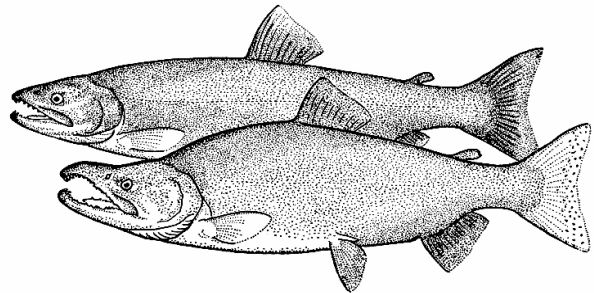


Universidade Federal de Minas Gerais
Departamento de Farmacologia
Pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular

Genética Populacional de Peixes Migratórios

Relatório Técnico de Estágio de Doutorando no Exterior (Bolsa Sanduíche)



Gabriel de Menezes Yazbeck
Processo: 201280/2003-5
País: Canadá
Orientadores externos: Joachim Carolsfeld
R. John Nelson
Chris C. Wood
Orientador brasileiro: Evanguedes Kalapothakis

Belo Horizonte, Minas Gerais
Maio - 2005

Sumário Geral.....	3
1 Introdução.....	4
2 Objetivos	6
3 Material e Métodos	7
3.1 Coleta de amostras	7
3.2 Extração de DNA	8
3.3 PCR e eletroforese.....	8
3.4 Análises estatísticas.....	10
4 Resultados e Discussão	11
4.1 Amplificações	11
4.2 Teste exato de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).....	12
4.3 Número de alelos.....	14
4.4 Diferenciação e estrutura populacional	16
4.5 Distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards e estoques mistos	19
5 Conclusões.....	21
6 Bibliografia.....	22

Sumário Geral

Este relatório é referente às atividades realizadas durante meu estágio de doutorando em Victoria, BC, Canadá, desenvolvidas entre março de 2004 e março de 2005. O intuito principal do projeto foi o de participar diretamente em atividades de pesquisa sobre genética populacional de peixes migratórios canadenses (principalmente salmónídeos), visando um treinamento eficiente para a aplicação prática desses conhecimentos em medidas concretas de manejo e conservação da diversidade genética. As abordagens, técnicas, metodologias e análises utilizadas naquele país poderão ser de grande valia para questões específicas brasileiras.

A contrapartida estrangeira do estágio foi viabilizada pela organização não-governamental *World Fisheries Trust* (WFT), com a orientação executiva/logística geral do Dr. Joachim Carolsfeld. Através da coordenação do WFT, fui alocado no laboratório do Dr. Ben F. Koop (Departamento de Biologia da Universidade de Victoria - *University of Victoria*), onde tem sido desenvolvido, entre outros, o projeto G.R.A.S.P (*Genomic Research in the Atlantic Salmon Project*), um projeto de cooperação internacional entre Japão, Dinamarca e Canadá. Neste laboratório realizei todas minhas atividades sob orientação direta do Dr. R. John Nelson da Universidade de Victoria, com co-orientação do Dr. Chris Wood (*Pacific Biological Station - Department of Fisheries and Oceans*, Nanaimo, BC).

Em virtude de dificuldades na obtenção de um tamanho amostral satisfatório para análise populacional, logo nos primeiros dias de estágio, foi decidida a alteração do projeto relativo à proposta original submetida para apreciação do comitê de Genética do CNPq (*Genetic Analysis of Coastal Sockeye*). Tendo em vista o objetivo central de execução de projetos que proporcionassem treinamento e familiarização efetivos com técnicas de ampla aplicação prática, foi sugerido um novo projeto e a colaboração em outros três:

- Análise genética de estoques utilizados para repovoamentos de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*); projeto principal executado por mim, detalhado neste relatório;

- Distinção genética de alevinos de formas anádromas e formas exclusivas de água doce do salmão vermelho – *sockeye* - (*Oncorhynchus nerka*) através de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) em genes mitocondriais;

- Análise genética de populações de esturjão branco (*Acipenser transmontanus*) isoladas, por meio de RFLP de genes mitocondriais; e

- Estrutura genética populacional do peixe solha-estrelado-do-pacífico – *Starry Flounder* - (*Platichthys stellatus*), inferida através do uso de microsatélites.

A seguir, é apresentado o relatório técnico sobre a execução do projeto principal, no qual fui o principal investigador e que se encontra em fase de preparação para publicação em revista especializada internacional de gerenciamento da pesca. A descrição das atividades dos outros três projetos no qual me envolvi, não estão incluídas neste relatório e poderão ser enviadas ao comitê de Genética mediante solicitação.

