

SERGIO BIATO STOIEV

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Atherinella brasiliensis* (QUOY & GAIMARD,
1825) (ATHERINIFORMES: ATHERINOPSIDAE) AO LONGO DA COSTA
BRASILEIRA**

PONTAL DO PARANÁ

2010

SERGIO BIATO STOIEV

**VARIABILIDADE GENÉTICA DE *Atherinella brasiliensis* (QUOY & GAIMARD,
1825) (ATHERINIFORMES: ATHERINOPSIDAE) AO LONGO DA COSTA
BRASILEIRA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos – Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, área de concentração Oceanografia Biológica.

Orientador: Dr. Henry Louis Spach
Co-orientador: Dr. Walter A. Boeger

PONTAL DO PARANÁ

2010

S871 Stoiev, Sergio Biato., 1985-
Variabilidade genética de *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1825) (Atheriniformes: Atherinopsidae) ao longo da costa brasileira / Sergio Biato Stoiev - Pontal do Paraná, 2010.
44f.: il. (algumas color.); 29 cm.

Orientador: Prof. Dr. Henry Louis Spach.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Sistemas Costeiros e Oceânicos, Centro de Estudos do Mar, Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná.

1. Oceanografia biológica. 2. Ictiologia. 3. Peixe-rei.
4. Genética de populações. I. Título. II. Henry Louis Spach.
III. Universidade Federal do Paraná.

CDD 597.53



**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS
COSTEIROS E OCEÂNICOS**

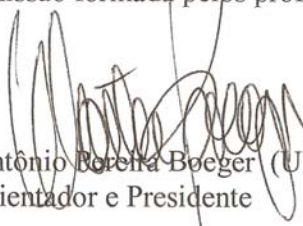
Centro de Estudos do Mar - Setor Ciências da Terra - UFPR
Avn. Beira-mar, s/nº - Pontal do Sul - Pontal do Paraná - Paraná - Brasil
Tel. (41)3455-3620 - Fax (41)3455-3623 - www.cem.ufpr.br/pgsisco - E-mail: pgsisco@ufpr.br

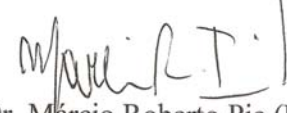
TERMO DE APROVAÇÃO


Sergio Biato Stoiev

***“Variabilidade genética da *Atherinella brasiliensis* Quoy & Gaimard, 1825
(ATHERINIFORMES: ATHERINOPSIDAE) ao longo da costa
brasileira”.***

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Sistemas Costeiros e Oceânicos, da Universidade Federal do
Paraná, pela Comissão formada pelos professores:


Dr. Walter Antônio Borchia Boeger (UFPR)
Coorientador e Presidente


Dr. Márcio Roberto Pie (UFPR)
Membro Examinador


Dr. José Francisco de Oliveira Neto (FAFIPAR)
Membro Examinador

Pontal do Paraná, 23 de março de 2010.



SUMÁRIO

EPÍGRAFE.....	ii
AGRADECIMENTOS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE ANEXOS.....	v
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
INTRODUÇÃO.....	1
MATERIAL E MÉTODOS.....	4
RESULTADOS.....	7
DISCUSSÃO.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	16
TABELAS.....	22
FIGURAS.....	25
ANEXOS.....	29

**“πάντα χωρεῖ καὶ οὐδὲν μένει”
(Tudo flui e nada permanece)
Heráclito**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus orientadores, que me apoiaram e deram o suporte necessário à realização deste trabalho - se pudesse escreveria o nome de ambos em primeiro lugar, porém, tendo de escolher alguma ordem, ficarei com a ordem alfabética (que se repetirá no resto do texto) -, o Dr. Henry Louis Spach e o Dr. Walter Antônio Pereira Boeger.

Aos membros da banca, que aceitaram participar neste trabalho, fazendo inferências e fornecendo dicas importantes, as quais foram incorporadas - na medida do possível - à versão final da dissertação, o Dr. José Francisco de Oliveira Neto e o Dr. Márcio Pie.

Ao distante pessoal que ajudou com a mão-de-obra nas coletas, que nem mesmo tive a oportunidade de conhecer pessoalmente, porém tiveram imensa importância no trabalho: Fábio Magno e Dr. William Severi, do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco – PE; Dra. Gecely Rodrigues A. Rocha e Dra. Erminda C. G. Couto, da Universidade Estadual de Santa Cruz – BA; Dr. Jean-Christophe Joyeux e Luana B. Stocco, do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal do Espírito Santo – ES; Dr. João P. Vieira Sobrinho e Msc. Leonardo E. Moraes, do Laboratório de Ictiologia da Universidade Federal do Rio Grande – RS; e aos demais colaboradores cujos nomes não chegaram ao meu conhecimento, mas que de alguma forma tiveram participação neste trabalho. Aos parceiros do Laboratório de Biologia de Peixes da UFPR – e amigos, por isso o tratamento mais pessoal: Cazu e Ciro, que colaboraram com as coletas na Baía de Babitonga - SC e na Baía de Paranaguá – PR, valeu a força.

Aos amigos e parceiros do Lempe, que forneceram apoio tanto na parte laboratorial, quanto na interpretação dos resultados, além de importantíssimas contribuições na parte ociosa do tempo - entre um café e outro: Baggio, Flávio, Letícia, Lu, Nefer, Marcel, Marlus, Pablo, Polaca, Rachel, Rafa e Sandrica.

Ao meu irmão Fabiano, à Marrie e à prole, que me acolheram em sua casa, com comida, cama e banho quentinho...

Aos amigos da agora “longínqua” Pontal, espero sempre reencontrar-lhes pelos caminhos dos sete mares, em especial agradeço ao: Bot, Cata, Marco, Tiago, Tinho e Waguinho, pelo empréstimo de um teto, de um colchão e/ou sofá, de um banheiro, de um fogão, de uma bicicleta (meio roubada às vezes) e de momentos impagáveis de risadas e diversão... valeu galera...

À minha eterna coisica... Cris, que me apoiou desde o início desta campanha e espero que esteja sempre por perto pra dar uma força.

Aos amigos do Pilarzinho, que serão sempre meus amigos de infância, valeu pelas distrações quando parecia que eu ia perder todos os cabelos que me restam.

À todas as pessoas que de alguma forma atravessaram a minha vida e me “conduziram” até este momento, mas que nesta existência caótica deixaram apenas uma essência de sua passagem, sem nomes, nem imagens, agradeço à vocês por eu ter chegado aqui.

OBRIGADO!!

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VALORES DESCRITIVOS E PARÂMETROS OBTIDOS PELA ANÁLISE DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL DE <i>Atherinella brasiliensis</i>	10
TABELA 2 – RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) APLICADA NAS SEQUENCIAS DA REGIÃO CONTROLE (D-LOOP) DO DNA MITOCÔNDRIAL DE <i>Atherinella brasiliensis</i>	11
TABELA 3 – DISTÂNCIA GENÉTICA (F_{st}) ENTRE AS POPULAÇÕES DE <i>Atherinella brasiliensis</i> PAREADAS.....	11
TABELA 4 – ESTIMATIVA DO TEMPO (EM ANOS), DESDE QUE OCORREU A EXPANSÃO DAS POPULAÇÕES DE <i>A. brasiliensis</i> , PARA CADA TAXA DE MUTAÇÃO CONSIDERADA	13

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – REDE HAPLOTÍPICA OBTIDA POR MÁXIMA PARCIMÔNIA. O DIÂMETRO DAS CIRCUNFERÊNCIAS É RELATIVO AO NÚMERO DE INDIVÍDUOS REPRESENTADO PELO HAPLÓTIPO. NÚMEROS AO LADO DAS BARRAS INDICAM EM QUAL POSIÇÃO DA SEQUÊNCIA QUE OCORREU MUTAÇÃO (* - MUTAÇÕES AMBÍGUAS).....	25
FIGURA 2 – ÁRVORE FILOGENÉTICA NÃO-ENRAIZADA DOS HAPLÓTIPOS DE <i>Atherinella brasiliensis</i> , CONSTRUÍDA A PARTIR DO CONSENSO DE MAIORIA (50% MAJORITY-RULE) COM ANÁLISE BAYESIANA. O COMPRIMENTO DAS RETAS REPRESENTA A DISTÂNCIA GENÉTICA E OS NÚMEROS EM NEGRITO REPRESENTAM AS PROBABILIDADES POSTERIORES DE SUPORTE DO CLADO.....	26
FIGURA 3 – GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DAS DIFERENÇAS PAREADAS OBSERVADAS NA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCÔNDRIAL DAS POPULAÇÕES DE <i>Atherinella brasiliensis</i> DE CADA LOCAL E DAS POPULAÇÕES DA REGIÃO SUL AGRUPADAS (LINHAS CONTÍNUAS E CÍRCULOS INDICAM OS DADOS OBSERVADO, LINHAS PONTILHADAS INDICAM OS DADOS ESPERADOS).....	27

FIGURA 4 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE (A) AS DISTÂNCIAS GENÉTICA E GEOGRÁFICA DAS POPULAÇÕES DE *Atherinella brasiliensis* E (B) AS DISTÂNCIAS GENÉTICA E GEOGRÁFICA SOB TRANSFORMAÇÃO LOGARÍTMICA.....28

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I - ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS DE *Atherinella brasiliensis* UTILIZADAS NAS ANÁLISES

RESUMO

Atherinella brasiliensis é uma espécie de peixe-rei tipicamente estuarina - completando todo seu ciclo de vida nesse ambiente – e possui ampla ocorrência espacial, desde a Venezuela até o Rio Grande do Sul. Devido à dificuldade dessa espécie em se afastar dos estuários, foi pensada a hipótese de que suas populações estejam geneticamente estruturadas. Para testar a hipótese foi feito o sequenciamento da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial de *A. brasiliensis*. Foram analisados no total 118 indivíduos, provenientes de seis estuários, localizados em Pernambuco, Bahia, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. As análises indicaram forte estruturação populacional ($F_{st}=0,89$), suportando a hipótese de trabalho. Apenas entre o PR e SC não houve diferença populacional significativa. As datas de expansão da espécie e de algumas populações individuais foram correlacionadas com períodos de glaciação. Os ciclos glaciais causaram fortes impactos na biota mundial, geralmente reduzindo as populações, que expandiam no seguinte período interglacial. As datas de expansão para as populações dos estados de PE, PR, SC e RS foram semelhantes e batem com as datas do último Máximo Glacial. A população da Bahia apresentou o tempo de expansão mais antigo, provavelmente a região não tenha sido tão afetada pelo último Máximo Glacial. As populações de *A. brasiliensis* parecem estar sofrendo divergência alopátrica. A partir do isolamento geográfico, a história demográfica de cada população pode conduzir à especiação. Períodos de maior pluviosidade podem ter influenciado a saída de alguns indivíduos de *A. brasiliensis* dos estuários natais, promovendo a migração destes e a colonização de estuários próximos.

Palavras-chave: *Atherinella brasiliensis*, DNA mitocondrial, D-loop, genética de populações.

ABSTRACT

The specie of silverside fish *Atherinella brasiliensis*, is typically estuarine, completing whole life cycle at this environment. The specie is widely distributed in South America, from Venezuela to Rio Grande do Sul (Brazil). Due to the estuary dependence, the hypothesis of structured populations of *A. brasiliensis* was considered and tested. For the population comparison, was obtained the sequences of the control region of the mitochondrial DNA (D-loop). In the analyses were used a totally of 118 specimens from six Brazilian estuaries, each one located in one of this county: Pernambuco (PE), Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Paraná (PR), Santa Catarina (SC) and Rio Grande do Sul (RS). The result outpost strongly structured populations ($F_{st}=0,89$), supporting the study hypothesis. Only between PR and SC county, meaningful structure was not observed. The initial expansion dates of specie and populations were correlated with glacial times. The glaciations impacted the world biota, in a general way, with reduction of the populations and in interglacial times mostly of populations expanded again. The analyzed populations of PE, PR, SC and RS, presented similar expansion dates to the Last Glacial Maximum in South America. The population of BA county have the more ancient expansion time and currently present equilibrium, this region was considered refuge of fauna and biota at the glacial times, and probably had not been affected by the Last Glacial Maximum. *A. brasiliensis* populations seemingly undergo allopatric divergence. Since the geographic isolation, the demographic history of each population can conduct to the speciation.

