Slatkin M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457-462.
- Smith WD, Bizzarro JJ, Richards VP, Nielsen J, Márquez-Farías F, Shivji MS (2009). Morphometric convergence and molecular divergence: the taxonomic status and evolutionary history of *Gymnura crebripunctata* and *Gymnura marmorata* in the eastern Pacific Ocean. *Journal of Fish Biology* 75, 761–783.
- Somme L, Raabova J, Jacquemart Al, Raspe O (2012). Development and multiplexing of microsatellite markers using pyrosequencing in the clonal plant *Comarum palustre* (Rosaceae). *Molecular Ecology Resources*, 12, 91–97.
- Strecker U, Bernatchez L, Wilkens H (2003). Genetic divergence between cave and surface populations of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Mol. Ecol.* 12: 699-710.
- Sved JA, Yu H, Dominiak B, Gilchrist AS (2008). Inferring modes of colonization for pest species using heterozygosity comparisons and a shared-allele test. *Genetics*, v. 63, p. 823-831.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007). "MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0". *Mol. Biol. Evol.* 24 (8): 1596–9
- Taylor MI, Meardon F, Turner G, Seehausen O, Mrosso HDJ, Rico C (2002). Characterization of tetranucleotide microsatellite *loci* in a Lake Victorian, haplochromine cichlid fish: a *Pundamilia pundamilia* x *Pundamilia nyererei* hybrid. *Mol. Ecol.* 2: 443-445.
- Thompson JD, et al. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882
- Thorson TB, Wootton RM, Georgi TD (1978). Rectal gland of freshwater stingrays, *Potamotrygon* sp. (Chondrichthyes:Potamotrygonidae) *Biol. Bull.* 154: 508-516.
- Toffoli D (2006). Dissertação - História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon garman*, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica.
- Toffoli D, Hrbek T, Araújo MLG, Almeida MP, Charvet-Almeida P, Farias IP (2008). A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae, Myliobatiformes). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1)(suppl):324-336.
- Vanpe C, Buschiazzi E, Abdelkrim J, Morrow G, Nicol SC, Gemmell NJ (2009). Development of microsatellite markers for the short-beaked echidna using three different approaches. *Australian Journal of Zoology*, 57, 219–224.
- Vazzoler AEAM et al. (1997). A planície de inundação do Alto rio Paraná: aspectos físicos, biológicos e socioeconômicos. Maringá, Eduem.

- Veríssimo A, Moura T, McDowell J, Graves J, Gordo L, Hoelzel R (2011b). Isolation and characterization of ten nuclear microsatellite *loci* for the Portuguese dogfish *Centros cymnus*. Conservation Genetics Resources, 3, 299–301.
- Vidal O, Garcí'a-Berthou E, Tedesco PA, García-Marin JL (2010) Origin and genetic diversity of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) introduced to Europe. Biological Invasions 12, 841–851.
- Vilas R, Bouza EC, Castro EJ, López EA, Martínez P (2010). Management units of brown trout from Galicia (NW: Spain) based on spatial genetic structure analysis. Conservation Genetics, Volume: 11, Issue: 3, Publisher: Springer, Pages: 897-906.
- Vilela MJA, Franco RAM, Almeida NVA (2004). Monitoramento da pesca no reservatório de Porto Primavera (UHE Engº Sérgio Motta), no Rio Paraná. Relatório Final (Agosto/2000-Novembro/2003), CESP/FAPEC/UFMS, Três Lagoas.
- Vitousek PM, D'Antonio CM, Loope LL, Rejmánek M And Westbrooks R (1997). Introduced species: a significant component of human-Caused Global Change. New Zealand Journal of Ecology (1997) 21(1): 1-16 ©New Zealand Ecological Society.
- Yamamoto S, Morita K, Koizumi I, Maekawa K (2004). Genetic differentiation of whitespotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial– temporal changes in gene frequencies. Conservation Genetics, 5, 529–538.
- You FM, Huo N, Gu YQ, Luo M, Ma Y, Hane D (2008). BatchPrimer3: A high throughput webapplication for PCR and sequencing primer design. BMC Bioinformatics, 9,253.
- Yu JN, Won C, Jun J, Lim YW, Kwak M (2011). Fast and cost-effective mining of microsatellite markers using NGS technology: An example of a Korean Water Deer, *Hydropotes inermis* Argyropus. PLoS One 6, doi:10.1371/journal.pone.0026933.
- Zane L, Bargelloni L, Patarnello T (2002). Strategies for microsatellite isolation: A review. Molecular Ecology, 11, 1–16
- Zhang FJ, Guo HY, Zheng HJ, Zhou T, Zhou YJ, Wang SY, Fang RX, Qian W, Chen XY. (2010). Massively parallel pyrosequencing-based transcriptome analyses of small brown planthopper (*Laodelphax striatellus*), a vector insect transmitting rice stripe virus (RSV). B.M.C. Genomics, 11, 303.
- Zhang DX, Hewitt GM (1996). Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers. Trends in Ecology and Evolution, 11, 247–251.
- Wasko AP, Galetti PM (2000). Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). Genet. Mol. Biol. 23: 135-138.
- Ward RD, Zemplak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005). DNA barcoding Australia's fish species. Phil. Trans. R. Soc. B, pp. 1-11.

- Waters JM, Epifanio J M, Gunter T, Brown BL (2000). Homing behaviour facilitates subtle genetic differentiation among river populations of *Alosa sapidissima*: microsatellites and mtDNA. *Journal of Fish Biology* 56: 622-636.
- Watts PC, Nash RDM, George SG, Kemp SJ (1999). Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the European plaice, *Pleuronectes platessa* L. (Teleostei: Pleuronectidae). *Mol. Ecol.* 8: 2141-2152.
- Weir BS & Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wirth T, Saint-Laurent R, Bernatchez L (1999). Isolation and characterization of microsatellite *loci* in the walleye (*Stizostedion vitreum*), and cross-species amplification within the family Percidae. *Mol. Ecol.* 8: 1957-1969.
- Wong EHK, Shivji MS, Hanner RH (2009). Identifying sharks with DNA barcodes: assessing the utility of a nucleotide diagnostic approach. *Mol. Ecol. Res.* 9, 243-256.
- Wright S (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
- Wright S (1978). *Evolution and the Genetics of Populations*, vol. 4, Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago, IL.

*A*nexos

Pm_02_F GCTGTCAGGTAGACTGGAGTTG	(AG)8	104pb
Pm_02_R TCTCAACGGAATCGAAGTCA		

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	151	22	59.02	54.55	5.00	0.00	
GCTGTCAGGTAGACTGGAGTTG							
RIGHT PRIMER	254	20	59.37	45.00	4.00	1.00	
TCTCAACGGAATCGAAGTCA							

Pm_03_F GGTGTGTAGGTGTTTCTGTGTT	(GT)8	290pb
Pm_03_R GCTTCTCAAGTGGTGCATGA		

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	168	22	56.61	45.45	2.00	0.00	
GGTGTGTAGGTGTTTCTGTGTT							
RIGHT PRIMER	457	20	59.99	50.00	4.00	2.00	
GCTTCTCAAGTGGTGCATGA							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03GE0BY

Pm_04_F CCCAACAACCTCTACCAGGA	(CA) ⁹ A (CA) ⁴	114pb
Pm_04_R ACGGTGAAGCCCATAACATT		

1 AAAAAAGCTTGCCATGATAGCGC**C****CCAA****C**A**A****C**T**C**T**A****C****C****G****G**A**G**TTAAGGACG**C****A****C****A****C****A****C**
 >>>>>>>>>>>>>> *****
61 **A****C****A****C****A****C****A****C****A****C****A****C****A****C****A****G**AATAAGGCAGATGTATCATGTAGAGATTGTCTGGAATAATG

121 TTATGGGCTTCACCGTGTATGGCTAGAAAGAAGACTAGAAAGAAGATCAGTTGTTAGGG
 <<<<<<<<<<<<<<<<<<
181 AGCTTAACATCCAAGGATACACCTTACATTGAATGGACAGGT