As técnicas, abordagens e análises empregadas nesses projetos são de alta relevância e aplicabilidade na questão particular dos peixes migratórios do rio Grande, MG, que se encontram sob um regime de isolamento por barragens hidrelétricas e que sofrem medidas de peixamentos, sem ser levado em conta critérios genético-populacionais.



Belo Horizonte, 19 de maio, 2005

Gabriel de Menezes Yazbeck

Análise genética de estoques procriadores utilizados para repovoamentos de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) na Columbia Britânica, Canadá

1 Introdução

Durante os últimos dez anos, quase 1300 pequenos lagos (<1000ha) sofreram peixamentos de truta-arco-íris (*Oncorhynchus mykiss* - Walbaum, 1792), constituindo uma parte importante do esforço de pesca com linha e anzol na província da Columbia Britânica, Canadá (FFSBC, 2004). Esses lagos devem ser repovoados recorrentemente, ano após ano, por causa das altas taxas de mortalidade que incidem nas populações durante o inverno e/ou por que esses lagos não fornecem ambientes propícios à reprodução, nidificação ou desenvolvimento desses peixes. Essa prática tem como objetivo principal fornecer ampla oportunidade de pesca esportiva e não tem como meta gerar populações auto-suficientes nem substituir os peixes selvagens. Para que esse programa seja bem sucedido, os peixes devem sobreviver até atingirem um tamanho limite para a captura (Allendorf e Ryman, 1987) e devem ter características comportamentais e de história de vida, adequadas a esse sistema de pesca “põe e tira”. Como essas características têm um importante componente genético (*e.g.*: Øverli *et al.*, 2002;) é desejável que as características genético-populacionais de populações utilizadas como estoques de procriação sejam mantidas.

Populações utilizadas em programas de pisciculturas ou de repovoamento devem ser fundadas a partir de um número suficientemente grande de indivíduos (Allendorf e Ryman, 1987) a fim de evitar-se uma redução importante no tamanho efetivo da população (N_e). Populações grandes fundadas a partir de grupos pequenos ou com contribuição desigual de progenitores podem exibir um N_e baixo (Briescoe *et al.*, 1992). Baixos tamanhos efetivos populacionais são provavelmente uma das mais importantes causas da perda de variabilidade genética, em função da deriva genética (Frankham, 1996). A variabilidade genética é a base de grande parte de toda variação biológica. É a variabilidade genética que permite que populações submetidas a mudanças ambientais respondam às pressões ecológicas no sentido contrário à redução populacional e à extinção local. A manutenção da variabilidade intra e interpopulacional deve ser uma meta de todos os programas de conservação e manejo de salmonídeos (Wang *et al.*, 2002).

Um programa de piscicultura bem planejado deve evitar uma grande quantidade de mudança genética associada ao número limitado de procriadores. Entretanto, apenas através de um programa de monitoramento é possível verificar se estas mudanças estão ocorrendo. O monitoramento da variabilidade molecular de marcadores neutros e de características adaptativas, tais como dados morfológicos e/ou de história de vida, são importantes para essa finalidade (Allendorf e Ryman, 1987). No passado, marcadores de isoenzimas foram amplamente aplicados nessa tarefa e se mostraram eficientes na detecção de perda de variabilidade genética em populações de pisciculturas

em comparação a sua população (Ryman e Stahl, 1980). Porém, estes marcadores necessitam, geralmente, da aplicação de uma grande quantidade de loci isoenzimáticos (segundo Allendorf e Ryman, 1987, até 60 loci). Os marcadores nucleares de microssatélites têm a vantagem de serem, em geral, altamente polimórficos e, portanto, permitem a utilização de um menor número de loci gênicos (Kalinowski, 2002). Estes marcadores já foram aplicados com sucesso na determinação da perda de variabilidade genética entre populações selvagens fundadoras e estoques de piscicultura de salmonídeos (Hansen *et al.*, 2000). Os efeitos genéticos da formação de estoques a partir de pisciculturas tem sido documentados em várias espécies de peixes e tem sido demonstrado que mesmo em estoques formados a partir de 100 indivíduos de pisciculturas, quase nenhuma população pode absorver mais de 45% de contribuição desses indivíduos sem sofrer uma queda drástica e potencialmente perigosa da variabilidade genética (Taniguchi, 2003).

McCuster *et al.*, (2000) realizaram um levantamento da variação do DNA mitocondrial (mtDNA) através da área de distribuição geográfica original da truta arco-íris, que vai desde o pacífico leste e costa da Califórnia, até a península Kamchatkam, no leste da Sibéria. Nesse estudo eles reforçam a hipótese que atribui à Califórnia, o centro de origem da espécie, dado que este local apresenta a maior variabilidade de haplótipos mitocondriais e morfológica através das bacias e mesmo dentro de bacias.