Keywords: *Atherinella brasiliensis*, mitochondrial DNA, D-loop, population genetics.

INTRODUÇÃO

Atherinella brasiliensis (Quoy e Gaimard, 1825) (Atheriniformes: Atherinopsidae) é popularmente conhecida como peixe-rei. Essa espécie ocorre da Venezuela ao Rio Grande do Sul (BRA), sendo encontrada principalmente na foz de rios e regiões de águas salobras (FIGUEIREDO e MENEZES, 1978). É considerada uma espécie tipicamente estuarina (BARBIERI *et al.*, 1991, PESSANHA e ARAÚJO, 2001; ARAÚJO e AZEVEDO, 2001), sendo descrita em vários trabalhos como uma das mais abundantes em áreas rasas de estuários da região sul-sudeste do Brasil, incluindo Lagoa dos Patos-RS (GARCIA *et al.*, 2001), Barra do Saí-SC (VENDEL e CHAVES, 2006), Canto Grande-SC (BARREIROS *et al.*, 2004), Baía de Paranaguá-PR (SANTOS *et al.*, 2002; VENDEL *et al.*, 2003; SPACH *et al.*, 2007), Baía de Sepetiba-RJ (PESSANHA e ARAÚJO, 2003) e Lagoa Rodrigo de Freitas-RJ (ANDREATA *et al.*, 2002).

Os estudos sobre a ecologia e a biologia de *A. brasiliensis* concentram-se principalmente na região sul e sudeste (BEMVENUTTI, 1987; FÁVARO *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2006; BERVIAN e FONTOURA, 2007; FÁVARO *et al.*, 2007). Na porção leste-nordeste da costa do Brasil, apesar da ocorrência e abundância de *A. brasiliensis* em diversos estuários, poucos estudos específicos sobre a biologia da espécie foram realizados, destacando-se o trabalho de FRANÇA (2005), que analisou a abundância, a distribuição e a caracterização de larvas no estuário do Rio Jaguaribe-PE e SANTOS (1999), que analisou a distribuição e recrutamento da espécie na Baía de Todos os Santos-BA.

A reprodução de *A. brasiliensis* mostra-se intimamente ligada com o estuário e boa parte do seu ciclo de vida pode ocorrer neste ambiente (FRANÇA, 2005; NEVES *et al.*, 2006). Durante o período de desova, *A. brasiliensis* desloca-se para o interior das enseadas estuarinas, onde encontram águas calmas, de pouca profundidade e com vegetação abundante (BEMVENUTTI, 1987). Esta vegetação atua potencialmente como substrato de fixação para os ovos das espécies de peixe-rei, os quais podem se aderir por meio de filamentos, característicos do grupo (FÁVARO *et al.*, 2003).

Apesar de não ter maior importância comercial, em várias ocasiões *A. brasiliensis* representa, devido à sua abundância, uma fonte complementar de renda

ou até mesmo uma fonte alimentar de comunidades pesqueiras (HOSTIM-SILVA *et al.*, 1995). Além disso, por sua abrangência na costa brasileira, pode ser considerada chave em estudos e avaliações de impacto ambiental e/ou em ações de planos de manejo e conservação em ambientes estuarinos (FÁVARO *et al.*, 2007).

Devido às características da biologia reprodutiva e à associação da *A. brasiliensis* ao estuário criou-se a hipótese de que as populações de estuários distantes entre si vivem em isolamento geográfico e reprodutivo. Tais condições de isolamento são reconhecidas como precursoras de divergência genética entre populações e de especiação (NEI, 1975). A genética de populações apresenta ferramentas úteis para testar essas hipóteses, ao possibilitar, por meio de investigação da deriva e do fluxo genético, uma percepção da história demográfica das populações, pressões seletivas agindo na variação genética e processos mutacionais que geram diversidade (FREELAND, 2005; CONRAD e HURLES, 2007). A genética de populações pode, ainda, ser considerada como uma ferramenta necessária em programas de conservação da biodiversidade, tendo em vista que a diversidade biológica envolve não somente a riqueza de espécies, mas a variação genética intra-específica (TABERLET, 1998).

Estudos com outras espécies estuarinas de peixe-rei (Atherinidae e Atherinopsidae) mostraram que as populações apresentam elevado grau de estruturação. Na região entre Lagoa Custódia (RS – Brasil) e Puerto Madryn (Argentina), uma análise do mtDNA de *Odontesthes argentinensis* (Valenciennes, 1835) indicou início de especiação entre as populações observadas (BEHEREGARAY e SUNNUCKS, 2001). Em Portugal, um estudo com *Atherina boyeri* Risso, 1810, uma espécie de águas salobra e doce, mostrou estruturação entre dois rios. Entretanto, a espécie marinha *Atherina presbyter* Cuvier, 1829 não apresentou estruturação em uma escala geográfica semelhante (FRANCISCO *et al.*, 2006).

Analisando as populações de *A. brasiliensis*, CORTINHAS (2007) encontrou quatro populações geneticamente distintas na região entre Rio Grande do Sul e Bahia, por meio de análise de marcadores RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*). As populações de áreas geograficamente próximas não apresentaram diferenças significativas.

No presente trabalho, o teste de hipótese de estruturação é baseado no

sequenciamento da região D-Loop do DNA mitocondrial (mtDNA). A utilização do mtDNA como marcador é ampla devido à facilidade de manipulação e isolamento, por seu grande número de cópias por células, taxa de mutação relativamente rápida e sua presumida falta de recombinação, a qual resulta da herança uniparental e geralmente materna (MEYER, 1993; AVISE, 1994; FREELAND, 2005). Uma das desvantagens do mtDNA é que sua herança uniparental pode indicar uma história populacional incorreta quando os padrões de dispersão da espécie varie entre os sexos (FREELAND, 2005). Porém, o conhecimento do comportamento e de padrões de migração da espécie pode reduzir ou anular essa desvantagem, como no caso de *A. brasiliensis*, que é uma espécie estuarina-residente e não realiza grandes migrações verticais.

Entre os genes mitocondriais, a região do D-loop (controle) é a que mais acumula mutações, podendo apresentar taxas de evolução entre duas e cinco vezes maiores que as dos genes que codificam proteínas (MEYER, 1993). Por ser um gene aparentemente não-codificante, ele possibilita analisar as taxas de mutações das populações, com menor influência do processo de seleção natural, que atua sobre as expressões gênicas com melhores condições ao ambiente. Por essas características, as análises realizadas com esse gene apresentam maior sensibilidade à alterações genéticas recentes, sendo muito eficiente em identificar variabilidade genética entre populações de uma espécie (SACCONE, 1994).

As respostas obtidas com a utilização do mtDNA como marcador molecular tem sido diversificada para os organismos marinhos na costa brasileira. Duas espécies de peixe marinho-estuarinas apresentaram respostas diferentes. *Macrodon ancylodon* (Bloch e Schneider, 1801) (pescada-gó) foi encontrada significativa estruturação, que separou a espécie em duas populações (sul-sudeste e norte-nordeste), com indícios de especiação (SANTOS *et al.*, 2003). Já *Centropomus parallelus* Poey, 1860 (robalo-peva) não apresentou estruturação ao longo da costa, indicando alto fluxo genético (PRODOCIMO, 2008). Os caranguejos *Ucides cordatus* (Linnaeus, 1763) e *Cardisoma guanhumi* Latreille, 1825, duas espécies com baixa capacidade migratória dos indivíduos adultos, apresentaram falta de estruturação populacional, mostrando que a migração de suas larvas abrange amplas distâncias (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2007; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2008).

Tendo em vista a importância do conhecimento da diversidade genética

intra-específica, e das particularidades na distribuição populacional das espécies para a formulação de políticas de gerenciamento e programas de conservação, estudos que foquem variabilidade de espécies de ampla abrangência espacial ganham acuidade.

A análise molecular da região controle (D-loop) do mtDNA da *A. brasiliensis* pode fornecer resultados robustos sobre a distribuição da variabilidade genética da espécie, proporcionando melhor entendimento dos seus fluxos genéticos, história de dispersão nos estuários brasileiros e inferências a respeito do seu ciclo de vida e as possíveis influências das condições oceanográficas atuais e históricas sobre a espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Os espécimens de *A. brasiliensis* foram obtidos por meio de arrastos de praia nos estuários do Rio Jaguaribe-PE, Baía de Pontal-BA, Rio Piraquê-açu-ES e Lagoa dos Patos-RS por equipes dos Laboratórios de Ictiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco, de Ecologia de Peixes Marinhos da Universidade Estadual de Santa Cruz-BA, do Departamento de Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal do Espírito Santo e de Ictiologia da Fundação Universidade Federal do Rio Grande, respectivamente, e enviados ao Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva do Grupo Integrado de Aqüicultura e Estudos Ambientais da Universidade Federal do Paraná imersos em álcool PA 92%. As amostras da Baía de Paranaguá-PR e Baía de Babitonga-SC foram coletadas pela equipe do Laboratório de Biologia Marinha da Universidade Federal do Paraná.

Dos indivíduos coletados foram retirados os arcos branquiais e fígado com auxílio de tesouras e pinças. O tecido obtido foi armazenado em solução salina hipersaturada EDTA-DMSO (SEUTIN *et al.*, 1991) e resfriado a -20°C. A extração do DNA foi feita com o kit EZ-DNA (Biosystems, Brasil), de acordo com instruções do fabricante. A concentração e a pureza dos extratos obtidos foi medida no espectrofotômetro NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Para a amplificação da região controle (D-loop) do mtDNA foi empregada a técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para qual se utilizou preparados de 25µL, com 1ul de DNA extraído (concentração inicial à 50ng/µL), 1ul de cada *primer*, H16498 (5'

CAC CTG AAG TAG GAA CCA GAT G 3') (MEYER *et al.*, 1990) e L15774M (5' ACA TGA ATT GGA GGT ATA CCA GT 3') (PRIOLI *et al.*, 2002) (50pmoles) (Invitrogen,EUA), 0,5µL de Taq (5U), 2,5µL de Buffer (10x), 0,4µL de Dntp (2mM), 1,5µL de MgCl (50mM), 0,5µL de BSA e 17,1µL de ddH₂O. A desnaturação inicial do DNA foi feita à 94°C por 4 minutos, seguida por ciclos de desnaturação à 94°C por 45 segundos, ciclos de anelamento entre 50 e 58°C por 45 segundos e ciclos de extensão à 72°C por 1 minuto; esses ciclos foram repetidos 35 vezes; a extensão final foi realizada à 72°C por 5 minutos.

Para avaliar a eficácia do PCR em amplificar o fragmento desejado, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (concentração de 1,5%), corada em banho de brometo de etídio para posterior visualização sob luz ultravioleta, e comparação da migração das bandas das ampliações das amostras com o marcador de peso molecular DNA Ladder 1Kb (Invitrogen, EUA). As amostras de DNA amplificadas com sucesso foram purificados com PEG 8000 (Amresco Inc., EUA) e NaCl. Foram medidas a concentração e a pureza dos produtos obtidos, novamente no espectrofotômetro NanoDrop 3300 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

As reações de sequenciamento foram realizadas em reações contendo 1µL do produto do PCR purificado (20ng/µL), 0,5µL de Big Dye (Applied Biosystems, USA), 1µL de cada *primer* (1,6pmoles), 0,5µL de Buffer (5x) e 7µL de ddH₂O. O produto final foi purificado através da precipitação etanol/isopropanol e processado em seqüenciador automático ABI3130 (Applied Biosystems, USA).

As duas fitas de DNA obtidas para cada amostra foram conciliadas no programa STADEN (BONFIELD *et al.*, 1998). O alinhamento das seqüências resultantes foi realizado no Clustal W (THOMPSON *et al.*, 1994), implementado no BioEdit® (HALL, 1999).

O modelo de substituição nucleotídica que apresenta melhor correspondência com o alinhamento foi definido no *software* jModelTest 0.1.1 (POSADA, 2008). Esse modelo foi utilizado nas análises estatísticas padrões e na Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER *et al.*, 1992).