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
2 LEFT PRIMER	23	19	56.03	52.63	3.00	1.00	
CCCAACAACCTCTACCAGGA							
RIGHT PRIMER	136	20	59.32	45.00	3.00	2.00	
ACGGTGAAGCCCATAACATT							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03GUBC5

Pm_5_F TGGGTAGCAGGTTTCATGGT	(GT)11	245pb
Pm_5_R CGTGTGGTTTCCATCCATCT		

SEQUENCE SIZE: 395

[illegible]

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
2 LEFT PRIMER	79	20	60.38	50.00	4.00	1.00	
TGGGTAGCAGGTTTCATGGT							
RIGHT PRIMER	323	20	60.78	50.00	3.00	0.00	
CGTGTGGTTTCCATCCATCT							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03FSAVS

Pm_6_F TACTCCAACGAAGGCACCTC	(CT)10	207pb
Pm_6_R AGTGAACAGCAGCCAATCAA		

1 TTCAACTATCTGCTGCTGGTGTCCCTATTGTTCTAAGCAATTTTAAAGAAGGAGACA
61 AAAAATAATTCAGAAAAAATAGGTTAACTACAGCTTTTGTCCCTCTGTCACTGAAGCC
121 TCACCTGGCTGATGCCTCAAAGAGCTAAAGCCATGAAATCACCATTCTATCACTGCTTAC
181 TCCAACGAAGGCACCTCTGCTTGCCCTGACTTATTTTAATTTGCACTTGCTAATGAATC
241 CTGATCTGATTGGCCATTGTTCAAGCACTAAACTCCTGTAATGCACTGCTTTTCTGCTT
301 TTTAATGCTCACTTGCTGACCTGAGTGAGTCAAGTCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCA
361 GTCGTTGATTGGCTGCTGTTCACTGTTTCTG

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	178	20	60.25	55.00	4.00	2.00	
TACTCCAACGAAGGCACCTC							
RIGHT PRIMER	384	20	59.45	45.00	3.00	1.00	
AGTGAACAGCAGCCAATCAA							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03GRLVQ**

Pm_7_F TTCTGCTTGGACAATAACTCTG	(TA)₈	387pb
Pm_7_R CTGTCTGTTGTGGTGGATGG		

1 AGGAAGGAGTTACAGGAGCCTGAAAAACACTCAGCCTTAAGAAAAAGCTTCTTCCCCTC

61 CACATCAGAA**TCTCTGCTTGGACAATAACTCTG**TACTTTTTCTCCAGTGCACCTTTACACCA

121 TTTACTTATTTTATCTTATTT**TATATATATATATAATA**AATTTATGGTATATTTTATG

181 TATTGCACCATACTGCTGCCGCAAAACAACAATTTCTCGACAAGTCGGTCGTGGCACTT

241 ACCCTGCAAAACGTTAAGTGCTACACCTGTCCCAGCACCTCCTCTCTTACCACCATTCAA

301 GGCCCCAAACAGTCCTTCCAGGTGAGGCAACACTACTTGTGAGTCTGTTGGAGTCACCTA

361 TTGCATCGGGTGCAGCCTCTTCTACACAGGCGAGACTCGACGCAGGTTGGGGGACTGCTT

421 CGTTGAGCACCTCCGCTCCATCCACCACAACAGACAGGGACTCCTCC

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	71	22	57.19	40.91	4.00	1.00	
TTCTGCTTGGACAATAACTCTG							
RIGHT PRIMER	457	20	60.00	55.00	2.00	0.00	
CTGTCTGTTGTGGTGGATGG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03FOY4I

Pm_8_F CAGTCCATCCACCTGTACCA	(TC)9	173pb
Pm_8_R TGTCCATGCTAACAAGAAAGAG		

[illegible]

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
2 LEFT PRIMER	130	20	59.39	55.00	4.00	2.00	
CAGTCCATCCACCTGTACCA							
RIGHT PRIMER	302	22	57.19	40.91	4.00	0.00	
TGTCCATGCTAACAAGAAAGAG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03GQW6Z

Pm_9_F TGACCTGTTGTTGGTGGTGT	(CT)9	238pb
Pm_9_R GGGAGAGCCAGAGATGAGAG		

[illegible]

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	79	20	59.89	50.00	3.00	0.00	
TGACCTGTTGTTGGTGGTGT							
RIGHT PRIMER	316	20	59.08	60.00	2.00	0.00	
GGGAGAGCCAGAGATGAGAG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03GPS8C

Pm_10_F ATGTGCTCCTTTGGGATCTG	(GT) ⁹	404pb
Pm_10_R CGTGTTGCATGTGAGTTATGTG		

1 GGGATCTGACCCGGATCAGGACATCCCCTTTATTTA**ATGTGCTCCTTTGGGATCTG**ACCC
 61 GGATCAGGACATAACCTGCGGGATACCCAGATTAGAGCCGCCCTCTTTTACACTGCAG
 121 CTTTTCAGCACCTAAGGTGTTGGTGTAACCTGACTACTCCATACAAGAGGAAGTTAATGT
 181 TCCAGCAGCTCAATTATGAACTGCCTAGGATTTAGGACTGATCAGTTACTAAGGCTGAAT
 241 TTCTTACTCACGCTTAACAAAGTCGAGGGTTAGCTGTCATTTGCAATAATGCAAATTACC
 301 ACAAATAAATTGAGGAGTAA**GTGTGTGTGTGTGTGTGT**GCTGAGTGACAGTTAATTGGCGG
 361 CAACATGTATGCAGTCAAATGAAACAATGTTCCCTCTGGACAAGGTGCACAACACAGTACA
 421 CATAACTCACATGCAACACGTAAGTAATATTACC

2 LEFT PRIMER	37	20	60.07	50.00	4.00	1.00
ATGTGCTCCTTTGGGATCTG						
RIGHT PRIMER	440	22	60.10	45.45	4.00	1.00
CGTGTTCATGTGAGTTATGTG						

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03FPMOJ

Pm_11_F CACGCTCCTCATCAGCCTAC	(CA) ⁶ CT(CA) ⁵ CT(CA) ¹¹ TA(CA) ⁴ CT(CA) ⁶ TA(CA) ⁴ CT (CA) ⁴	303pb
Pm_11_R AGTTGTTCCCTCTCCTGCAA		

1 GGGAGGGGAGAGGCTGACATCACAGCCCAGGTTCAATGACTCCCTTCAATGCTCGGAAAAAT
61 GCACCT**CACGCTCCTCATCAGCCTACT**TGTCTTCCCTCCATGCAATACAGCACTCACCAA
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 TTATCAATGCCATCTTGTA ACTCACATTAAAAACTGAGGATGGATAACAACGAATAAATG
181 CAGTCCTACTTCCATACTGGGCTGACAGACATCTAATGAGATTGCTAATGGA**CACACACA**

241 **CACACTCACACACACACTCACACACACACACACACACACATACACACACACTCACACACA**

301 **CACATACACACACACTCACACACA**TCACAACAAAACGCTGGAGGAACCTTGCAGGAGAG
*****<<<<<<<<<<
361 GGAACAACTATAGGAAAAGAATACT
<<<<<<<<<<

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
4 LEFT PRIMER	67	20	60.97	60.00	4.00	0.00	
CACGCTCCTCATCAGCCTAC							
RIGHT PRIMER	369	20	59.84	50.00	4.00	2.00	
AGTTGTTCCCTCTCCTGCAA							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03FPJ9H

Pm_12_F TTGGAATCAACGATGGCTTA	(AC)11	316pb
Pm_12_R AAGGGAGAGGGAGCTGAGAG		

[illegible]

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
4 LEFT PRIMER	27	20	59.11	40.00	4.00	2.00	
TTGGAATCAACGATGGCTTA							
RIGHT PRIMER	342	20	60.09	60.00	4.00	1.00	
AAGGGAGAGGGAGCTGAGAG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03G84QA**