A espécie tem sido descrita como sendo formada por até quatro subespécies, *O. m. irideus* (forma costeira) e *O. m. gaidineri* (forma “redband”), ambas encontradas na costa oeste da América do Norte; e *O. m. mykiss* (forma Kamchatkan), do leste da Sibéria e uma quarta possível subespécie no rio Athabasca em Alberta, Canadá (a forma Athabaskan), *O. m. subsp.* (Behnke, 1992). Essa classificação se baseou em diferenças morfológicas e pela análise isoenzimática (Behnke, 1992, Carl *et al.*, 1994). Porém, a classificação em forma “redband” e forma costeira tem sido questionada pela falta de verificação de reciprocidade monofilética entre as duas formas (McCuster *et al.*, 2000). A espécie conta ainda, com formas anádromas (que realizam migração entre o local de nascimento, nos leitos de rios de água doce até o oceano, onde sofrem maturação antes de retornarem aos rios no continente), conhecidas como “steelhead”, e formas residentes (“landlocked”), que vivem exclusivamente em água doce, em rios e lagos.

Os estudos de McCuster *et al.*, (2000), também apontaram locais potenciais de refúgios durante as últimas glaciações do final do pleistoceno (entre 16.000 e 10.000 anos atrás), que teriam servido como fontes regionais de recolonização, quando da retração das geleiras glaciais: o rio Columbia, na costa oeste da América do Norte e rios nas ilhas Rainha Charlotte, ao norte da costa da Columbia Britânica. Isso se baseia na diversidade haplotípica encontrada nessas regiões, ainda que a espécie deva ter persistido também ao longo da costa dos estados de Washington, Oregon e Califórnia, nos Estados Unidos. Esses autores não confirmaram a existência de diferenças nas frequências haplotípicas no mtDNA da forma costeira/Kamchatkan com a forma Athabaskan.

2 Objetivos

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência das práticas de pisciculturas da província da Columbia Britânica, Canadá, na manutenção da variação genética neutra em estoques procriadores (matrizes), através do uso de marcadores de microssatélites, em truta arco-íris (*O. mykiss*), utilizados para a prática de peixamentos. O programa de pisciculturas da província envolve uma retirada regular (*e.g.* três em três anos) de um número limitado de indivíduos procriadores selvagens de três populações fundadoras (geralmente 50 machos e 50 fêmeas em cada população): lago Pennask, lago Tzenzaicut e rio Blackwater. Os peixes são mantidos confinados até a maturação sexual, quando são promovidos cruzamentos. A geração F_1 é então realocada em alguns lagos de procriação. Posteriormente, nesses lagos, uma grande quantidade de peixes F_1 é cruzada e os alevinos F_2 são distribuídos em de centenas de lagos por toda a província (por meio de caminhões tanque e helicópteros), onde se desenvolvem. Nessa prática, há a possibilidade de um erro amostral significativo (deriva genética), associado ao uso de um número limitado de fundadores para a produção de um número grande de peixes. Nós comparamos amostras da geração F_1 usada para procriação com amostras das três populações selvagens originais, usando técnicas moleculares para caracterizar variação molecular genética neutra.

Um objetivo secundário deste trabalho foi determinar a origem genética de uma população de reprodução natural (animais não-marcados) encontrada em um dos lagos de procriação (lago Premier). Os lagos de procriação têm suas saídas e entradas de água isoladas por meio de telas e animais procriadores são removidos por meio de armadilhas, a fim de se evitar a livre reprodução da Truta arco-íris nesses lagos. Ainda que animais F_1 sejam marcados nos lagos de procriação para controle e identificação posterior, um número grande de animais não-marcados é capturado durante as coletas que precedem os peixamentos em outros lagos e tem sido assumido que estes peixes são oriundos da reprodução de animais não-marcados. O desconhecimento da fonte original destes animais não marcados tem sido considerado um problema, pois a inclusão de peixes não-marcados nos grupos procriadores pode significativamente reduzir a eficiência das coletas para formação desses estoques, dependendo de sua origem. No entanto, não está claro se estes animais representam a prole dos peixes de peixamentos recentes (*i.e.* peixes oriundos dos estoques fundadores desejados) ou se são resultado da reprodução de peixes de origem histórica nesses lagos (de origem mista e não desejáveis).

Este estudo se limita em avaliar as práticas de culturas utilizadas exclusivamente para o sistema “põe e tira” de pesca na província da Columbia Britânica, Canadá. Entretanto, os resultados demonstram a utilidade da incorporação do monitoramento genético em programas de pisciculturas, além de uma ampla gama de aplicações em estoques de peixes usados com a intenção da formação de populações de grandes tamanhos efetivos populacionais.