As análises estatísticas padrões são índices que representam a diversidade nucleotídica, haplotípica e número de sítios polimórficos em cada população e no conjunto de todas as populações. A AMOVA testa a existência de estruturação genética comparando a variabilidade genética (distância genética) dentro das

populações e entre as populações e indica a significância de cada escala na variabilidade genética. O resultado final da AMOVA é dado como **Fst**, o qual pode variar entre 0 e 1. Os valores entre 0 e 0,05 indicam pouca diferenciação; entre 0,05 e 0,25, diferenciação moderada; e acima de 0,25, pronunciado nível de diferenciação genética (FREELAND, 2005).

A história demográfica da população foi inferida pela análise de expansão súbita (*Mismatch distributions*) (SLATKIN e HUDSON, 1991; ROGERS e HARPENDING 1992), implementada no programa Arlequin 3.1. (EXCOFFIER *et al.*, 2005). Esse teste é baseado em um modelo de expansão súbita que assume que uma população de tamanho **N₀** atinja o tamanho **N₁** em um tempo **t** de gerações antes do presente. Estima, por meio do método dos mínimos quadrados (SCHNEIDER e EXCOFFIER, 1999), os parâmetros de mutação antes (θ_0) e depois (θ_1) da expansão súbita e o estimador de tempo para a expansão (τ). Em relação aos padrões de curva dos gráficos do *Mismatch distribution*, quando unimodais indicam expansão populacional e quando multimodais indicam que a população se encontra em equilíbrio (ROGERS e HARPENDING, 1992).

O parâmetro τ obtido foi utilizado no cálculo do número de gerações passadas desde a expansão, por meio da fórmula $t = \tau / 2u$, onde **u** é o número de substituições por geração na região estudada. O valor de **u** foi obtido pela fórmula $u = \mu L$, onde μ é a taxa de mutação por nucleotídeo por geração e **L** é o número de pares de base da sequência analisada. Para o cálculo do tempo passado desde a expansão foram utilizadas duas diferentes taxas de mutação por milhão de anos, a mais conservadora de 3,6% e outra de 18,6% e o número de gerações por ano para *A. brasiliensis* foi uma (BERVIAN e FONTOURA, 2007). Ambas as taxas de mutação foram utilizadas por FRANCISCO *et al.* (2006) para analisar populações de *Atherinas*, por representarem taxas de mutação encontradas em estudos com teleósteos.

Os testes de neutralidade seletiva D de TAJIMA (1989) e Fs de FU (1997) foram empregados para estimar se a população está em equilíbrio ou expansão populacional. Esses testes consideram modelos de seletividade neutra em comparação com os dados. Assim, a hipótese nula dos testes é que não há seleção controlando as mutações e resultados significativos indicam que um evento seletivo ocorreu em um período recente da população. O teste Fs é mais sensível e compara

o polimorfismo em bases nucleotídicas com a diversidade haplotípica, enquanto o teste D o polimorfismo das bases em relação aos sítios polimórficos (TAJIMA, 1989; FU, 1997; MOUSSET *et al.*, 2004). A utilização desses testes com o *Mismatch distribution* pode fornecer informações importantes sobre o passado evolutivo da população analisada.

A rede haplotípica foi construída com o método de máxima parcimônia no programa TCS 1.21 (CLEMENT *et al.*, 2000) e permite uma rápida visualização da distribuição geográfica dos haplótipos observados. Para analisar a correlação entre a distância geográfica (km em linha reta) e a distância genética (Fst) das populações foi realizado o teste de Mantel (disponível no sítio: <http://ibdws.sdsu.edu/>). Foi construída uma árvore filogenética dos haplótipos com análise *bayesiana* (Nucmodel=4x4, Nst=6, nruns=2, nchains=4 nger=1.000.000), realizada no programa Mr. Bayes v.3.1.2 (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001) no Portal Cipres (acessível no sítio: <http://www.phylo.org/>).

RESULTADOS

Foram analisados 118 indivíduos, sendo 20 espécimens de Pernambuco, 20 da Bahia, 20 do Espírito Santo, 20 de Santa Catarina, 18 do Paraná e 20 do Rio Grande do Sul (Tab. 1). O tamanho das seqüências obtidas foi de 462 pares de base. A composição nucleotídica foi T: 29,3%, A: 28,8%, C: 22,4% e G: 19,5%. O número de sítios polimórficos foi 56, sendo 46 sítios de transição e 10 de transversão (ts/tv=4,6:1). Os índices de diversidade haplotípica e nucleotídica foram altos para todo o conjunto de amostras, 0,03 e 0,9 respectivamente (Tab.1). A diversidade haplotípica no estuário do Rio Piraquê-açú-ES (0,521) foi significativamente menor do que nos demais estuários; enquanto que esses não apresentaram diferenças significativas entre si. A diversidade nucleotídica também foi menor na população de Piraquê-açú-ES, (0,003 ± 0,002), porém as diferenças não foram significativas; e a população de Rio Formoso-PE, (0,01 ± 0,006) apresentou o maior valor (Tab. 1).

A média de diferença pareada (PD) foi alta na análise de todo o grupo, 13,5 ± 6,1 (Tab. 1). Entre as populações, foi maior na de Jaguaribe-PE, 4,7 +/- 2,4, e menor na de Piraquê-açú-ES, 1,4 +/- 0,9. Os valores negativos e significativos do teste Fs indicam que a maioria das populações não apresentam neutralidade seletiva, exceto

Pontal-BA (-2,3;p>0,05) e Lagoa dos Patos-RS (-0,5;p>0,05) (Tab. 1). O teste D apresentou resultados semelhantes ao F_s . As disparidades entre os testes ocorreram para a região de Piraquê-açú-PE e para o conjunto de todas as populações, em que o teste D indicou que não ocorreram eventos seletivos recentes.

A população de Pontal-BA apresentou o maior valor de τ (4,35). Esse resultado indica que a população pode ser a mais antiga, quando comparada com as demais populações amostradas, enquanto que a de Piraquê-açú-ES foi a única que apresentou o valor zero (Tab. 1). O τ da Lagoa dos Patos-RS mostra que a população desse estuário é bastante recente, apesar dos testes F_s de F_u e do D de Tajima terem indicado que ela está em situação de equilíbrio, ou seja, sem ter experimentado eventos recentes. O indicador de tamanho populacional antes da expansão (θ_0) foi maior para a população de Jaguaribe-PE (0,4) e a população de Piraquê-açú-ES apresentou novamente valor zero (Tab.1).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) indicou que aproximadamente 89,3% da variação do D-loop nas *A. brasiliensis* é causada por diferenças entre as populações e somente 10,7% é ocasionada por diferenças intra-populacionais (Tab. 2). O F_{st} total foi 0,89, indicando forte estruturação da espécie ao longo da costa. A análise pareada do F_{st} sugere que as principais diferenças ocorrem entre a população de Jaguaribe-PE e as demais populações (entre 0,92 e 0,94) (Tab. 3). A população de Pontal-BA apresentou menor distância genética com as populações da região sul do que a de Piraquê-açú-ES, apesar de estar geograficamente mais distante. Uma estruturação menor, porém significativa, foi encontrada entre a população da Lagoa dos Patos-RS e as populações de Paranaguá-PR (0,11;p<0,01) e de Babitonga-SC (0,15;p<0,01). Entre essas duas últimas localidades não foi encontrada estruturação (0,01;p>0,05). A correção de Bonferroni, aplicada sobre os dados de F_{st} pareado, não alterou a significância observada (Tab. 3).

A rede haplotípica mostra que a população de Pernambuco é a mais afastada, apresentando no mínimo dezenove mutações separando seus haplótipos dos haplótipos da população do Espírito Santo e vinte e cinco até o haplótipo mais próximo da população da Bahia (Fig.1). O resultado demonstra que apesar de maior proximidade geográfica, os peixe-reis de Pernambuco apresentam maior distanciamento genético dos peixes da Bahia do que do Espírito Santo.

Entre os haplótipos do Espírito Santo e da Bahia ocorrem pelo menos cinco

mutações e entre este último e as populações do sul são no mínimo oito mutações (Fig.1). A rede haplotípica confirma a estruturação observada no teste da AMOVA, sendo claramente observado o isolamento das populações de PE, BA e ES e a baixa diferença entre as populações da região sul (Fig.1). A população de Lagoa dos Patos apresentou apenas cinco haplótipos (H34, H44, H45, H46 e H47), sendo o H34 compartilhado com indivíduos de Babitonga e Paranaguá, o H45 compartilhado entre cinco indivíduos da Lagoa e dois da Babitonga e os outros três haplótipos exclusivos da população da Lagoa. Essa homogeneidade de haplótipos na Lagoa dos Patos pode ser responsável pela separação, observada no teste Fs, dessa população das populações de PR e SC.

O haplótipo mais abundante foi o H34, encontrado em 22 indivíduos, sendo 10 da Babitonga, 7 de Paranaguá e 5 da Lagoa do Patos (Fig.1). Os demais haplótipos do PR e de SC foram raros, indicando que os indivíduos dessas áreas estão em expansão populacional. O segundo maior haplótipo (H20) foi encontrado na população de Piraquê-açú, compartilhado entre 14 indivíduos.

Ao observar as redes haplotípicas de cada estuário, nota-se uma característica de expansão recente – rede em formato de estrela – nas populações de Jaguaribe e nas do sul (Fig. 1). As populações que não apresentam essa característica são a da BA, que possui dois haplótipos mais frequentes compartilhados por seis indivíduos cada e outros haplótipos com menor frequência, que parecem ter mais de uma mutação de diferença em relação aos de maior frequência (Fig.1).

A árvore filogenética dos haplótipos apresenta semelhança com a rede haplotípica, pois agrupa as populações do sul e visivelmente separa as demais populações (Fig. 2). Na árvore é observada uma nítida ramificação na população de Pontal-BA, que reforça os demais resultados que indicam equilíbrio populacional neste estuário. Tanto na rede haplotípica quanto na árvore filogenética, a distância genética entre as populações de PE e BA é maior que entre PE e ES, sendo o inverso da distância geográfica entre essas regiões. A principal diferença entre a árvore e a rede de haplótipos é observada na distância genética entre as populações do sul, de Piraquê-açú-ES e Pontal-BA. Na árvore, as populações do sul estão mais próximas à do ES, enquanto que na rede estão mais próximas à da BA. Na árvore filogenética, também observa-se o padrão de estrela nas populações de Piraquê-

açú-ES, Jaguaribe-PE e nas três populações do sul.

Os gráficos obtidos pelo teste de diferenças pareadas (*Mismatch Distribution*) apontaram semelhanças entre algumas populações (Fig.3). A de Jaguaribe-PE e de Pontal-BA apresentam tendências bimodais da distribuição, que pode ser indicativo de equilíbrio populacional, apesar de não apresentarem diferenças em relação ao modelo de expansão súbita ($SSD=0,02$; $p>0,05$). As populações do sul apresentaram um padrão unimodal tanto nas análises individuais quanto na análise das três populações juntas, esse padrão é esperado em populações que passaram por um período de expansão recente ou varredura seletiva (SLATKIN e HUDSON, 1991; LETELIER, 2007). A análise de *mismatch* da população de Piraquê-açu apresentou uma queda contínua na frequência, sendo a única curva observada que diferenciou significativamente do modelo de expansão súbita ($SSD=0,4$; $p<0,05$). A distribuição encontrada nessa população, juntamente com os dados de taxa de expansão e tamanho populacional apresentados na Tabela 1, indica que ela passou por gargalo populacional provavelmente muito intenso e recente.

A estimativa do tempo desde o início da expansão indicou que as população de PE, SC e RS expandiram em datas semelhantes (entre ~50 – 9 mil anos atrás) (Tab. 4). A população da Bahia apresentou a expansão mais antiga (~130 – 25 mil anos atrás), seguida da população do Paraná (~60 – 11 mil anos atrás). Quando considerada todas as populações, a expansão da espécie aparenta ter iniciado entre ~1.235 e 140 mil anos atrás.

O teste de Mantel indicou correlação positiva entre distâncias genética e geográfica (Fig. 4A). Porém, o R^2 aponta que a reta explica apenas 37% da distribuição das distâncias plotadas. A transformação logarítmica dos dados aumentou a correlação das distâncias e o R^2 indicando 74% de correspondência, porém os pontos são distribuídos em “nuvem” e não seguem a trajetória da reta (Fig. 4B).