Pm_13_F CCTACAAGCTATGCACATGAGG	(AC)8 AT(AC)6	137pb
Pm_13_R AGCCATCGCATTCTGATAC		

1 ATTTATTCCAAATTTCTCTTATTTTTGTTATACAAAGGTGTTAAATAATTTAAATACAT
61 CCTCCACAGTCACTCTGAAGAATCAGTACATTA**CCTACAAGCTATGCACATGAGG**TAGAA
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 ACAAATAATTTAGGCTCCATTAGACTCTGTGAGAGAAAAACAAG**ACACACACACACACACA**

181 **TACACACACACAC**ATAACCTGGGCATGTTAGTAGTCAGGAATGCGATGGCTACATTCTTTT
********* **<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<**
241 TCTTTTCCACTTTTCAGTTAGATTAATTTGGGAAAGAGCTCCTGCTCTCTTAATCAGATA
301 TTATAAGCACTCTATCTTTTCTGATTAAGTTNTATATCACAACTAACGCTGTAGTACCGA
361 AGAAGTACTGCATTGT CAGGGATCATCATCTGCATATCAGAAAGATTTTCATTGCACTATT
421 TTAAGCAGACTACAGAGCTCTCCAAAAAGCAGTAGAATTG

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	94	22	59.79	50.00	4.00	2.00	
CCTACAAGCTATGCACATGAGG							
RIGHT PRIMER	230	20	60.07	50.00	4.00	0.00	
AGCCATCGCATTTCCTGATAC							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03G4U04**

Pm_14_F TATGTTCCGATGCGTCCAGT	(AT)8	91pb
Pm_14_R AATCCTGTGCCCTTCTGTTC		

1 CCTCAAAGCAGAGAAATGCTAAAGAAATGGTAAGGTATGTTCCGATGCGTCCAGTTGAGG
 61 GGAGGGG**GATATATATATATATAT**GGCAGGTTCTGGGGATTGTTGTAGAACAGAAGGGCAC
 121 AGGATTAACAAGCATGTAAACAAGTCATAAGTTAAAAATAGGTTTCGACAGGACCAAATATAT
 181 GACAACTCAGCATGTTTTCTTAATCTTGCCAGACAAACAATGTTGAAATTATTTGAGG
 241 AAGCTACTAGTGGGATAGATGAAGGGAATGTAGTGGATGATGTATATTTAGGTCGTTTCA

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
3 LEFT PRIMER	36	20	61.47	50.00	4.00	1.00	
TATGTTCCGATGCGTCCAGT							
RIGHT PRIMER	126	20	59.14	50.00	2.00	0.00	
AATCCTGTGCCCTTCTGTTC							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03HB67K**

Pm_15_F GGGAGATGATTGAGCTGAGATT	(AG) ₈	295pb
Pm_15_R CATCCTTTCCATCGCTCTCT		

[illegible]

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	7	22	59.68	45.45	4.00	2.00	
GGGAGATGATTGAGCTGAGATT							
RIGHT PRIMER	301	20	59.39	50.00	2.00	0.00	
CATCCTTTCCATCGCTCTCT							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03FU107**

Pm_16_F AGATTGATAGCTGGGCTCGT	(TG)10	197pb
Pm_16_R GAGCTGAAAGGTGCAAGTCC		

1 AGAAAGCACTTGCTTTTAATCTGAATGGATCTATGTACAATGCTTGTCCCTTATCAATGA
61 CACACTGAAGATATGGTGGGGCAACATACAGAGACTAATGAAGGCCTAGCAGCCTGAGAT
121 AGATTGATAGCTGGGCTCGTAA**TGTGTGTGTGTGTGTGTGTG**CATATATATAGTTTAATT
>>>>>>>>>>>>>>> *****
181 AAGCTTTCTTCTTTGTGCAAATAATTCATTTGAGTCATATGTATAAAATATGTGAATTGCA
241 TATGTCATCATGTTACCAAGTGATATGTGCGTGCCACACATCAAGTAAACAAACTTAGGA <<<
301 CTTCACCTTTTCAGCTCTCATGTTTTCTTTGTAGTTACAAAACATAACAGCACAAACGCTT <<<<<<<<<<<<<<<<<
361 TATAGTACTGGCAACCTGGGTTCACCTCCCACCGCTGGCTGTGAGGAGTTTACATGTTCT
421 TCCAGTGACCACATGGGTTTCTCCGGGTGCTCAA

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	121	20	58.91	50.00	4.00	0.00	
AGATTGATAGCTGGGCTCGT							
RIGHT PRIMER	317	20	60.00	55.00	4.00	0.00	
GAGCTGAAAGGTGCAAGTCC							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03HJAPR**

Pm_17_F AGAGGTGAGTGAGCGTGTTT	(TG) ⁹	374pb
Pm_17_R GCTTCCGAGATCAGACGAGA		

1 CAGTTT**AGAGGTGAGTGAGCGTGTTTT**TGTGCGCGCGCGCGCGCT**TGTGTGTGTGTGTG**
 >>>>>>>>>>>>>>>> *****
61 **TGTG**AGTGAGTGAGTGTGCGTGTGAGGCAAGAGCGGTGATTGTGAGTGAGGCATGGT

121 GAGCGGCAAGCAGTGTAGTGC GG TGAAGCAGCGCATGGTGAGGAGGGCAGGTGAGAGGGG

181 AGTGAATGGTAGGGTGTGAGTGAAGGGCTGGAAGCGCAAAGTTGGAGGCGAAGGCAGAG

241 GAGTGGAGAAAAGAGGGTAAGAAGAGCGTGC GG CAAGTTGCGAGTGC GG GCGTGCGTCT

301 GAAGTGGTGC GAGGAGCAGTGTGCTGCTGCCTACGCCATACTAGCCTGAAAACGCCCGA

361 TCTCGTCTGATCTCGGAAGCTAAGCAGGCTCAGGCCTGGTTAGTACTTGA
 <<<<<<<<<<<<<<<<<

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
1 LEFT PRIMER	7	20	57.51	50.00	2.00	0.00	
AGAGGTGAGTGAGCGTGTTT							
RIGHT PRIMER	380	20	60.64	55.00	4.00	0.00	
GCTTCCGAGATCAGACGAGA							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03G62TE

Pm_26_F TATGAAGGGCTTTGGTCCTG	(GAA)5	417
Pm_26_R GTGCTTGGGAAGATGATGGT		

1 TGAGAAGTTTGAATTGGTACATGGATAGAAGGGA**TATGAAGGGCTTTGGTCCTG**GTGCAA
 61 TTAATTGGGAACAGGCATTTTAAATTCTCTCAGCATGGATTCTTGGGCAGAAGGAGCTGC
 121 TTCTGTGCTGCTATGACCATCACTTCTAATGCCTCCACGATCTCTTCAGCTATATCTTTC
 181 AGAAGAAGAAGAAGAAATAGCCCTTAACTTGACAGTGTAGTCATTGGGGCACCATCTTTTT
 241 GATGGTGTCTTCTGTAGCAAGCTATTCTTGTTTTTACGAGGCCAAGTTGCTAGCTCAGCGC
 301 TCAACCTTGACCTGGGTTTTGAACTCATGAACCTCCGCTCCAGAGTCCAGCGCTGATCTT
 361 ATTGCGCCACCCAGTGGGACATATCTTTTCAGAACCGTGGTGTATTATCATCTGGTCTAG
 421 GTGACCGATCTACCATCATCTTCCCAAGCACCTGCTCTTT

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	35	20	60.07	50.00	4.00	1.00	
TATGAAGGGCTTTGGTCCTG							
RIGHT PRIMER	451	20	59.93	50.00	3.00	1.00	
GTGCTTGGAAGATGATGGT							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03GYJWO