3 Material e Métodos

3.1 Coleta de amostras

Nós focalizamos nosso estudo em três populações selvagens de truta arco-íris e várias populações de lagos de procriação da Columbia Britânica que são regularmente estocados com prole F_1 dessas três populações (Tabela 1). As populações do lago Tzenzaicut, lago Pennask e do rio Blackwater foram selecionados pelo programa provincial de pisciculturas por serem considerados sistemas que possuem populações saudáveis de truta arco-íris com características desejáveis para a pesca esportiva. Essas populações são consideradas como sendo selvagens e, fora a remoção de peixes para a formação de estoques procriadores, não sofreram peixamentos ou impactos ambientais por operações de cultura de peixes.

Tabela 1: Amostras populacionais de truta arco-íris, ano, origem e tamanho amostral (N).

População	Código	Ano de Coleta da amostra	Origem	N
Lago Pennask	Pn/PnL	1999	Selvagem	100
Rio Blackwater	Bl/BlR	1999	Selvagem	48
Blackwater no Lago Genier	Bl/GeL	1999	Estoque de procriação	100
Blackwater no Lago Dragon	Bl/DgL	1999	Estoque de procriação	100
Pennask no Lago Premier (1)	Pn/PrL1	1999	Estoque de procriação	100
Lago Premier 1	Pr/PrL1	1999	Não-marcados	100
Pennask no Lago Beaver	Pn/BeL	1999	Estoque de procriação	100
Tzenzaicut no Lago Dragon	Tz/DgL	1999	Estoque de procriação	95
Escamas - Lago Premier	PrSc	1987	Amostra “histórica”	91
Lago Tzenzaicut	Tz/TzL	1999	Selvagem	95
Pennask no lago Premier Lake 2	Pn/PrL2	2003	Estoque de procriação	48
Lago Premier (2)	Pr/PrL2	2003	Não-marcados	48
TOTAL				1025

O lago Pennask é um sistema de monocultura (não possui outras espécies de peixes) de baixa produtividade. As trutas do lago Pennask forrageiam preferencialmente na coluna d'água (nectônicos) e têm uma dieta preferencial de invertebrados. As trutas do lago Tzenzaicut têm um comportamento de forrageamento similar às do lago Pennask, porém são preferencialmente piscívoras e dividem o lago com outras espécies de peixes. O rio Blackwater é um sistema de tamanho médio, que conta com inúmeras áreas amplas e rasas e com um grande número de espécies de peixes. As trutas desse rio são forrageadoras agressivas e adotam a dieta piscívora em um estágio precoce de seu desenvolvimento. Todas essas populações podem ser diferenciadas com base em padrões de coloração e manchas, bem como através de medidas morfológicas.

Amostras de tecido foram coletadas em um total de 12 amostras populacionais (algumas populações foram amostradas duas vezes, ver Tabela 1). Além das três populações selvagens, foram amostradas quatro populações dos lagos de procriação associados (lago Genier, lago Dragon, lago Beaver e duas coletas no lago Premier – Tabela 1) e as duas amostras populacionais de animais não-marcados do lago Premier. Além disso, foi analisada uma amostra populacional “histórica” do lago Premier a partir de escamas secas de peixes. A Figura 1 ilustra a relação entre as populações selvagens e os lagos de estoques procriadores analisados.

As coletas de tecidos foram realizadas exclusivamente em indivíduos adultos capturados durante as coletas para as pisciculturas de procriação tanto através de redes, como através de linha e anzol. Uma pequena porção de nadadeira foi removida e imediatamente colocada em etanol 95% em tubos individualizados e mantidos assim até a extração de DNA, exceto as amostras históricas.

3.2 Extração de DNA

O DNA de cada indivíduo foi extraído a partir de pequenos pedaços (aproximadamente 250 mm²) de nadadeira (ou escamas secas para a amostra histórica), através do método Chelex-proteinase K. As amostras foram colocadas em placas de 96 poços, cada um com 200µl de tampão contendo 5% de resina chelex, 0,1% de Tween-20. Então eram adicionados 2µl de Proteinase K (10mg/ml) e a placa era levada para um termociclador onde era aquecida a 60°C por 15 minutos e então, a 95°C por 5 minutos. Após esses passos a placa era incubada em freezer -20°C até o dia seguinte. Esse método foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Nelson *et al.*, 1998 e possibilita a extração de um grande número de indivíduos de maneira rápida, direta e relativamente barata. Para a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), eram utilizadas, invariavelmente, diluições de 1/10 desse estoque de DNA.