DISCUSSÃO

O resultado obtido suporta a hipótese de trabalho, de que *A. brasiliensis* apresenta estruturação genética ao longo da costa brasileira. Essa hipótese foi fundamentada principalmente nas características de vida da espécie, que é

basicamente estuarina, incluindo a reprodução e postura de ovos com mecanismos de fixação em substratos desses ambientes (FÁVARO *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2006).

O teste de Mantel indicou correlação positiva entre as distâncias genéticas e geográficas, porém esse resultado deve ser analisado com atenção, pois a distribuição em nuvem dos pontos plotados no gráfico mostra que a relação entre as distâncias não é direta. Observam-se nos dados de F_{st} (Tab. 3) que as populações do sul apresentam maiores diferenças da população do ES do que da população da BA, representando o inverso das distâncias geográficas. A mesma observação a respeito das distâncias genética e geográfica pode ser feita na rede haplotípica, obtida por critério de parcimônia, porém não é observada na árvore filogenética gerada com a análise *bayesiana*. Esse contraste nos resultados ocorreu devido às características de cada análise. A parcimônia considera o mesmo peso para qualquer tipo de mutação (e.g. transição e transversão) e constrói a rede com o mínimo de mutações possíveis, enquanto a *bayesiana* utiliza probabilidades posteriores e *a priori* e identifica quais ligações que possuem maior probabilidade (CASTILLA, 2007; HUELSENBECK e RONQUIST, 2001). Devido à essas características a análise de parcimônia apresentou as ambiguidades observadas na rede haplotípica e na análise *bayesiana* se construiu a árvore com dados de distância genética.

Os resultados mostraram que a espécie *A. brasiliensis* teve um período de início de expansão entre aproximadamente 1.235 milhão de anos e 240 mil anos atrás. A falta de uma taxa de mutação específica para a espécie, ou mesmo para a família, não permite que sejam feitas fortes inferências sobre essas datas. Apesar da baixa confiabilidade, a utilização de taxas de mutação gerais é comum (DURAND *et al.*, 2005; FRANCISCO *et al.*, 2006). Neste estudo, as datas de expansão obtidas para todas as populações juntas equivalem ao período do Pleistoceno médio ao tardio. Durante esse período ocorreu a Grande Glaciação da Patagônia (*Great Patagonian Glaciation*), que ocorreu à um pouco mais de 1 milhão de anos a.p., sendo que os ciclos posteriores de glaciação na América do Sul parecem ter sido mais fracos ou próximos à esse (RABASSA e CORONATO, 2009). As glaciações tiveram diversos impactos na biota mundial, como a redução populacional em diversas espécies com subsequente expansão a partir dos grupos sobreviventes

(VUILLEUMIER, 1971; HEWITT, 2000).

O clima da América do Sul durante os períodos de glaciação é, no geral, mais seco e frio do que em condições interglaciais (JUSTINO *et al.*, 2008; RABASSA e CORONATO, 2009). A influência da fria corrente oceânica das Malvinas (que provem de região circumpolar antártica) na costa brasileira é amplificada, enquanto que a corrente sul do Brasil (quente; oriunda da região equatorial) enfraquece, diminuindo a temperatura das águas costeiras (AB'SABER, 2000; RABASSA e CORONATO, 2009). Essas condições podem ser limitantes para a expansão de espécies de climas tropical ou sub-tropical. Além disso, com o congelamento das águas ocorre a redução na altura relativa do nível do mar (BAKER *et al.*, 2001; RAHMSTORF, 2002). Assim, os estuários sofrem alterações em suas características durante esses períodos, podem até mesmo ter desaparecido ou sido criados durante as mudanças de ciclos, conseqüentemente a fauna à eles associada também pode ser afetada (e.g. BEHEREGARAY *et al.*, 2001).

Em relação ao tempo de expansão populacional para as populações separadas, pode-se observar que as de PE, PR, SC e RS apresentam datas próximas entre elas. Essa homogeneidade no tempo de expansão de diferentes populações pode indicar que elas foram afetadas por algum processo abrangente e em períodos próximos. Isso enfraquece a hipótese de que esses resultados são produtos de varredura seletiva – rápida propagação de um alelo vantajoso em uma população, gerando dados semelhantes à expansão populacional (LETELIER, 2007) – e permite relacioná-los com grandes eventos que ocasionam redução e posterior expansão populacional, como as glaciações.

As observações do comportamento reprodutivo de *A. brasiliensis* indicam que a espécie apresenta dependência das condições de temperatura, salinidade e estruturação da vegetação do estuário para a reprodução (FÁVARO *et al.*, 2003; NEVES *et al.*, 2006; FÁVARO *et al.*, 2007). O extremo sul da distribuição de *A. brasiliensis* parece ser controlado (direta ou indiretamente) pela temperatura, pois se encontra na região encontro entre a quente corrente sul do Brasil, que se origina em baixas latitudes e deriva para o sul, e fria corrente das Malvinas, que tem origem antártica e deriva para o norte próximo à costa da América.

As datas de início de expansão das populações (PE, PR, SC e RS) de *A. brasiliensis* (~50-10 mil anos a.p.) marcam a transição Pleistoceno/Holoceno. Essas

datas se sobrepõem com as estimativas do último máximo glacial e também um período de clima seco na América do Sul (AB'SABER, 2000; GLACER *et al.*, 2007). No período posterior, entre aproximadamente 12 mil anos atrás até o presente, houve aumento na temperatura média dos oceanos e na umidade no continente (AB'SABER, 2000; RAHMSTORF, 2002). LOPES *et al.* (2007) encontraram tempos de expansão entre 30-14 mil anos antes do presente em estudo molecular com aves do Pantanal, relacionando ao fim do último período glacial (25-15 mil anos a.p.), datações semelhantes às encontradas no presente estudo.

A população do Paraná parece ter dado origem às demais populações do sul, pois é a população mais antiga dessa região (expansão entre ~58 e 11 mil anos a.p.) e divide haplótipos com Babitonga-SC e Lagoa dos Patos-RS. A distância genética entre os indivíduos das três populações da região sul em relação a um possível ancestral comum é menor do que as distâncias entre indivíduos dentro de outros estados (e.g. Jaguaribe-PE) (Fig. 2). Ao fim das glaciações, os estuários posicionados em menores latitudes seriam os primeiros a alcançar condições ambientais semelhantes às atuais e compatíveis com a expansão das população de *A. brasiliensis*. Essas condições ambientais, como águas mais quentes, devido ao aumento da força da corrente do Brasil (AB'SABER, 2000; JUSTINO *et al.*, 2008), possibilitariam assim uma expansão das populações de norte para sul. É possível que haja ainda fluxo genético esporádico entre as populações de Paranaguá-PR e Babitonga-SC, que seria facilitado pela presença da Baía de Guaratuba-PR, localizada à 40 km de distância entre os dois estuários analisados. O teste F_{st} indicou que as duas populações não apresentam diferenças significativas.

As populações de Pontal-BA e Jaguaribe-PE estão localizadas nas mais baixas latitudes nesse estudo. As áreas costeiras na região dos dois estuários foi considerada refúgio de flora e fauna tropicais durante o último período seco no continente, entre ~18 – 13 mil anos atrás (AB'SABER, 2000). Essas datas são posteriores à expansão da população da Bahia, portanto ela aparenta não ter sofrido um gargalo populacional durante esse tempo. No entanto, a população de Pernambuco tem um tempo de expansão semelhante às das populações do sul. Como citado anteriormente, nas glaciações, diversas características dos ambientes costeiros foram modificadas. A falta de um estudo específico sobre o efeito das glaciações na costa pernambucana não permite deduções mais detalhadas a

respeito desse estuário. Porém, é interessante notar que a distribuição das diferenças pareadas nas duas populações do nordeste é semelhante, assim como os altos valores de diversidade nucleotídica, haplotípica e do índice θ_0 . Esses resultados indicam que ambas as populações são antigas e tiveram uma história demográfica semelhante. Provavelmente, o gargalo populacional sofrido pela população de Jaguaribe não foi tão extenso quanto aquele previsto para as populações do sul e essas características foram conservadas. O gargalo populacional só reduz toda a diversidade genética em casos mais severos e prolongados (FREELAND, 2005).

A atuação dos ciclos de glaciação sobre as populações do sul parece bastante clara, porém os dados encontrados para a população do Espírito Santo, como $\tau=0$ (zero) e as curvas de diferenças pareadas não consistentes com o modelo de expansão, são resultados que podem ter diferentes interpretações. Esses resultados podem ser relativos a um gargalo populacional, varredura seletiva muito pronunciada e/ou recente ou efeito fundador. Ou ainda, a um equilíbrio populacional, porém com baixa diversidade genética. O manguezal do rio Piraquê-açú é extenso e atualmente protegido, essa característica propicia a teoria de varredura seletiva, ou do equilíbrio populacional, pois não haveria desequilíbrio ambiental para a espécie. Porém, atividades humanas recentes podem ter sido responsáveis por um gargalo populacional. Na Baía de Sepetiba-RJ, a abundância relativa de *A. brasiliensis* está sendo gradualmente reduzida nas análises da ictiofauna, sugerindo que a ocupação humana do local pode ser, de alguma forma, responsável por esse impacto na população local (NEVES *et al.*, 2006). Para elucidar as questões relativas à essa população, e conseqüentemente à história populacional da espécie, estão sendo avaliadas análises mais específicas, que infelizmente não puderam ser incluídas nessa dissertação.

O grau da estruturação obtido para a espécie *A. brasiliensis* é bastante avançado, permitindo inferir que as populações tenham sofrido um processo de divergência alopátrica, a qual ocorre em populações separadas geograficamente (FREELAND, 2005). A partir de um isolamento, a história demográfica de cada população, seja envolvendo gargalos populacionais, deriva genética ou outros processos (provavelmente uma composição de vários), podem conduzir à especiação (HARRISON, 1991). A origem materna do mtDNA pode esconder

possíveis migrações de machos e conseqüentemente fluxos genéticos entre populações. Entretanto, o conhecimento sobre a bioecologia da espécie fornece suporte para afirmar que tais migrações dificilmente ocorrem de forma natural e se ocorrem é pequena e entre estuários bastante próximos. Essa observação indica que a ocupação de *A. brasiliensis* nos diversos estuários foi provavelmente gradual e cada estuário colonizado por poucos indivíduos, promovendo assim um efeito fundador nas populações pioneiras de determinado estuário.