Pm_27_F CCAGGGTTCTAAGGAAATGG	(GGAG) ⁵	384
Pm_27_R TGGGCTGAATGCCTACTTCT		

[illegible]

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
4 LEFT PRIMER	3	20	58.50	50.00	3.00	1.00	
CCAGGGTTCTAAGGAAATGG							
RIGHT PRIMER	386	20	59.84	50.00	3.00	0.00	
TGGGCTGAATGCCTACTTCT							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03HKGJ3

Pm_28_F GTCAGAGGAAGTGGCAGAGG	(GATA)6	130
Pm_28_R GCTCAGTTCAATCGCAGACA		

1 GGGACATTTTAAAAGATTTCATAGATAGGCAAGACATGGATGTGGTAGAAATGGAGGTTTTAT
61 GAGCTGTTAGGAGGGAAATACTAGATTAACTCTGGAAGAGGTTTATATAGATCAGCAGAA
121 CACCATGGTCTGAAGGCCTGTACTGTGCTTTTTCCCAGGTTGGGGAGTCCAGAACAAGA
181 AAGCTCTAGTTTAAGGTGAGAAAAGCTGTAAGGTAAGCTTTAAGGTAAGGTGAGGAGAGC
241 TGTAAAGGGGGATCCGAAGGGTAAGTTTTCATACAGAGTG TGATATTTATGGAGAGCAAAC
301 **TGTCAGAGGAAGTGGCAGAGG**CAGGTGCAATTACGACAGACATTTAGAAAGGTACACAG**A**
>>>>>>>>>>>>>> **
361 **TAGATAGATAGATAGATAGATA**ACTCAACCATCAGGGGCAGATACTTTAAGTGTCTCGCA
*****<<<<<<<<
421 TTGAAGCTGAGCTGAATCTCCACAGGATAACTCTATATGCAC<<<<<<<<

OLIGO	start	len	tm	gc%	any	3'	seq
LEFT PRIMER	302	20	59.99	60.00	3.00	0.00	
GTCAGAGGAAGTGCGAGAGG							
RIGHT PRIMER	431	20	60.14	50.00	3.00	0.00	
GCTCAGTTCAATCGCAGACA							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03F02MA

Pm_29_F TTTCCCACCGGAGATGAATA	(TATC)⁹	347
Pm_29_R GCAGCAGGTTGGGTTTATGT		

1 TTTAATCGAATTATTTAAGTTGTCTTTTTTATACAGAATTGTTATTTAACTGATATCTGT
61 GATTCTTGTTTATTTAATTGAATGGGACGCTGAAATTGCTGAA**TTTCCCACCGGAGATGA**
>>>>>>>>>>>>>>>>
121 **ATAAAGTATCTATCTATCTATCTATCCATCTATCTATCTATCTACTATCTATTGAA**
>>> *****
181 TTTAGCAAATGCAATATTACTATAAAATCACATTGTAAAATGTAGACTTTCTATTTTCTC
241 TTCGCGTACACACATGCTATCTATACAAAGGACTCCAATCGTAACACGTTTCTGCCA
301 TTA ACTATAGTTTGAACATCTTCCCGTACAATGTAATTATGAATTTCACACCATTCTCA
361 GTTCTTCTCTGAATTTTCGCTGTGTTAATCCATAGATACATGTGTTTGTTACACGAACTG
421 AGCATTTGCAACATAAACCCAACTGCTGCGTGATGTACGCTGGGTTGCTCAAG
<<<<<<<<<<<<<<<<

OLIGO	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
LEFT PRIMER	104	20	60.27	45.00	4.00	2.00	
TTTCCACCGGAGATGAATA							
RIGHT PRIMER	450	20	60.00	50.00	3.00	0.00	
GCAGCAGGTTGGGTTTATGT							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03F0Z1J

Pm_30_F TGGACAGGAAAGGAGTGGAG	(TAGA)⁷	149
Pm_30_R CAATCACAGCACGGAAACAG		

1 ACTCAGAGAGTGATAGCTGTGTGGAATGAACACTCCTGTAGAAGTAGTAGAGGCCAGTTCA
61 GTTGTGTCATTTAAGGTAAAATTGGATAGGTATA**TGGACAGGAAAGGAGTGGAG**GTTAT
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
121 GGGCTGAGTGCGGGTAGGTGGGAC**TAGATAGATAGATAGATAGATAGATA**TACTTTAG

181 GTGAGATTAAAGGTTCCGCACGGACTAGGAGGGCCGAGAAGGCCTGTTTTCCGTGCTGTGA
241 TTGATATATTATTTGGTTATATGGTTTTGTTTCTGCCGTAATAACCCTGATGAATTGACT
301 ATAGAAGTATTTTAAATTTGCTGCGTAGAAGGAGCATGTGTTAACTTACAGGATTATGT
361 TGCTGGATT TTCATCTCCATACCCTGGAGGACTAAAATATATCCTTGACATAGTGGATGC
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
421 TTTCACTGAGTATATAGAGGCTTCCCCAAATAGAAAAACCGCTGACGTT

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seg</u>
2 LEFT PRIMER	95	20	60.23	55.00	2.00	0.00	
TGGACAGGAAAGGAGTGGAG							
RIGHT PRIMER	243	20	60.30	50.00	2.00	1.00	
CAATCACAGCACGGAAACAG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR HEV15UU03GPRW

Pm_18_F TTTGTGGGTGGCAAGGTTAT	(GA) ₈	225pb
Pm_18_R GCAAGTCCCAAGAAGAGTGG		

1 ATAGAGTAGAGTCATGACTGTT**TTTGTGGGTGGCAAGGTTATA**ATATCATGTTGCTGTTGG
 61 AGAAAGTGATGAACAGGG**GAGAGAGAGAGAGAGAA**ACTCTATTTCTATTTGACACAGTTATT
 121 ATTCACTGAACCTCATCAGACCTCTACTAACTGAACAGGTAGTTGTACAGGGAATGGGAG
 181 ACCCATCTTCATGCCTAATGACGGCCACCCCTTCCATTTCTATTCCACTCTTCTTG
 241 GGACTTGCAACTGATGCTCATTATTTCTTATCTTGCTGGAAGAACAGCTATTCGGGAGTC
 301 TTAATTAATTTATTTTATTTATTTAGCACGGGACAGGCACCTTCTGGCCCAAATGAATCAT
 361 GCTGCCCTGCAACCCACCTCTTGCTTAATCACGAGGATAATTTACAGTGACCAACTAACC
 421 TATTAGCTGATACATTC

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seg</u>
3 LEFT PRIMER	24	20	60.23	45.00	3.00	2.00	
TTTGTGGGTGGCAAGGTTAT							
RIGHT PRIMER	248	20	59.84	55.00	3.00	0.00	
GCAAGTCCCAAGAAGAGTGG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03FQZ6D**

Pm_19_F CAAGCACATACAGAAACACG	(AC)14	171pb
Pm_19_R ACAGAGGTTTGC GGATCAGT		

1 CACAAAGAAACATGCACATAAACACACACACACATACATACAATA**CAAGCACATAC**
 61 **AGAAACACG**CGTATATACATACACACACTCAGACACACATACACAGTACTA**ACACACAC**
 121 **ACACACACACACACACACAC**ATAGAGAGACTACAGATGTGTGTTATTCGTTGCTAAACCA
 181 CACAGAGCAAATTGAACAGCAGCTGATCCGCAAACCTCTGTAGTTTGGCAACACGACTTCT
 241 TAAAGTGTTCAATTTCTTAAATATAAATAATAGAAATAATTGTTTTGTATTTTATTTAAAC
 301 TAACTATCAGCGCAGTTAAATTACATAAAATTCCATGTTCTTCAACATATATGAGAATA
 361 CATTTC

			<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>
<u>3'</u>	<u>seq</u>						
1	LEFT PRIMER	50	20	55.33	45.00	2.00	2.00
	CAAGCACATACAGAAACACG						
	RIGHT PRIMER	220	20	59.73	50.00	4.00	2.00
	ACAGAGGTTTGC GGATCAGT						