3.3 PCR e eletroforese

Foram amplificados cinco loci de microssatélites em cada um dos 1025 indivíduos analisados: quatro eram microssatélites de repetições de tetranucleotídeos - OTS 103 (Small *et al.*, 1998), OTS 4

(Banks *et al.*, 1999), OTS 100 (Nelson and Becham, 1999) e 9D2 (Smith *et al.*, 1998) - e um, de repetições de dinucleotídeos - Omy 77 (McConnell *et al.*, 1995). As Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) foram realizadas em placas de 96 poços (microtitier), em um termociclador MJ PTC-100 (MJ Research). As reações de PCR tinham um volume total de 12,5 µl, continham 10 pmol (0,4µM) de cada iniciador (*primer*), 80µM de cada um dos quatro deoxinucleotídeos trifosfatados, 20 mM Tris-HCl pH 8.8; 2mM Mg SO₄, 100mM KCl; 0,1% TritonX-100, 10mM (NH₄)SO₄ e 0,2µl de Taq polimerase *Hot-satart* (Quiagen). Os ciclos de temperaturas foram precedidos por incubação de desnaturação de 15 min a 95°. Os ciclos de amplificação foram 30 segundos a 94°C (desnaturação) 30 segundos a X °C (anelamento – onde X é a temperatura específica de cada par de iniciadores, ver Tabela 2) e 30 segundos a 72°C (extensão), por 30 ciclos, quando então as amostras eram refrigeradas a 4°C.

Os alelos dos microssatélites foram fracionados por tamanho, em géis de poliacrilamida não desnaturantes contendo uma razão de 19:1 de acrilamida para bis-acrilamida. Os géis foram preparados em tampão TAE 2X concentrado (Maniatis *et al.*, 1982) e montados em placas de vidro com 17 cm de largura por 14,5 cm. A Tabela 2 mostra as concentrações dos géis para cada par de iniciadores. Os géis foram colocados em cubas verticais contendo TAE 2X e submetidos a um campo elétrico de 70V por 15 horas. Após a corrida, os géis foram corados com 0.5 µg/ml de brometo de etídeo e fotografados sob luz ultra-violeta em sistema de fotodocumentação digital (Eagle-Eye II). Cada gel incluiu três canaletas com marcadores de 20 pares de base (bp) (GenSura, Laboratórios Inc.) para criar uma grade de tamanho molecular pela qual foram estimados os tamanhos dos alelos de microsatellites amplificados, juntamente com 24 amostras de indivíduos de truta arco-íris e um controle negativo da reação. Vários indivíduos foram analisados mais de uma vez a fim de se ganhar uma estimativa da precisão da tipagem dos alelos por tamanho. As imagens digitais dos géis foram analisadas com o programa Intelligent Quantifier (Millipore Corp.). A partir dos tamanhos das bandas observadas e medidas com o programa de análise de géis, foram criadas classes (*bins*) alélicas, segundo metodologia descrita em Small *et al.*, (1998).

Tabela 2: Temperaturas de anelamento e concentração dos géis de poliacrilamida utilizados para cada par de iniciadores.

Iniciadores (<i>primers</i>)	Temperatura de Anelamento	Concentração do gel
OTS 103	47°C	12%
OTS 100	56°C	8%
OTS 4	63°C	10%
Omy 77	58°C	10%
9D2	52°C	8%

3.4 Análises estatísticas

Desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foram testados para cada população através de teste exato (Guo e Thompson, 1992) com o uso do programa Genepop 3.3 (Raymond e Rousset 1995), sendo os níveis de significância estatística ajustados através de uma correção sequencial de Bonferroni ($\alpha/\text{número de loci} = 0.01$) (Rice, 1989). Para avaliar-se a eficiência da manutenção da variabilidade molecular neutra nos estoques de procriação foi calculada a divergência genética entre pares de populações, utilizando-se valores de F_{st} par-a-par, através do estimador de Weir e Cockerham (1984). A significância destes valores foi testada por meio de procedimentos de permutação utilizando-se o programa Arlequin versão 2.000 (Schneider *et al.*, 1997). F_{st} é uma medida da variação distribuída entre populações, que reflete o grau de estruturação genética populacional. Complementarmente a essa análise realizamos um teste de diferenciação de frequências genotípicas entre pares de populações no Genepop. Através do programa Arlequin, também realizamos uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA – Excoffier *et al.*, 1992), formando grupos de populações entre estoques selvagens e estoques de procriação associados. Foi calculada a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards (1967) a fim de se construir uma árvore de similaridade, pelo método de *Neighbour Joining*, através do consenso de 100 réplicas *bootstrap*, utilizando-se programas do pacote Phylip (Felsenstein, 1989). A árvore resultante foi visualizada por meio do programa TreeView (Page, 1996).