Uma comparação da dinâmica de comunidades de peixes em anos de *El Niño* e anos de *La Niña*, na Lagoa dos Patos-RS, mostrou que quando ocorrem regimes de chuvas acima da média (durante o *El Niño*), *A. brasiliensis* saem do estuário devido ao grande aporte de água doce (GARCIA *et al.*, 2001). Altos índices de pluviosidade, baseado no acúmulo de sedimento de origem continental sobre a plataforma marinha, ocorreram na costa brasileira entre 18,5 e 11,2 mil anos atrás (KNOPPERS *et al.*, 1999), período final do último máximo glacial e início do período mais úmido e quente no continente sul-americano. Caso esse aumento de pluviosidade seja ocorrente em períodos de degelo, isso pode ter auxiliado a saída de *A. brasiliensis* de dentro dos estuários natais e promovido a migração de alguns indivíduos para estuários vizinhos. Com o decorrer do tempo, expandiu a área de ocorrência da espécie e as populações foram se diferenciando geneticamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AB'SABER, A.N. Spaces Occupied by the Expansion of Dry Climates in South America During the Quaternary Ice Ages. **Revista do Instituto Geológico**, São Paulo, 21 (1/2), 71-78, 2000.
- ANDREATA, J.V.; Manzano, F.V.; Baptista, M.G.S; Teixeira, D.E.; de Oliveira, L.O.V.; Longo, M.M.; Freret, N.V.; Valois, A.S. Assembléia de peixes da Lagoa Rodrigo de Freitas, Rio de Janeiro. **Bioikos**, PUC-Campinas, 16(1/2): 19-28, 2002.
- ARAÚJO, F. G.; AZEVEDO, M. C. Assemblages of Southeast-South Brazilian Coastal Systems Based on the Distribution of Fishes. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, Londres, 52: 729–738, 2001.
- AVISE, J.C. **Molecular markers, natural history and evolution**. Chapman & Hall, Londres, 551 p, 1994.
- BAKER, P.A.; SELTZER, G.O.; FRITZ, S.C.; DUNBAR, R.B.; GROVE, M.J.; TAPIA, P.M.; CROSS, S.L.; ROWE, H.D.; BRODA, J.P. The History of South American Tropical Precipitation for the Past 25,000 Years. **Science**, 291: 640-643, 2001
- BARBIERI, L.R.R.; ANDREATA, V.; SANTOS, M.A.; SILVA, M.H.C.; SEBILIA, A.S.C.; SANTOS, R.P. Distribuição e ciclo de vida das espécies de peixes mais abundantes da Laguna de Marapendi, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Rio de Janeiro, 7(3): 223-243, 1991.
- BARREIROS, J.P.; FIGNA, V.; HOSTIM-SILVA, M.; SANTOS, R.S. Seasonal Changes in a Sandy Beach Fish Assemblage at Canto Grande, Santa Catarina, South Brazil. **Journal of Coastal Research**, West Palm Beach, 20(3): 862-870, 2004.
- BEHEREGARAY, L. B.; SUNNUCKS, P. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. **Molecular Ecology**, 10: 2849-2866, 2001.
- BEMVENUTI, M.A. Abundância, distribuição e reprodução de peixes-rei (Atherinidae) na região estuarina da Lagoa dos Patos, RS, Brasil. **Atlântica**, Rio Grande, 9(1): 5-32, 1987.
- BERVIAN V., FONTOURA N.F. Growth of the Silverside *Atherinella brasiliensis* in Tramandaí Estuary, Southern Brazil (Actinopterygii: Atherinopsidae). **Neotropical Ichthyology**, Porto Alegre, 5(4), 2007.
- BONFIELD, J.K.; RADA, C.; STADEN, R. Automated detection of point mutations using fluorescent sequence trace subtraction. **Nucleic Acids Research**, 26(14): 3404-3409.

- CASTILLA, L.M. Reconstrucción de la historia de cambios de los caracteres IN Eguiarte, L.E.; Souza, V.; Aguirre X. (comp.) **Ecología Molecular**, Instituto Nacional de Ecología, México. Capítulo 4: 87-160, 2007.
- CONRAD, D.F.; HURLES, M.E. The population genetics of structural variation. **Nature Genetics Supplement**, 39: S30-S36, 2007.
- CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, 9(10): 1657-1660, 2000.
- CORTINHAS, M.C.S. **Análise da diversidade populacional de *Atherinella brasiliensis* (Teleostei, Atheriniformes, Atherinopsidae) baseada em marcadores RAPD das localidades de Pontal do Sul e Laranjeiras (PR), Lagoa da Conceição e Lagoa do Camacho (SC), Lagoa dos Patos (RS), Lagoa de Carapebus (RJ) e Barra Grande de Camamu (BA)**. Curitiba, 2007. 110f. Tese (Doutorado em Genética). Setor de Ciências Biológicas – Universidade Federal do Paraná.
- EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary Bioinformatics Online**, 1: 47-50, 2005.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.; AND QUATTRO, J.; Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics** 131:479-491, 1992.
- FÁVARO, L.F.; LOPES, S.C.G.; SPACH, H.L. Reprodução do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae), em uma planície de maré adjacente à gamboa do Baguaçu, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 20(3): 501–506, 2003
- FÁVARO, L.F.; OLIVEIRA, E.C. DE; VERANI, N.F. Estrutura da população e aspectos reprodutivos do peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy e Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae) em áreas rasas do complexo estuarino de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 24(4): 1150–1156, 2007.
- FIGUEIREDO, J. L.; MENEZES, N. A. **Manual de peixes marinhos do sudeste do Brasil. II. Teleostei (1)**. São Paulo: Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, 110p, 1978.
- FRANÇA, E.J. **Abundância distribuição e caracterização morfológica de larvas de *Atherinella brasiliensis* (Atherinopsidae, Atheriniformes) no estuário do rio Jaguaribe, Pernambuco, Brasil**. Recife, 2005. 42f. Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura). Universidade Federal de Pernambuco.

- FRANCISCO, S.M.; CABRAL, H.; VIEIRA, M.N.; ALMEIDA, V.C. Contrasts in genetic structure and historical demography of marine and riverine populations of *Atherina* at similar geographical scales. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, 69: 655-661, 2006.
- FREELAND, J.R. **Molecular Ecology**. John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 388p, 2005.
- FU, Y. X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, 147: 915-925, 1997.
- GARCIA A.M.; VIEIRA, J.P.; WINEMILLER, K.O. Dynamics of the shallow-water fish assemblage of the Patos Lagoon estuary (Brazil) during cold and warm ENSO episodes. **Journal of Fish Biology**, 59: 1218–1238, 2001.
- GLASSER, N.F.; JANSSON, K.N.; HARRISON, S., KLEMAN, J. The glacial geomorphology and Pleistocene history of South America between 381S and 561S. **Quaternary Science Reviews**, 27: 365–390, 2008.
- HARPENDING, R.C. Signature of ancient population growth in low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. **Human Biology**, 66: 591-600, 1994.
- HARRISON, R.G. Molecular changes at speciation. **Annual Reviews of Ecology and Systematics**, 22: 281-308, 1991
- HEWITT, G. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907-913, 2000.
- HOSTIM-SILVA, M.; CLEZAR, L.; RIBEIRO, G.C.; MACHADO, C. Estrutura populacional de *Xenomelaniris brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes- Atherinidae) na Lagoa da Conceição, SC, Brasil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, 38(3): 949- 960, 1995.
- HUELSENBECK, J.P.; RONQUIST, F. MR. BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, 17: 754–755, 2001.
- KNOPPERS, B.; EKAU, W; FIGUEIREDO, A.G. The coast and shelf of east and northeast Brazil and material transport. **Geo-Marine Letters**, 19: 171-178, 1999.
- LETÉLIER, A.M. Tamaño efectivo de la población IN Eguiarte, L.E.; Souza, V.; Aguirre X. (comp.) **Ecología Molecular**, Instituto Nacional de Ecología, México. Capítulo 3: 63-86, 2007.
- LOPES, I.F.; MIÑO, C.I.; DEL LAMA, S.N. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. **Brazilian Journal of Biology**, 67(4, Supl.): 849-857, 2007.

- MEYER, A.; KOCHER, T.D.; BASASIBWAKI, P.; WILSON, A.C. Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences. **Nature**, 347:550–553 (1990).
- MILLER, M.A.; HOLDER, M.T.; VOS, R.; MIDFORD, P.E.; LIEBOWITZ, T.; CHAN, L.; HOOVER, P.; WARNOW, T. The CIPRES Portals. CIPRES. 2009-08-04. URL:http://www.phylo.org/sub_sections/portal. Acessado: 15-12-09. (Archived by WebCite(r) at <http://www.webcitation.org/5imQlJeQa>)
- MOUSSET, S.; DEROME, N.; VEUILLE, M. 2004 A test of neutrality and constant population size based on the mismatch distributions. **Molecular Biology and Evolution**, 20(4): 724-731, 2004.
- NEI, M. 1975. **Molecular population genetics and evolution**. North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 288p.
- NEVES L.M.; PEREIRA, H.H.; COSTA, M.R.; ARAÚJO, F.G. Uso do manguezal de Guabatiba, Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, pelo peixe-rei *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 23(2): 421–428, 2006.
- OLIVEIRA-NETO, J.F.; PIE, M.R.; BOEGER, W.A.; OSTRENSKY, A.; BAGGIO, R.A. Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). **Marine Ecology**, Berlin, 28(4): 460-469, 2007.
- PESSANHA, A.L.M.; ARAÚJO, F.G. Recrutamento do peixe-rei, *Atherinella brasiliensis* (Quoy & Gaimard) (Atheriniformes, Atherinopsidae), na margem continental da baía de Sepetiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, Curitiba, 18(4): 1265-1274, 2001.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. **Molecular Biology and Evolution**, 25(7):1253-1256, 2008.
- PRIOLI, S.M.A.P.; PRIOLI, A.J.; JULIO JR, H.F.; PAVANELLI, C.S.; OLIVEIRA, A.V.; CARRER, H.; CARRARO, D.M.; PRIOLI, L.M. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguacu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. **Genetics and Molecular Biology**, 25(4): 421-430, 2002.
- PRODOCIMO, V.; TSCHÁ, M.K.; PIE, M.R.; OLIVEIRA-NETO, J.F.; OSTRENSKY, A.; BOEGER, A. Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: Centropomidae) along the Brazilian coast. **Journal of Fish Biology**, 73: 2075-2082, 2008.
- JORGE RABASSA, J.; CORONATO, A. Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego during the Ensenadan Stage/Age (Early Pleistocene–earliest Middle Pleistocene). **Quaternary International**, 210: 18–36, 2009.

- RAHMSTORF, S. Ocean circulation and climate during the past 120,000 years. **Nature**, 419: 207-214.
- ROGERS A.J.; HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. **Molecular Biology Evolution**, 9: 552–569, 1992.
- SACCONI, C. The evolution of mitochondrial DNA. **Current Opinion in Genetic and Development**, 4: 875-881, 1994.
- SANTOS, A.C.A.; CASTELLUCI, F.R.C.; NEPOMUCENO, C.F.; SANTOS, E.P. Distribuição e recrutamento do peixe-rei *Xenomelaniris brasiliensis* (Osteichthyes, Atherinidae) na margem continental oeste da Baía de Todos os Santos, Bahia, Brasil. **Acta Biológica Leopoldinensia**, Feira de Santana, 21(1): 107-118, 1999.
- SANTOS, C.; SCHWARZ-JR, R.; OLIVEIRA-NETO, J.F.; SPACH, H.L. A ictiofauna em duas planícies de maré do setor euhalino da Baía de Paranaguá, PR. **Boletim do Instituto da Pesca**, São Paulo, 28(1): 49 - 60, 2002.
- SANTOS, S.; SCHNEIDER, H.; SAMPAIO, I. Genetic differentiation of *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae, Perciformes) populations in Atlantic coastal waters of South America as revealed by mtDNA analysis. **Genetics and Molecular Biology**, 26(2): 151-161, 2003.
- SCHNEIDER S.; EXCOFFIER L. Estimation of demographic parameters from distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. **Genetics**, 152: 1072-1089, 1999.
- SEUTIN, G.; WHITE, B. N.; BOAG., P. T. Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. **Canadian Journal of Zoology**, 69: 82-90, 1991.
- SLATKIN, M; HUDSON, R.R. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. **Genetics**, 129, 555-562, 1991.
- SPACH H.L.; SANTOS, C.; PICHLER, H.A.; IGNÁCIO, J.M.; STOIEV, S.B.; BERNARDO, C. Padrões estruturais da assembléia de peixes em duas áreas do Canal da Cottinga, Baía de Paranaguá, Paraná, Brasil. **Bioikos**, Campinas, 21(2):57-67, 2007.
- SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 1998.