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03F65J9**

Pm_20_F ATCCTGCTAAGGGGGTCATT	(TA) ⁹	171
Pm_20_R GACACATCCTTTGGCTTTGG		

1 TGATCAATACACATGCATAGACAACAGATCATAA**ATCCTGCTAAGGGGGTCA****T**TGCTCTA
 >>>>>>>>>>>>>>>>>
61 AAAGAAATAGATCCATCCCTAACT**C****TATATATATATATATATA**CTATACATTCTTAATCA

121 TTACACATGATTGACACACAAGAATTGCACAAGTCTGCTGAGAAAAGTCAAGCTGTTGTG

181 GATGCCCAAAGCCAAAGGATGTGTCTAGTTGTTTTCTTTTAGGAACCTGGCTACTGTC

241 TCCACCCTTTAACTCATTTCTGCAAATCAGGAAGAACTGGAATTGGACTATGCAGCATGA
 <<<<<<<<<<<<<<<<<
301 GCTGGCTTTCAAAGAGGTAAAGGAAATAGTGATATCAGCACTATACTGACACAATACAAT

361 CCACATCATCCATTGA

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
4 LEFT PRIMER	35	20	59.79	50.00	3.00	1.00	
ATCCTGCTAAGGGGGTCATT							
RIGHT PRIMER	205	20	60.50	50.00	3.00	1.00	
GACACATCCTTTGGCTTTGG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03FVIQJ**

Pm_21_F TTGTCATAAGGGTGCTCCAA	(AC)9	119
Pm_21_R TGCAGTTGTTTGGGACTCTG		

1 GCCAGGTTTCAGATGCCCAAGATACGGCGTATGAATAGGAATCACAAAAAGATCGGTGC
61 AAAAAAGC**TTGTCTATAAGGGTGCTCCAA**TGACTCCACCAGGAGTTAAGG**ACACACACACAC**
>>>>>>>>>>>>>>>>*****
121 **ACACACT**TAATTAAGTCATTTAAAAC**TGGT**TATCCAAAAGATGGGT**TTCAGAGT**CCCCAAC**A**
*****<<<<<<<<<<<<<<<<
181 ACTGCAAATACTGGAATT**TGTAAAGG**GAAAAACAATGTAGCTGGAGAAGTCAGGGTGT
<<<<<<<
241 TAAGCAACATCCGTGAAGGTAACAGAACGGCTGATATTTGTGCTGAGGCCCTCATCAGGA
301 CTAAAAGTGCAGAGGG

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seg</u>
2 LEFT PRIMER	68	20	59.12	45.00	4.00	0.00	
TTGTCATAAGGGTGCTCCAA							
RIGHT PRIMER	186	20	59.87	50.00	4.00	1.00	
TGCAGTTGTTTGGGACTCTG							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03G605V**

Pm_22_F TGCTCCAGAACATAAACCTCA	(TCA)5	217
Pm_22_R GGGTAAAGGAAAACCCCAAG		

1 TTAATATCAACA**TGCTCCAGAACATAAACCTCA**CTCATATTG**TCATCATCATCATCA**AGT
 >>>>>>>>>>>>>>>>>>>> *****
61 TCCCTCTCATTTGGTGAATACCAAACAGAAGTATTTCATTGAGGACCTAACTCACTTCCACA
121 GCCTCCAGGGACCTCTTCCCACCTTTTATCTCTAATCGGTCTTACCTTCACTCCTGACATC
181 CCTTTATTCTTTCACATAACTGAAGAATGCCTTGCGGTTTTTCCTTTACCCTACTCTCCTGG
241 ACCTTCTCATGCCCTTTCTGTCTTCTCTCAGCGCCTTCTTAAGCTCCTTTCTTGCTACC
301 TATATTCCTCAAAGACCCATCTGATCCTTGCTTCCTAAACCTCACGTATGCTGCCTTCT
 <<<<<<<<<<<<<<
361 TCCATCTGACTAG
 <<<<<

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
3 LEFT PRIMER	13	21	58.37	42.86	4.00	1.00	
TGCTCCAGAACATAAACCTCA							
RIGHT PRIMER	229	20	59.68	50.00	4.00	0.00	
GGGTAAAGGAAAACCCCAAG							

Pm_23_F CCTTGCCCCATCATTTGTATT	(TAT)5	144
Pm_23_R CAACAGGGCAGAAGACAACA		

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
3 LEFT PRIMER	142	20	59.65	45.00	3.00	1.00	
CCTTGCCCCATCATTGTATT							
RIGHT PRIMER	285	20	59.87	50.00	2.00	0.00	
CAACAGGGCAGAAGACAACA							

Pm_24_F GCCCGATAAAAGTCCAGTGA	(TTA)1 T(TTA)5	335
Pm_24_R GCAGCTACGTCAAAAACACAC		

	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seq</u>
1 LEFT PRIMER	185	20	60.07	50.00	3.00	1.00	
GCCCGATAAAAGTCCAGTGA							
RIGHT PRIMER	519	21	58.50	47.62	4.00	0.00	
GCAGCTACGTCAAAAACACAC							

PRIMER PICKING RESULTS FOR **HEV15UU03FPX1Z**

Pm_25_F CCGAAAGTGATGGAGGACAT	(AAC)5	183
Pm_25_R CCTGGTCTTCGTTTGGTTTG		

1 AAATTAGCATGATTATCCATGTATGGAG**CCGAAAGTGATGGAGGACAT**CTTATCTGTATT
>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>>
61 TACTCAGGAGATAGACACACAGTCAGTAGACCTGTTCAATGGAGGTCAGAGAGAAAGCCA

121 GAAGATCTATGGATAGAAGTAATGGGCATTATAGGACAGCTGGG**AACAACAACAACAACA**

181 GCAA AACATTGCAAACCAAACGAAGACCAGGAAAGTAAAATGGCTTTCTGCAGAAAGCTCT
<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<<
241 ATAAGTAGCTGAGCAGCGAAGAGATGTGAAGCTCAATGTAGATT CGAACAAATTACTCCA