Para se ter uma medida de variabilidade intrapopulacional, o número de alelos (riqueza alélica) encontrado nas populações selvagens e de procriação foram calculados por meio de um estimador *jackknife* (reamostrando-se indivíduos), de forma que um intervalo de confiança de 95% pudesse ser construído e plotado em um gráfico. Isso permite a comparação visual, com confiabilidade estatística, das riquezas alélicas. Para isto, nós empregamos o programa EstimateS (Cowell, 2000), com modificações. Na avaliação da origem da população não-marcada do lago Premier, utilizamos o programa GMA (Genetic Mixture Analysis) de análise de estoques mistos – Kalinowski, (2003).

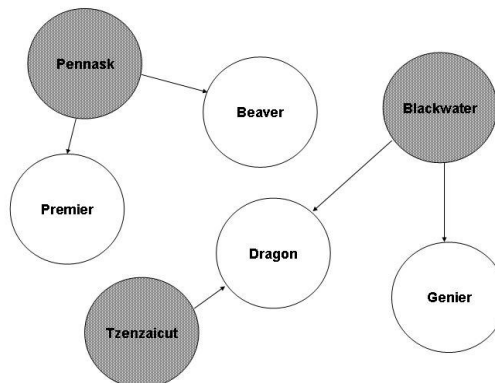


Figura 1: Diagrama esquemático ilustrando a relação das populações selvagens (em cinza) e os lagos de estoques procriadores (em branco).