- TABERLET, P. Biodiversity at the intraspecific level: the comparative phylogeographic approach. **Journal of Biotechnology**, 64: 91-100, 1998.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123: 585–595, 1989.
- TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, 10:512-526, 1993.
- THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. AND GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, 22: 4673–4680.
- VENDEL, A.L.; CHAVES, P.T. Use of an estuarine environment (Barra do Saí lagoon, Brazil) as nursery by fish. **Revista Brasileira de Zoologia** 23(4): 1117–1122, 2006.
- VENDEL, A.L.; LOPES, S.G.; SANTOS, C.; SPACH, H.L. Fish Assemblages in a Tidal Flat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 46(2): 233-242, 2003.
- VUILLEUMIER, B.S. Pleistocene Changes in the Fauna and Flora of South América. **Science**, 173(3999): 771-780, 1971.
- WEISSTEIN, E. W. "Bonferroni Correction." From MathWorld--A Wolfram Web Resource. <http://mathworld.wolfram.com/BonferroniCorrection.html>

TABELAS

TABELA 5. VALORES DESCRITIVOS E PARÂMETROS OBTIDOS PELA ANÁLISE DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL DE *Atherinella brasiliensis*

	Jaguaribe-PE	Pontal-BA	Piraquê-açu-ES	Paranagua-PR	Babitonga-SC	Lagoa dos Patos-RS	Todos
N	20	20	20	18	20	20	118
H	10	9	7	10	10	5	47
No. sítios polimórficos	12	10	7	11	10	4	56
Div. Haplotípica	0,837 +/- 0,076	0,837 +/- 0,059	0,521 +/- 0,135	0,850 +/- 0,078	0,758 +/- 0,101	0,779 +/- 0,050	0,934 +/- 0,012
Div. Nucleotídica	0,010 +/- 0,006	0,006 +/- 0,04	0,003 +/- 0,002	0,007 +/- 0,004	0,005 +/- 0,003	0,004 +/- 0,003	0,029 +/- 0,015
PD	4,730 +/- 2,415	2,537 +/- 1,423	1,413 +/- 0,902	3,264 +/- 1,763	2,499 +/- 1,406	1,966 +/- 1,161	13,497 +/- 6,11
F_s de Fu	-4,39 (p=0,006)	-2,34 (p=0,095)	-3,71 (p=0,001)	-5,70 (p=0,000)	-6,33 (p=0,000)	-0,50 (p=0,360)	-9,38 (p=0,042)
D de Tajima	-1,37 (p=0,083)	-0,11 (p=0,503)	-1,69 (p=0,030)	-1,61 (p=0,040)	-1,7 (p=0,034)	0,38 (p=0,685)	0,56 (p=0,781)
T	1,68 (0-4,86)	4,35 (0,332-9,4)	0,00	1,93 (0,57-3,12)	1,59 (0,13-3,03)	1,58 (0,60-2,61)	41,08 (0,53-137,7)
θ₀	0,39 (0-4,67)	0,11 (0-1,69)	0,00	0,05 (0-0,75)	0,05 (0-0,71)	0,02 (0-0,08)	0,67 (0-8,25)
θ₁	66454,87 (5,91-99999)	19370,24 (1,09-99999)	871,64 (802,2-802,2)	77437,70 (4,34-99999)	71218,10 (1,82-99999)	72865,75 (2,90-99999)	3157,11 (9,08-99999)

Nota: (*) 0,01 ≤ p < 0,05; (**) p < 0,01. Valores de p e intervalos de confiança obtidos com 10000 réplicas.

TABELA 6 - RESULTADO DA ANÁLISE DE VARIÂNCIA MOLECULAR (AMOVA) APLICADA NAS SEQUENCIAS DA REGIÃO CONTROLE (D-LOOP) DO DNA MITOCÔNDRIAL DE *Atherinella brasiliensis*

Local de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Variância de components	Varição (%)
Entre populações	5	695,400	7,03113	89,329
Dentro das populações	112	94,172	0,84082	10,68
Total	117	789,572	7,87195	

$F_{st} = 0,89319^*$

Nota: * - $p < 0,01$. Valor de p obtido com 10100 permutações. Modelo utilizado – Tamura&Nei

TABELA 7 – DISTÂNCIA GENÉTICA (F_{st}) ENTRE AS POPULAÇÕES DE *Atherinella brasiliensis* PAREADAS

Locais	1	2	3	4	5
1 FOR-PE	0				
2 PON-BA	0,92*	0			
3 PAC-ES	0,94*	0,80*	0		
4 PNG-PR	0,93*	0,83*	0,91*	0	
5 BAB-SC	0,94*	0,84*	0,92*	0,01	0
6 LPA-RS	0,94*	0,84*	0,92*	0,11*	0,15*

Nota: * - $p < 0,01$, valores de p obtidos à partir de 1023 permutações. Modelo utilizado – Tamura&Nei

TABELA 8 – ESTIMATIVA DO TEMPO (EM ANOS), DESDE QUE OCORREU A EXPANSÃO DAS POPULAÇÕES DE *A. brasiliensis*, PARA CADA TAXA DE MUTAÇÃO CONSIDERADA

μ	PE	BA	ES	PR	SC	RS	Todos
3,60%	50.505	130.772	0	58.021	47.799	47.499	1.234.969
18,60%	9.775	25.311	0	11.230	9.252	9.193	239.026

FIGURAS

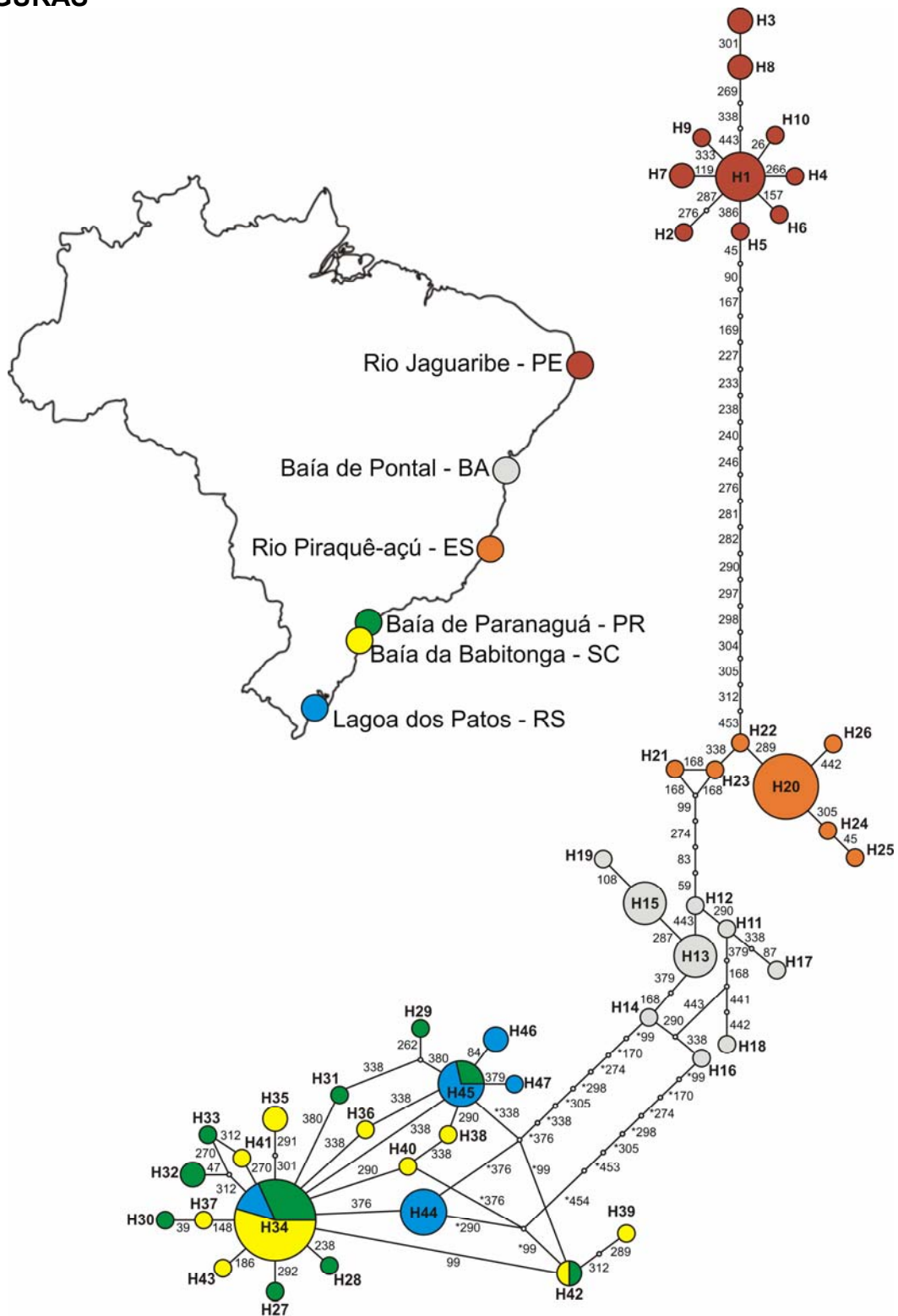


FIGURA 5 – REDE HAPLOTÍPICA OBTIDA POR MÁXIMA PARCIMÔNIA. O DIÂMETRO DAS CIRCUNFERÊNCIAS É RELATIVO AO NÚMERO DE INDIVÍDUOS REPRESENTADO PELO HAPLÓTIPO. NÚMEROS AO LADO DAS BARRAS INDICAM EM QUAL POSIÇÃO DA SEQUÊNCIA QUE OCORREU MUTAÇÃO (* - MUTAÇÕES AMBÍGUAS)

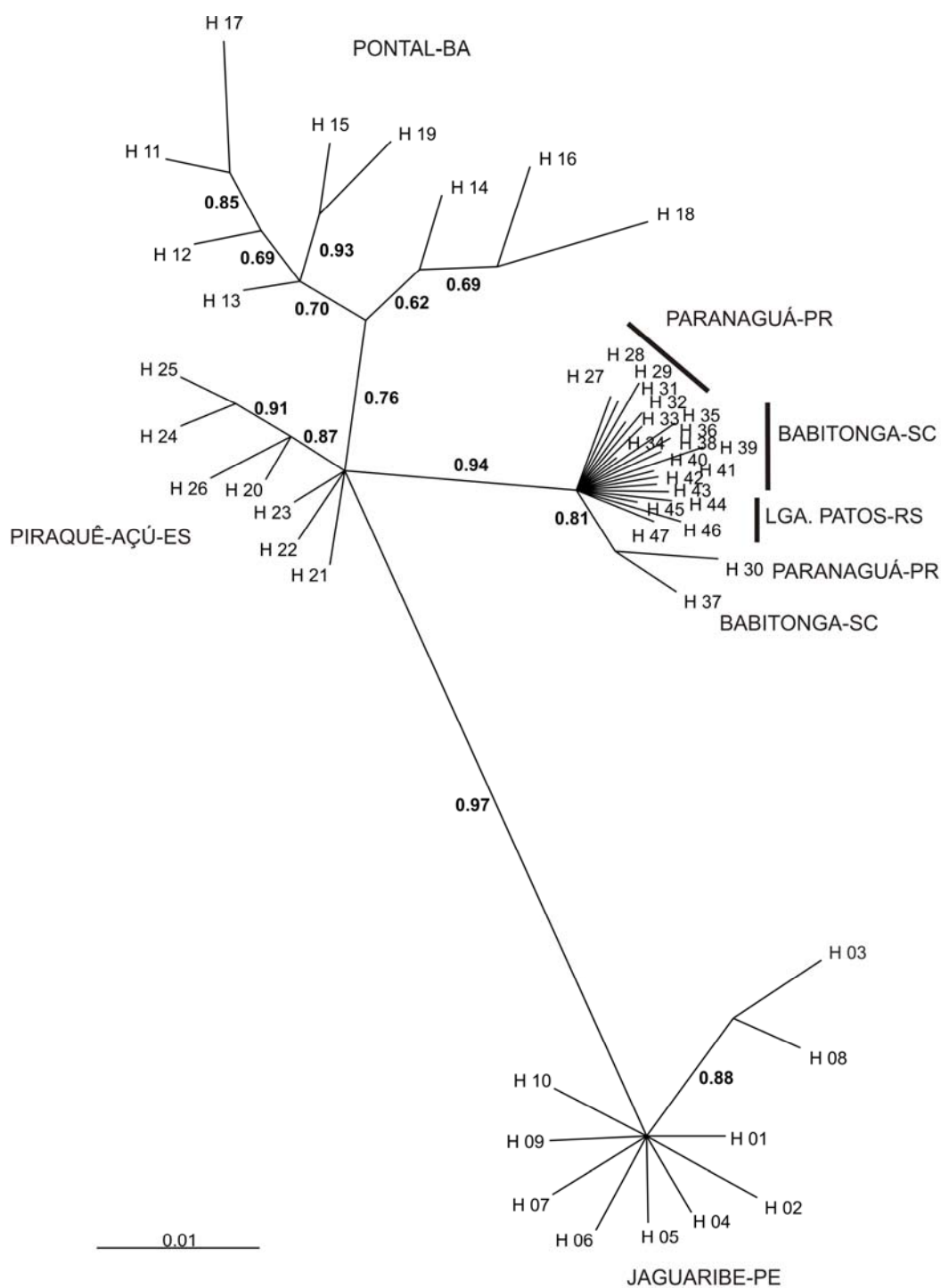


FIGURA 6 – ÁRVORE FILOGENÉTICA NÃO-ENRAIZADA DOS HAPLÓTIPOS DE *Atherinella brasiliensis*, CONSTRUÍDA A PARTIR DO CONSENSO DE MAIORIA (50% MAJORITY-RULE) COM ANÁLISE BAYESIANA. O COMPRIMENTO DAS RETAS REPRESENTA A DISTÂNCIA GENÉTICA E OS NÚMEROS EM NEGRITO REPRESENTAM AS PROBABILIDADES POSTERIORES DE SUPORTE DO CLADO