301 ATTGAACATAATGTTGAAGAGGATAGCAATGAACTAAAAGCAAATTACTTGAACGGAGCG

361 ATGCCAAGAAGCT

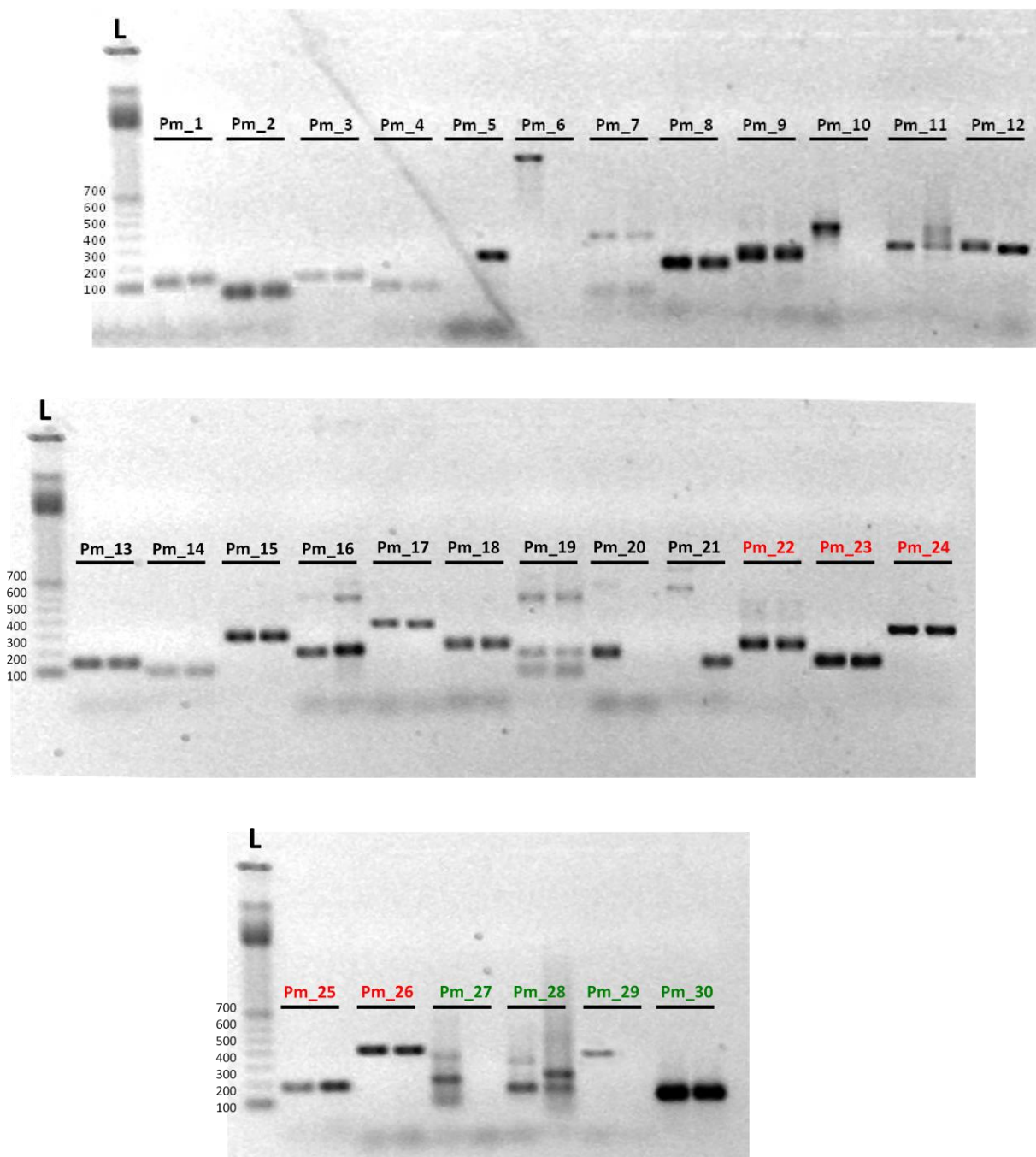
	<u>start</u>	<u>len</u>	<u>tm</u>	<u>gc%</u>	<u>any</u>	<u>3'</u>	<u>seg</u>
4 LEFT PRIMER	29	20	59.93	50.00	3.00	2.00	
CCGAAAGTGATGGAGGACAT							
RIGHT PRIMER	211	20	60.52	50.00	3.00	0.00	
CCTGGTCTTCGTTTGGTTTG							

Anexo 3. Motivos microssatélites identificados na espécie de raia *P.motoro*, sequências dos *primers*, valores de Tm (°C), tamanho dos fragmentos amplificados e classificação do tipo de repetição do microssatélite.

<i>Primer</i>	Motivo microssatélite	Sequência	Tm (°C)	Tam. frag. (pb)	Classificação
Pm_1F	(CT)8	ATGCTGACTTTGTCCGATGA	59,25	185	Perfeito
Pm_1R		GATTGGAGGCTGGCTAATGT	59,10		
Pm_2F	(AG)8	GCTGTCAGGTAGACTGGAGTTG	59,00	104	Perfeito
Pm_2R		TCTCAACGGAATCGAAGTCA	59,10		
Pm_3F	(GT)8	GGTGTGTAGGTGTTTCTGTGTT	56,60	290	Perfeito
Pm_3R		GCTTCTCAAGTGGTGCATGA	59,00		
Pm_4F	(CA)9	CCCAACAACCTCTACCAGGA	56,00	114	Perfeito
Pm_4R		ACGGTGAAGCCCATAACATT	59,00		
Pm_5F	(GT)11	TGGGTAGCAGGTTTCATGGT	60,00	245	Perfeito
Pm_5R		CGTGTGGTTTCCATCCATCT	60,50		
Pm_6F	(CT)10	TACTCCAACGAAGGCACCTC	60,20	207	Perfeito
Pm_6R		AGTGAACAGCAGCCAATCAA	59,45		
Pm_7F	(TA)8	TTCTGCTTGGACAATAACTCTG	57,19	387	Perfeito
Pm_7R		CTGTCTGTTGTGGTGGATGG	60,00		
Pm_8F	(TC)9	CAGTCCATCCACCTGTACCA	59,30	173	perfeito
Pm_8R		TGTCCATGCTAACAAGAAAGAG	57,20		
Pm_9F	(CT)9	TGACCTGTTGTTGGTGGTGT	59,82	238	Perfeito
Pm_9R		GGGAGAGCCAGAGATGAGAG	59,10		
Pm_10F	(GT)9	ATGTGCTCCTTTGGGATCTG	60,00	404	Perfeito
Pm_10R		CGTGTTGCATGTGAGTTATGTG	60,10		
Pm_11F	(CA)11	CACGCTCCTCATCAGCCTAC	60,97	303	perfeito
Pm_11R		AGTTGTTCCCTCTCCTGCAA	59,80		
Pm_12F	(AC)11	TTGGAATCAACGATGGCTTA	59,11	316	Perfeito
Pm_12R		AAGGGAGAGGGAGCTGAGAG	60,10		
Pm_13F	(AC)8	CCTACAAGCTATGCACATGAGG	59,70	137	Perfeito
Pm_13R		AGCCATCGCATTCTGATAC	60,09		
Pm_14F	(AT)8	TATGTTCCGATGCGTCCAGT	61,45	91	Perfeito
Pm_14R		AATCCTGTGCCCTTCTGTTC	59,12		
Pm_15F	(AG)8	GGGAGATGATTGAGCTGAGATT	59,68	295	Perfeito
Pm_15R		CATCCTTTCCATCGCTCTCT	59,39		
Pm_16F	(TG)10	AGATTGATAGCTGGGCTCGT	58,90	197	perfeito
Pm_16R		GAGCTGAAAGGTGCAAGTCC	60,00		
Pm_17F	(TG)9	AGAGGTGAGTGAGCGTGTTC	57,51	374	Perfeito
Pm_17R		GCTTCCGAGATCAGACGAGA	60,64		

Pm_18F	(GA)8	TTTGTGGGTGGCAAGGTTAT	60,23	225	Perfeito
Pm_18R		GCAAGTCCCAAGAAGAGTGG	59,84		
Pm_19F	(AC)14	CAAGCACATACAGAAACACG	55,33	171	Perfeito
Pm_19R		ACAGAGGTTTGC GGATCAGT	59,70		
Pm_20F	(TA)9	ATCCTGCTAAGGGGGTCATT	59,79	171	Perfeito
Pm_20R		GACACATCCTTTGGCTTTGG	60,50		
Pm_21F	(AC)9	TTGTCATAAGGGTGCTCCAA	59,12	119	Perfeito
Pm_21R		TGCAGTTGTTTGGGACTCTG	59,87		
Pm_22F	(TCA)5	TGCTCCAGAACATAAACCTCA	58,37	217	Perfeito
Pm_22R		GGGTAAAGGAAAACCCCAAG	59,60		
Pm_23F	(TAT)5	CCTTGCCCCATCATTGTATT	59,60	144	Perfeito
Pm_23R		CAACAGGGCAGAAGACAACA	59,87		
Pm_24F	(TTA)5	GCCCGATAAAAGTCCAGTGA	60,08	335	Perfeito
Pm_24R		GCAGCTACGTCAAAAACACAC	58,50		
Pm_25F	(AAC)5	CCGAAAGTGATGGAGGACAT	59,90	183	Perfeito
Pm_25R		CCTGGTCTTCGTTTGGTTTG	60,50		
Pm_26F	(GAA)5	TATGAAGGGCTTTGGTCCTG	60,10	417	Perfeito
Pm_26R		GTGCTTGGAAGATGATGGT	59,90		
Pm_27F	(GGAG)5	CCAGGGTTCTAAGGAAATGG	58,50	384	Perfeito
Pm_27R		TGGGCTGAATGCCTACTTCT	59,80		
Pm_28F	(GATA)6	GTCAGAGGAAGTGGCAGAGG	59,90	130	Perfeito
Pm_28R		GCTCAGTTCAATCGCAGACA	60,14		
Pm_29F	(TATC)9	TTTCCACCGGAGATGAATA	60,27	347	Perfeito
Pm_29R		GCAGCAGGTTGGGTTTATGT	60,00		
Pm_30F	(TAGA)7	TGGACAGGAAAGGAGTGGAG	60,23	149	Perfeito
Pm_30R		CAATCACAGCACGGAAACAG	60,30		