4 Resultados e Discussão

4.1 Amplificações

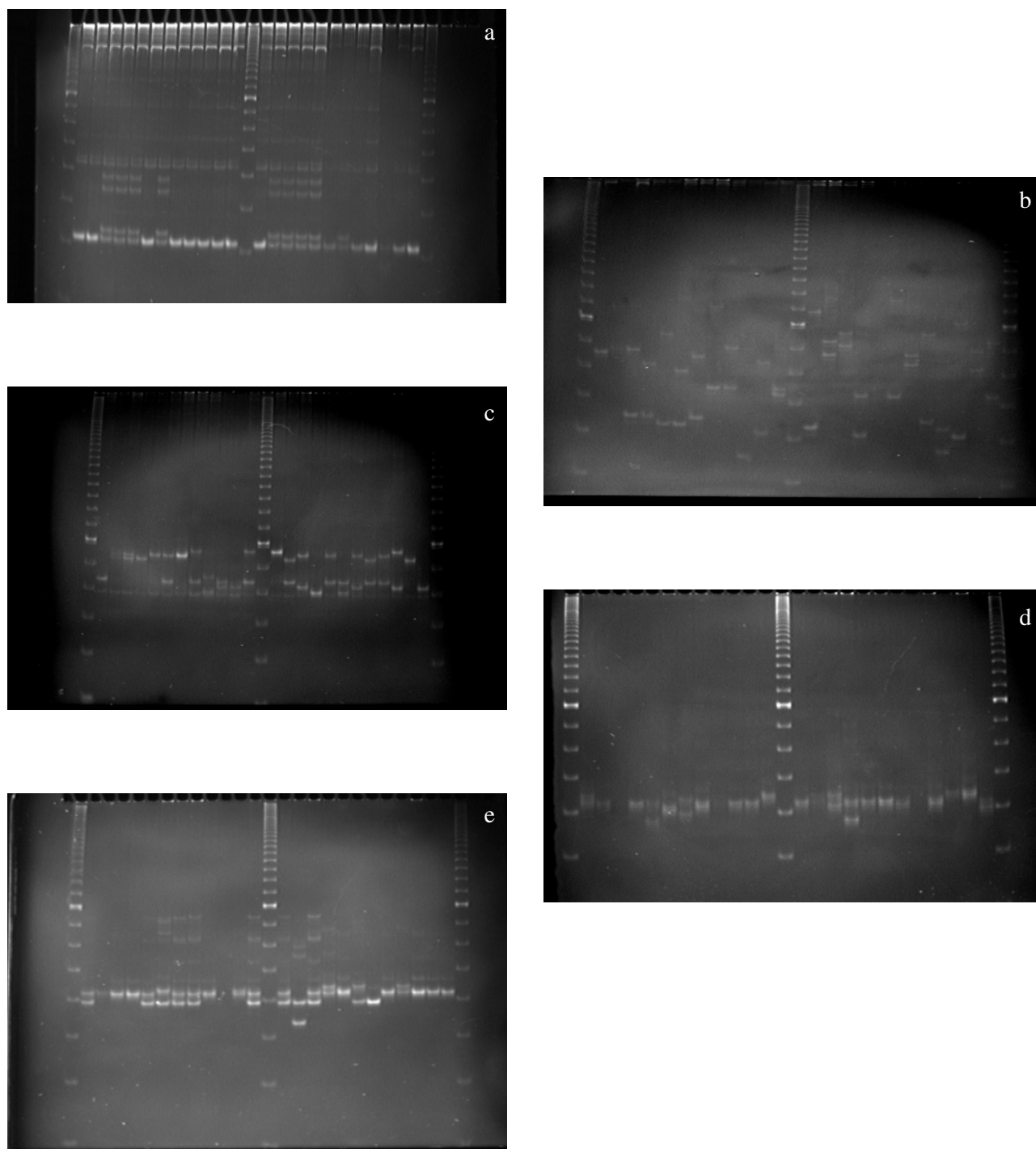


Figura 2: Exemplos de perfis de amplificação de cada um dos cinco loci de microssatélites analisados: a) OTS 013, b) 9D2, c) OTS 100, d) Omy 77 e e) OTS 4. A banda forte nas canaletas dos extremos e do centro (ladder - marcadores de tamanho de fragmento com intervalos de 20pb) equivale a 200pb.

A Figura 2 mostra exemplos de ampliações dos loci de microssatélites utilizados nesse estudo populacional. Todos iniciadores revelaram loci polimórficos em todas amostras populacionais analisadas. O locus com o menor número de alelos encontrado foi OTS 4, sendo observados apenas cinco alelos diferentes dentre os 1025 indivíduos analisados. O locus com o maior número de alelos foi 9D2, com 29 alelos observados. A média observada de número de alelos por locus foi 12 ($dp \pm 9,87$). O desvio padrão evidencia a grande variabilidade interlocus no número de alelos, o que indica a importância de se analisar múltiplos loci ao mesmo tempo, para melhores estimativas da variabilidade genética populacional. Os fragmentos amplificados ficaram entre cerca de 220pb e 80pb.

Steven Kalinowski, no entanto, discutiu detalhadamente em dois artigos (Kalinowski, 2002 e Kalinowski 2004) a influência do número de marcadores e do número de alelos por marcador, nas estimativas de quatro medidas de distância e diferenciação genética muito utilizadas, entre elas, duas aplicadas em nosso estudo, os estimadores de estatística F desenvolvidos por Weir e Cockerham (1984) e a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards (1967), além de medidas de análise de estoques mistos (também aplicadas aqui). As conclusões daquele autor, que se valeu de simulações em computadores para realizar uma avaliação analítica dos coeficientes de variação e dos erros quadráticos esperados, demonstram que o fator preponderante na precisão e verossimilhança das estimativas é o número independente de alelos analisados, que é medido pelo somatório do número total de alelos em cada locus analisado, menos 1. Isso significa que, em regra geral, 12 loci com 2 alelos cada um têm, em média, o mesmo coeficiente de variação que dois loci com 12 alelos cada. Fatores como a adição de loci só se tornam importantes quando a diferenciação genética entre as populações é realmente pequena. Este trabalho conta com 59 alelos independentes segregando em 5 loci, e, baseado nos estudos de Kalinowski, consideramos esse número apropriado para a detecção da variabilidade genética das populações estudadas. Mais a frente é feita uma comparação do número absoluto de alelos observados e do número de alelos estimados por meio de procedimento *jackknife* de reamostragem.

4.2 Teste exato de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW)

A Tabela 2 mostra os resultados para o teste de desvios das frequências alélicas do EHW. Dois dos loci testados mostraram um grande número de populações fora do EHW. No locus Omy 77, oito das 12 amostras populacionais desviaram do equilíbrio ($p < 0,01$; $\alpha = 0,05/N_{\text{loci}}$). No locus OTS 4, 11 de 12 amostras também não estavam em EHW. Os loci OTS 103 e 9D2 tiveram o maior número de populações seguindo o EHW (11 e nove respectivamente). A população selvagem do rio Blackwater (BI/BIR) foi a única amostra populacional que exibiu EHW consistentemente, entre todos os cinco loci analisados ($p = 0,36$). Na população de procriação oriunda de Blackwater no lago Genier (BI/GeL), apenas o locus OTS 4 desviou do EHW ($p < 0,01$), sugerindo a ausência de diferenciação importante

entre este par de estoques selvagem e estoque de procriação associado. O locus mais polimórfico – 9D2 – desviou do EHW em apenas três das 12 amostras (Pr/PrL1, Pr/PrL2 e Pn/PrL2). A primeira amostra dos animais não-marcados capturados no lago Premier (Pr/PrL1) foi a única amostra populacional com apenas 1 locus sob EHW, seguido pela segunda amostra de animais não-marcados desse lago (Pr/PrL2) e pela população selvagem do lago Pennask (Pn/PnL), cada uma com apenas dois loci sob EHW. De 60 comparações possíveis locus vs populações, 35 seguiam o EHW.