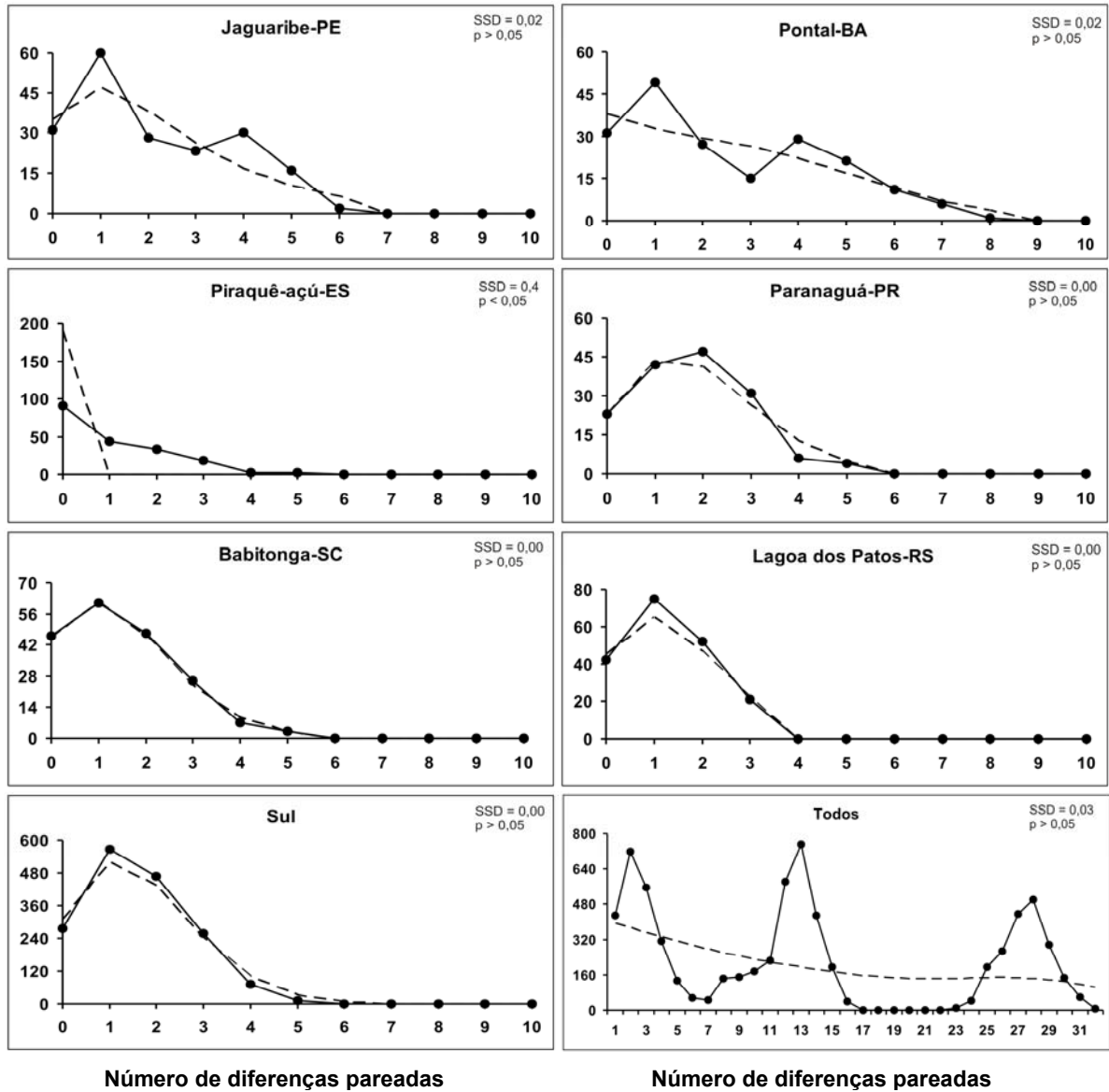


FIGURA 7 – GRÁFICOS DA DISTRIBUIÇÃO DAS DIFERENÇAS PAREADAS OBSERVADAS NA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCÔNDRIAL DAS POPULAÇÕES DE *Atherinella brasiliensis* DE CADA LOCAL E DAS POPULAÇÕES DA REGIÃO SUL AGRUPADAS (LINHAS CONTÍNUAS E CÍRCULOS INDICAM OS DADOS OBSERVADO, LINHAS PONTILHADAS INDICAM OS DADOS ESPERADOS)

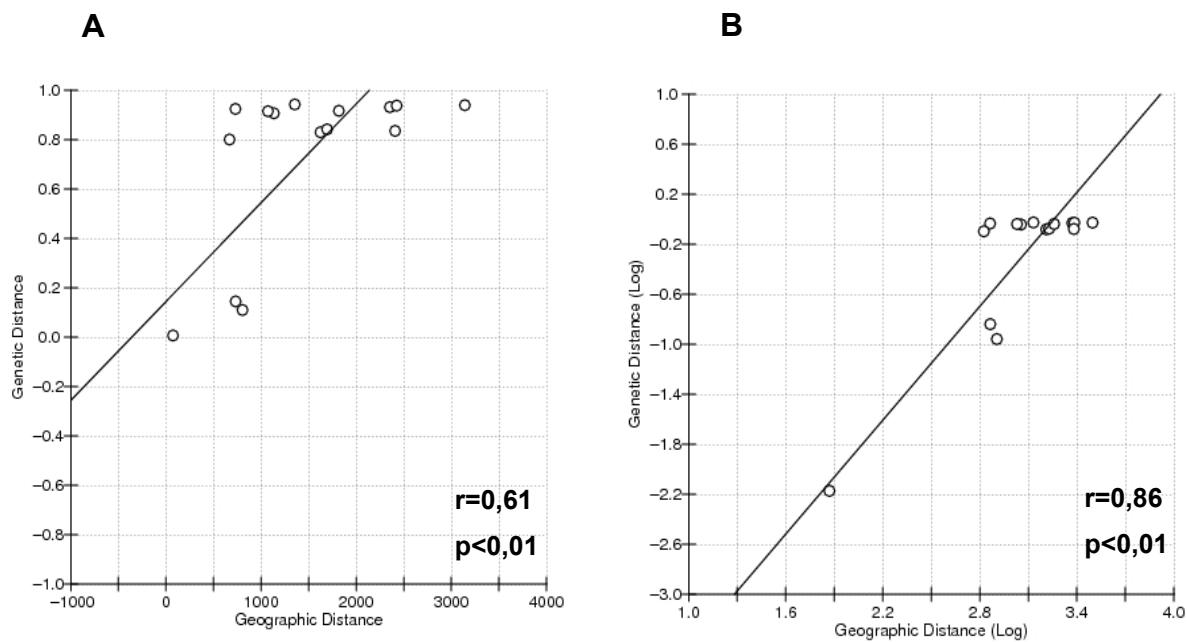


FIGURA 8 – GRÁFICO DE CORRELAÇÃO ENTRE (A) AS DISTÂNCIAS GENÉTICA E GEOGRÁFICA DAS POPULAÇÕES DE *Atherinella brasiliensis* E (B) AS DISTÂNCIAS GENÉTICA E GEOGRÁFICA SOB TRANSFORMAÇÃO LOGARÍTMICA

ANEXOS

Anexo I. Alinhamento das sequências de *Atherinella brasiliensis* utilizadas nas análises

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
JAG_01	TGCCCTGGTAGCTCAGTGCTAGAGCGCCGGTCTTGTAAGCCGGACGCCGAGGGTTAAATCCCTCCCAGTGCTTCAAAGAAGGGGGATTTTAACCCCCAC									
JAG_02									
JAG_03									
JAG_04									
JAG_05									
JAG_06									
JAG_07									
JAG_08									
JAG_09									
JAG_10									
JAG_11									
JAG_12									
JAG_13									
JAG_14									
JAG_15									
JAG_16									
JAG_17									
JAG_18									
JAG_19		A							
JAG_20									
PAC_01				T					C
PAC_02				T					C
PAC_03				T					C
PAC_04				T					C
PAC_05				T					C
PAC_06				T					C
PAC_07				T					C
PAC_08				T					C
PAC_09				T					C
PAC_10				T					C
PAC_11				T					C
PAC_12				T					C
PAC_13				T					C

PAC_14	T	C
PAC_15	T	C
PAC_18	T	C
PAC_19	T	C
PAC_20	T	C
PAC_22	T	C
PAC_23	T	C
ILH_02	TGAC.....G
ILH_03	TGAC.....G
ILH_04	TGAC.....G
ILH_05	TGAC.....G
ILH_07	TGAC.....G
ILH_08	TGAC.....G
ILH_09	TGAC.....G
ILH_11	TGAC.....G
ILH_12	TGAC.....G
ILH_13	TGAC.....G
ILH_14	TGAC.....G
ILH_15	TGAG.....C.....G
ILH_17	TGAC.....G
ILH_18	TGAC.....G
ILH_19	TGAC.....G
ILH_20	TGAC.....G
ILH_21	TGAC.....G
ILH_22	TGAC.....G
ILH_23	TGAC.....G
ILH_24	TGAC.....G
PNG_02	TGAC.....
PNG_03	TGAC.....
PNG_04	TGAC.....G
PNG_05	TGAC.....
PNG_06	TGAC.....
PNG_07	TGAC.....
PNG_08	TGAC.....
PNG_09	TGAC.....
PNG_10	TGAC.....
PNG_11	TGAC.....
PNG_12	TGAC.....
PNG_13	ATGA.....C.....
PNG_14TGA.....C.....

PNG_15	T	G	A	C	
PNG_17	T	T	G	A	C
PNG_18	T	G	A	C	
PNG_19	T	G	A	C	
PNG_20	T	T	G	A	C
BAB_01	T	G	A	C	
BAB_02	T	G	A	C	
BAB_03	T	G	A	C	
BAB_04	T	G	A	C	
BAB_05	T	G	A	C	
BAB_06	T	G	A	C	
BAB_07	T	G	A	C	
BAB_08	T	G	A	C	
BAB_09	T	G	A	C	
BAB_10	T	G	A	C	
BAB_11	T	G	A	C	G
BAB_12	T	G	A	C	
BAB_13	T	G	A	C	
BAB_14	T	G	A	C	
BAB_15	T	G	A	C	
BAB_16	T	G	A	C	G
BAB_17	T	G	A	C	
BAB_18	T	G	A	C	
BAB_19	T	G	A	C	
BAB_20	T	G	A	C	
LP_01	T	G	A	C	
LP_02	T	G	A	C	
LP_03	T	G	AA	C	
LP_04	T	G	A	C	
LP_05	T	G	A	C	
LP_06	T	G	A	C	
LP_07	T	G	A	C	
LP_08	T	G	A	C	
LP_09	T	G	A	C	
LP_10	T	G	A	C	
LP_11	T	G	A	C	
LP_12	T	G	A	C	
LP_13	T	G	AA	C	
LP_14	T	G	A	C	
LP_15	T	G	A	C	

```

LP_16 .....T.....G.....A.....C.....
LP_17 .....T.....G.....A.....C.....
LP_18 .....T.....G.....A.....C.....
LP_19 .....T.....G.....A.....C.....
LP_20 .....T.....G.....A.....C.....