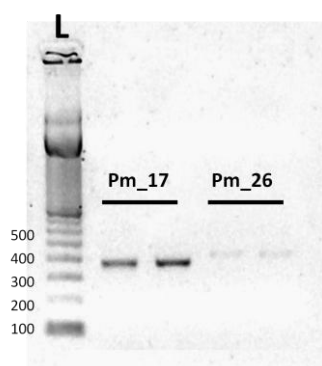
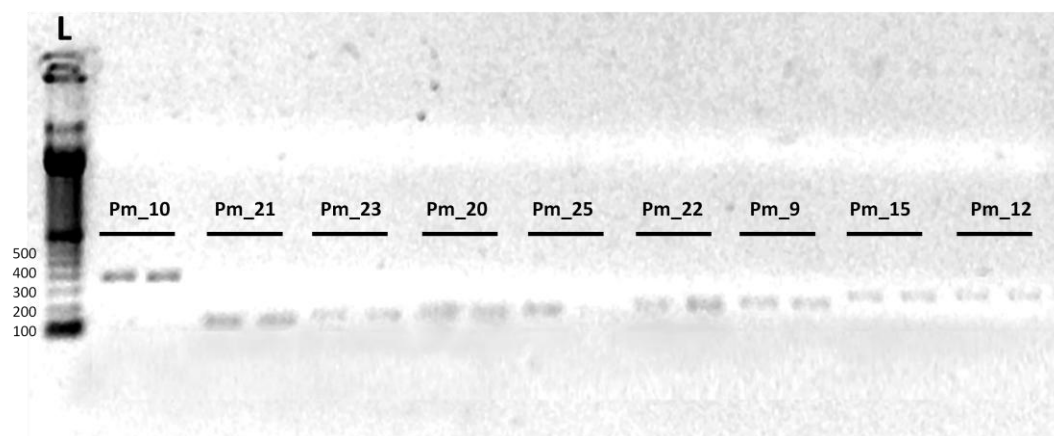
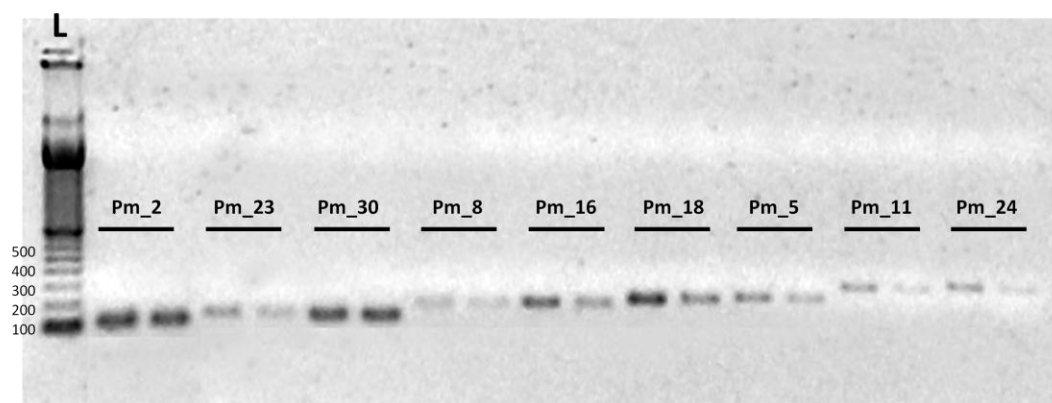
Anexo 4 - Gel de agarose a 1%, mostrando as amplificações dos microssatélites da espécie de raia *P. motoro*. L - Ladder 1kb plus.



Anexo 5. Temperatura de amplificação padronizada para os 20 pares de *primers* de microssatélites da espécie de raia *P.motoro* analisados. Distribuição dos fluorocromos para cada tamanho de *primer*.

<i>Primer</i>	Temperatura de amplificação(°C)	Tamanho (pb)	Fluorocromo
Pm_2	57 (°C)	104	FAM
Pm_5	57 (°C)	245	FAM
Pm_8	57 (°C)	173	NED
Pm_9	57 (°C)	238	PET
Pm_10	57 (°C)	404	NED
Pm_11	57 (°C)	303	NED
Pm_12	57 (°C)	316	PET
Pm_13	57 (°C)	137	NED
Pm_15	57 (°C)	295	VIC
Pm_16	57 (°C)	197	FAM
Pm_17	57 (°C)	374	VIC
Pm_18	57 (°C)	225	NED
Pm_20	57 (°C)	171	VIC
Pm_21	57 (°C)	119	VIC
Pm_22	57 (°C)	217	VIC
Pm_23	57 (°C)	144	PET
Pm_24	57 (°C)	335	FAM
Pm_25	57 (°C)	183	PET
Pm_26	57 (°C)	417	PET
Pm_30	57 (°C)	149	FAM

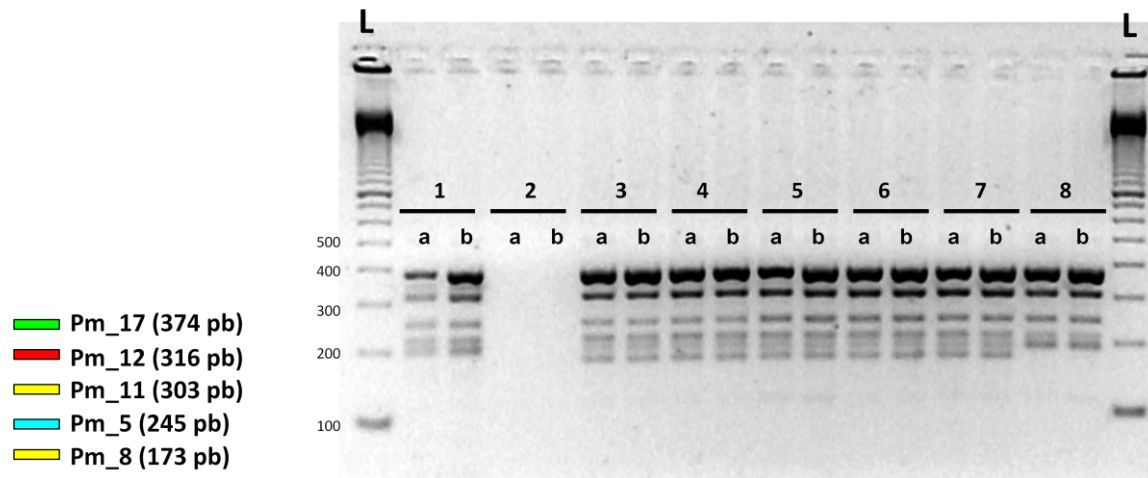
Anexo 6 - Gel de agarose a 1%, mostrando as amplificações dos microssatélites da espécie de raia *P.motoro* com *primers* marcados, com dois indivíduos da espécie de *P. motoro*. L - Ladder 1kb plus.



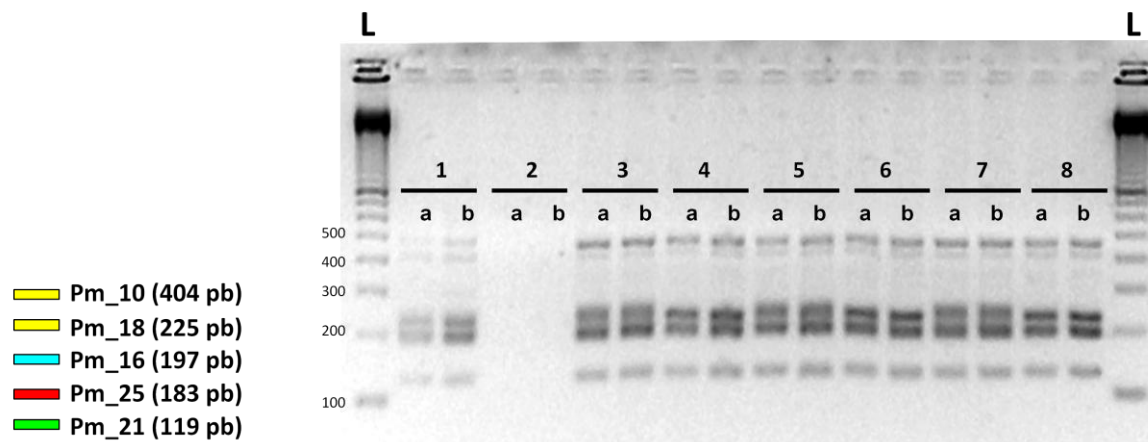
Anexo 7. Identificação dos conjuntos de *primers* de microssatélites da espécie de raia *P.motoro* nos quais foram detectados polimorfismos.

Primer	Motivo	Análise de Polimorfismo
Pm_5	(GT)11	Polimórfico
Pm_8	(TC)9	Polimórfico
Pm_9	(CT)9	Monomórfico
Pm_10	(GT)9	Polimórfico
Pm_11	(CA)11	Polimórfico
Pm_12	(AC)11	Polimórfico
Pm_13	(AC)8	Monomórfico
Pm_15	(AG)8	Monomórfico
Pm_16	(TG)10	Polimórfico
Pm_17	(TG)9	Polimórfico
Pm_18	(GA)8	Polimórfico
Pm_20	(TA)9	Monomórfico
Pm_21	(AC)9	Polimórfico
Pm_22	(TCA)5	Monomórfico
Pm_23	(TAT)5	Monomórfico
Pm_24	(TTA)5	Monomórfico
Pm_25	(AAC)5	Polimórfico
Pm_26	(GAA)5	Monomórfico
Pm_30	(TAGA)7	Monomórfico

Anexo 8 - Gel de agarose a 2%, mostrando as amplificações dos microssatélites da espécie de raia *P.motoro* (PCR-multiplex).

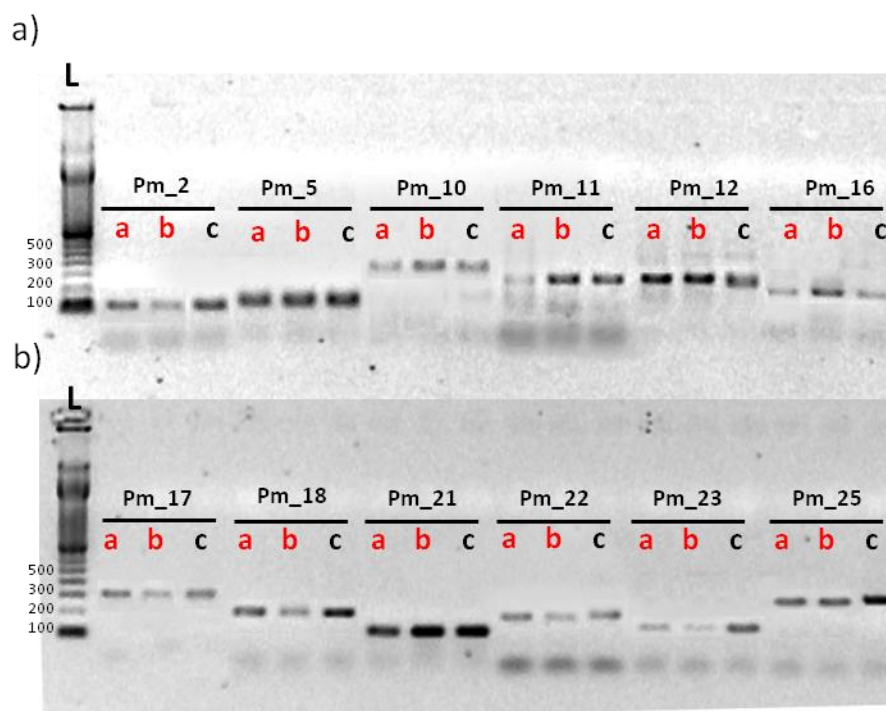


Multiplex I (Pm_5, Pm_8, Pm_11, Pm_12, Pm_17), da espécie *P. motoro*. Indivíduos 1 – 8. Testes com a molaridade de cada *primer*, a- 1,5 mM, b- 2,0 mM. L - Ladder 1kb plus



Multiplex II (Pm_10, Pm_16, Pm_18, Pm_21, Pm_25), da espécie *P. motoro*. Indivíduos 1 – 8. Testes com a molaridade de cada *primer*, a- 1,5 mM, b- 2,0 mM. L - Ladder 1kb plus.

Anexo 9. Gel de agarose a 1%, mostrando as amplificações dos *loci* com *primers* não marcados. Indivíduos das espécies de raia *P. falkneri* (a- b), *P. motoro* (c). L - Ladder 1kb plus.



Anexo 10 – Caracterização dos locos microssatélites polimórficos quanto ao número de alelos detectados para as espécies de raia *P.motoro* e *P. falkneri* e alelos compartilhados entre as espécies.

SSR	Alelos identificados para <i>P.motoro</i>	Alelos identificados para <i>P. falkneri</i>	Alelos compartilhados
Pm_5	2 alelos	7 alelos	1 alelo
Pm_8	3 alelos	4 alelos	-
Pm_10	1 alelo	3 alelos	-
Pm_11	2 alelos	5 alelos	-
Pm_12	2 alelos	9 alelos	-
Pm_16	2 alelos	2 alelos	2 alelos
Pm_17	2 alelos	-	-
Pm_18	5 alelos	-	-
Pm_21	2 alelos	1 alelo	1 alelo
Pm_25	2 alelos	1 alelo	1 alelo

Anexo 11. Alelos privados identificados em cada *loci* na espécie de raia *Potamotrygon motoro*. Pop1 – referente a população de Foz do Iguaçu. Pop3 – referente a população de Ilha Solteira.

Pop	Loci	Allele	Freq
Pop1	Pm_8	196	0,068
Pop1	Pm_11	297	0,014
Pop1	Pm_18	220	0,054
Pop1	Pm_18	230	0,027
Pop1	Pm_18	234	0,027
Pop1	Pm_18	323	0,014
Pop1	Pm_21	117	0,039
Pop1	Pm_25	187	0,039
Pop3	Pm_16	244	0,143
Pop3	Pm_16	246	0,071
Pop3	Pm_18	190	0,033
Pop3	Pm_18	192	0,067
Pop3	Pm_18	198	0,067

Anexo 12. Alelos privados identificados em cada *loci* na espécie de raia *Potamotrygon falkneri*. Pop1 – referente a população de Porto Carmargo, Pop2 – referente a população de Porto Rico, Pop3 – referente a população de Ilha Solteira.

Pop	Loci	Alelo	Freq
Pop1	Pm_10	411	0,071
Pop1	Pm_16	197	0,500
Pop1	Pm_11	332	0,045
Pop1	Pm_11	338	0,159
Pop1	Pm_12	334	0,205
Pop1	Pm_12	340	0,250
Pop1	Pm_12	344	0,295
Pop1	Pm_12	347	0,045
Pop1	Pm_12	348	0,045
Pop1	Pm_5	253	0,089
Pop2	Pm_10	404	0,045
Pop2	Pm_5	248	0,156
Pop3	Pm_16	196	0,093
Pop3	Pm_16	202	0,037