```

```

          110      120      130      140      150      160      170      180      190      200
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JAG_01 CCCTAACTCCCAAAGCTAGGATTCTTAACTAAACTATTCTTTGCCGGACTCTGCCACAAATGTACCCTAGCAGGTATGTTGTTTGACTAGGTATGTATTA
JAG_02 .....
JAG_03 .....
JAG_04 .....
JAG_05 .....
JAG_06 .....
JAG_07 .....
JAG_08 .....
JAG_09 .....
JAG_10 .....T.....
JAG_11 .....
JAG_12 .....A.....
JAG_13 .....
JAG_14 .....
JAG_15 .....
JAG_16 .....
JAG_17 .....A.....
JAG_18 .....
JAG_19 .....
JAG_20 .....
PAC_01 .....T.....C.....
PAC_02 .....T.....C.....
PAC_03 .....T.....C.....
PAC_04 .....T.....C.....
PAC_05 .....TA.....C.....
PAC_06 .....T.....C.....
PAC_07 .....T.....C.....
PAC_08 .....T.....C.....
PAC_09 .....T.....C.....
PAC_10 .....T.....C.....
PAC_11 .....T.....C.....
PAC_12 .....T.....C.....

```

PAC_13	T	C
PAC_14	T	C
PAC_15	T	C
PAC_18	T	C
PAC_19	T	C
PAC_20	T	C
PAC_22	T	C
PAC_23	T	C
ILH_02	TC	C
ILH_03	TC	C
ILH_04	TC	C
ILH_05	T	C
ILH_07	TC	C
ILH_08	TC	C
ILH_09	TC	C
ILH_11	TC	C
ILH_12	T	C
ILH_13	T	C
ILH_14	TC	C
ILH_15	TC	C
ILH_17	TC	C
ILH_18	TC	C
ILH_19	TC	C
ILH_20	TC	C
ILH_21	TC	C
ILH_22	T	C
ILH_23	TC	C
ILH_24C	TC	C
PNG_02	T	A	C
PNG_03	T	A	C
PNG_04	T	A	C
PNG_05	T	A	C
PNG_06	T	A	C
PNG_07	T	A	C
PNG_08	T	A	C
PNG_09	T	A	C
PNG_10	T	A	C
PNG_11	T	A	C
PNG_12	T	A	C
PNG_13G	T	A	C

PNG_14	T . A	C	
PNG_15	T . A	C	
PNG_17	T . A	C	
PNG_18	T . A	C	
PNG_19	T . A	C	
PNG_20	T . A	C	
BAB_01	T . A	C	
BAB_02	T . A	C	
BAB_03	T . A	C	
BAB_04	T . A	C	
BAB_05	T . A	C	
BAB_06	T . A	C	
BAB_07	G	T . A	C
BAB_08	T . A	C	
BAB_09	T . A	C	
BAB_10	T . A	C	
BAB_11	T . A	C	
BAB_12	T . A	C	
BAB_13	T . A	C	
BAB_14	T . A	C	
BAB_15	T . A	C	
BAB_16	T . A	C	
BAB_17	T . A	T	C
BAB_18	T . A	C	
BAB_19	T . A	C	
BAB_20	T . A	C	
LP_01	T . A	C	
LP_02	T . A	C	
LP_03	T . A	C	
LP_04	T . A	C	
LP_05	T . A	C	
LP_06	T . A	C	
LP_07	T . A	C	
LP_08	T . A	C	
LP_09	T . A	C	
LP_10	T . A	C	
LP_11	T . A	C	
LP_12	T . A	C	
LP_13	T . A	C	
LP_14	T . A	C	

LP_15 T . A C
 LP_16 T . A C
 LP_17 T . A C
 LP_18 T . A C
 LP_19 T . A C
 LP_20 T . A C

	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300

JAG_01	TCACCATATATATATATGCAACATATGTGATATTATTACGTGCTTGATAACCATATGGTGTTAATACATTAAC-TATACTCTAACATAATATTAATAAAA									
JAG_02 -									
JAG_03 -									
JAG_04 - . G C									
JAG_05 -									
JAG_06 C -									
JAG_07 G -									
JAG_08 -									
JAG_09 -									
JAG_10 -									
JAG_11 C -									
JAG_12 -									
JAG_13 C -									
JAG_14 -									
JAG_15 -									
JAG_16 -									
JAG_17 -									
JAG_18 C -									
JAG_19 -									
JAG_20 -									
PAC_01 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_02 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_03 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_04 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_05 A C T . T A - C . G TC A GT ..	
PAC_06 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_07 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_08 A C T . T A - C . G TC A GT ..	
PAC_09 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_10 A C T . T A - C . G TC GA GT ..	
PAC_11 A C T . T A - C . G TC A GT ..	


```

LP_14 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...
LP_15 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...
LP_16 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...
LP_17 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...
LP_18 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...
LP_19 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...
LP_20 .....A.....C.....T.T.....A.....-.....C.G.....TC.....A.....G...

```

```

          310          320          330          340          350          360          370          380          390          400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
JAG_01 ACATAGTACGACAGACAAGGTCCTGCTAACGTTCCCTTGCTAATGTTATTATCACAGGCATCGCACGCTGCCCTGCCAGCATATTATGTAATAAGAGACC
JAG_02 .....
JAG_03 .....
JAG_04 .....
JAG_05 .....
JAG_06 G.....A.....
JAG_07 .....
JAG_08 .....G.....
JAG_09 .....
JAG_10 .....
JAG_11 G.....A.....
JAG_12 .....
JAG_13 .....A.....
JAG_14 .....
JAG_15 .....
JAG_16 .....C.....
JAG_17 .....
JAG_18 .....A.....
JAG_19 .....
JAG_20 .....
PAC_01 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_02 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_03 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_04 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_05 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_06 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_07 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_08 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_09 ..CG.....T.....A.....G.....
PAC_10 ..CG.....T.....A.....G.....

```

PAC_11	...	CG	...	T	A	G
PAC_12	...	CG	...	T	A	G
PAC_13	...	C	T	A	G
PAC_14	...	CG	...	T	A	G
PAC_15	...	CG	...	T	A	G
PAC_18	...	C	T	A	G
PAC_19	...	CG	...	T	A	G
PAC_20	...	CG	...	T	A	G
PAC_22	...	CG	...	T	A	G
PAC_23	...	CG	...	T	A	G
ILH_02	...	CG	...	T	A	G
ILH_03	...	CG	...	T	A	G
ILH_04	...	CG	...	T	A	G
ILH_05	...	CG	...	T	A	A
ILH_07	...	CG	...	T	A	G
ILH_08	...	CG	...	T	A	G
ILH_09	...	CG	...	T	A	G
ILH_11	...	CG	...	T	A	G
ILH_12	...	CG	...	T	A	A
ILH_13	...	CG	...	T	A	A
ILH_14	...	CG	...	T	A	G
ILH_15	...	CG	...	T	A	G
ILH_17	...	CG	...	T	A	G
ILH_18	...	CG	...	T	A	G
ILH_19	...	CG	...	T	A	G
ILH_20	...	CG	...	T	A	G
ILH_21	...	CG	...	T	A	G
ILH_22	...	CG	...	T	A	A
ILH_23	...	CG	...	T	A	G
ILH_24	...	CG	...	T	A	G
PNG_02	...	C	T	A	T
PNG_03	...	C	T	A	T
PNG_04	...	C	T	A	T
PNG_05	...	C	T	A	T
PNG_06	...	C	T	A	T
PNG_07	...	C	T	A	T
PNG_08	...	C	T	A	T
PNG_09	...	C	T	A	T
PNG_10	...	C	T	A	T
PNG_11	...	C	T	A	T

PNG_12	..C.....T.....	T..A.....G.....
PNG_13	..C.....T.....	T..A.....G.....
PNG_14	..C.....T.....	T..AT.....G.....
PNG_15	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
PNG_17	..C.....T.....	T..A.....G.....
PNG_18	..C.....T.....	T..A.....G.....
PNG_19	..C.....T.....	T..A.....G.....
PNG_20	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_01	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_02	G..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_03	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_04	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_05	G..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_06	..C.....T.....C.....	T..A.....G.....
BAB_07	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_08	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_09	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_10	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
BAB_11	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_12	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_13	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_14	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_15	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_16	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_17	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_18	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_19	..C.....T.....	T..A.....G.....
BAB_20	..C.....T.....	T..A.....G.....
LP_01	..C.....T.....	T..A.....G.....
LP_02	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
LP_03	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
LP_04	..C.....T.....	T..A.....G.....
LP_05	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
LP_06	..C.....T.....	T..A.....G.....
LP_07	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
LP_08	..C.....T.....	T..A.....G.....
LP_09	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
LP_10	..C.....T.....	T..A.....G.....
LP_11	..C.....T.....A.....	T..A.....G.....
LP_12	..C.....T.....	T..A.....G.....

LP_13 ...C.....T.....A.....T..A.....G.....
 LP_14 ...C.....T.....T..A.....G.....
 LP_15 ...C.....T.....A.....G.....
 LP_16 ...C.....T.....A.....G.....
 LP_17 ...C.....T.....A.....T..A.....G.....
 LP_18 ...C.....T.....T..A.....G.....
 LP_19 ...C.....T.....A.....G.....
 LP_20 ...C.....T.....A.....G.....

	410	420	430	440	450	460
JAG_01	ACCATCAGTTGACTAGTTAATGTTAATTTGTCATTGATGGTCAAGGGCATTAAATTGTGGGGGT					
JAG_02					
JAG_03					
JAG_04					
JAG_05					
JAG_06G.....					
JAG_07					
JAG_08					
JAG_09					
JAG_10					
JAG_11G.....					
JAG_12					
JAG_13G.....					
JAG_14					
JAG_15					
JAG_16					
JAG_17					
JAG_18G.....					
JAG_19					
JAG_20					
PAC_01C.....					
PAC_02C.....					
PAC_03C.....					
PAC_04C.....					
PAC_05C.....					
PAC_06C.....					
PAC_07C.....					
PAC_08C.....					
PAC_09C.....					

PAC_10	C.....
PAC_11	C.....
PAC_12	C.....
PAC_13	C.....
PAC_14	C.....
PAC_15	C.....
PAC_18	C.....
PAC_19	C.....
PAC_20	C.....
PAC_22C.....	C.....
PAC_23	C.....
ILH_02	C.....
ILH_03	C.....
ILH_04G.....	C.....
ILH_05G.....	C.....
ILH_07G.....	C.....
ILH_08G.....	C.....
ILH_09G.....	C.....
ILH_11G.....	C.....
ILH_12G.....	C.....
ILH_13G.....	C.....
ILH_14G.....	C.....
ILH_15	C.....
ILH_17G.....	C.....
ILH_18G.....	C.....
ILH_19G.....	C.....
ILH_20G.....	C.....
ILH_21G.....	C.....
ILH_22-C.....	C.....
ILH_23G.....	C.....
ILH_24G.....	C.....
PNG_02G.....	C.....
PNG_03G.....	C.....
PNG_04G.....	C.....
PNG_05G.....	C.....
PNG_06G.....	C.....
PNG_07G.....	C.....
PNG_08G.....	C.....
PNG_09G.....	C.....
PNG_10G.....	C.....

PNG_11G.....C.....
PNG_12G.....C.....
PNG_13G.....C.....
PNG_14G.....C.....
PNG_15G.....C.....
PNG_17G.....C.....
PNG_18G.....C.....
PNG_19G.....C.....
PNG_20G.....C.....
BAB_01G.....C.....
BAB_02G.....C.....
BAB_03G.....C.....
BAB_04G.....C.....
BAB_05G.....C.....
BAB_06G.....C.....
BAB_07G.....C.....
BAB_08G.....C.....
BAB_09G.....C.....
BAB_10G.....C.....
BAB_11G.....C.....
BAB_12G.....C.....
BAB_13G.....C.....
BAB_14G.....C.....
BAB_15G.....C.....
BAB_16G.....C.....
BAB_17G.....C.....
BAB_18G.....C.....
BAB_19G.....C.....
BAB_20G.....C.....
LP_01G.....C.....
LP_02G.....C.....
LP_03G.....C.....
LP_04G.....C.....
LP_05G.....C.....
LP_06G.....C.....
LP_07G.....C.....
LP_08G.....C.....
LP_09G.....C.....
LP_10G.....C.....
LP_11G.....C.....

LP_12	G.....	C.....
LP_13	G.....	C.....
LP_14	G.....	C.....
LP_15	G.....	C.....
LP_16	G.....	C.....
LP_17	G.....	C.....
LP_18	G.....	C.....
LP_19	G.....	C.....
LP_20	G.....	C.....