Tabela 2: Valores exatos de probabilidade de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Valores em negrito são não-significativos a 1% de probabilidade ($0,05/N_{\text{loci}}$), i.e., indicam que não houve desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW).

População	9D2	Omy77	OTS100	OTS103	OTS4	Todos os loci
Pn/PnL	0,086	0,000	0,723	0,003	0,000	0,000
Bl/BIR	0,693	0,072	0,290	1	0,286	0,361
Bl/GeL	0,498	0,060	0,336	1	0,000	0,002
Bl/DgL	0,795	0,000	0,832	1	0,000	0,000
Pn/PrL1	0,038	0,000	0,002	0,718	0,000	0,000
Pr/PrL1	0,001	0,000	0,038	0,000	0,000	0,000
Pn/BeL	0,626	0,003	0,570	0,293	0,000	0,000
Pn/PrL2	0,000	0,052	0,111	0,665	0,000	0,000
Pr/PrL2	0,000	0,000	0,119	0,422	0,000	0,000
PrSc	0,575	0,000	0,031	0,327	0,000	0,000
Tz/DgL	0,044	0,000	0,324	0,106	0,000	0,000
Tz/TzL	0,653	0,057	0,562	1	0,000	0,000

Os resultados dos testes exatos mostram que as duas amostragens dos animais não-marcados (Pr/PrL1 e Pr/PrL2) do lago Premier constituem a população com maior número de loci fora do EHW. Esse lago começou a sofrer introdução dos animais capturados no lago Pennask em 1990 (FFSBC, 2004). Na amostra histórica, pré-programa de procriação, apenas dois loci estavam fora do EHW. Essa é uma evidência que pode apontar para uma natureza mista do atual estoque não-marcado (estoque residente não-marcado com o estoque de procriação marcado neste lago).

O fato da população selvagem do rio Blackwater indicar que todos os loci analisados estão seguindo as frequências esperadas sob EHW indica que esta população se encontra livre de processos microevolutivos nos loci analisados (migração, seleção, acasalamentos não-casuais e, principalmente, deriva genética), ou que dois ou mais destes processos estão atuando de forma a anularem-se mutuamente (*e.g.* equilíbrio migração/deriva, seleção/migração). O não desvio do EHW deve indicar que essa população tem um grande tamanho efetivo populacional (N_e) e, portanto, constitui uma população indicada para a prática de formação de estoques procriadores. O baixo número de desvios (dois loci) nos estoques de procriação associados à essa população (Bl/GeL e Bl/DgL) corroboram essa hipótese.

4.3 Número de alelos

A riqueza alélica foi estimada através do método de reamostragem estatística *jackknife*. Através destes valores e de seus erros padrão associados, foram calculados intervalos de confiança de 95%. Os gráficos resultantes podem ser visualizados na Figura 3. Pares de populações onde um dos limites de confiança sobrepõe-se com o valor estimado de riqueza alélica da outra, indicam ausência de diferença estatística. Loci mais polimórficos, também tiveram estimativas mais variáveis de riqueza alélica entre populações. No locus 9D2, o grupo Blackwater (BI/BIR, BI/GeL e BI/DgL), o grupo Tzenzaicut (Tz/TzL e Tz/DgL) e o grupo Premier (amostras não-marcadas) mostraram o mesmo número de alelos. A mesma tendência foi encontrada para o grupo Tzenzaicut no locus Omy 77. Em alguns casos, a população selvagem fonte pode exibir um número menor de alelos do que as populações procriadoras associadas, como no grupo Pennask (Pn/PnL, Pn/BeL, Pn/PrL1 e Pn/PrL2) no locus 9D2, o grupo Blackwater nos loci Omy 77 e OTS 100 e o grupo Tzenzaicut nos loci OTS 4 e OTS 103. E, finalmente, em alguns casos, a população selvagem originária tem mais alelos do que as populações procriadoras relacionadas (como o par do grupo Tzenzaicut no locus OTS 100).

O estimador *jackknife* de riqueza alélica nos permite distinguir os efeitos de alelos raros na amostra. Suas estimativas são amplamente afetadas por *outliers* (observações discrepantes em relação ao restante dos dados), portanto o estimador é útil para incorporar a importância de alelos raros e/ou alelos privados no resultado da estimativa. Na prática, ele pode sugerir a existência de alelos não amostrados em uma população. Por exemplo, no locus 9D2, a população de peixes de Pennask no lago Beaver (Pn/BeL) exibe 26 alelos distintos (veja Tabela 3). Porém, como nesse locus há muitos alelos em baixa frequência, a estimativa *jackknife* aponta para a existência de 32 alelos (Figura 3) nessa mesma população, ou seja, seis a mais do que o número de alelos observado. A raridade de alelos também influencia a amplitude do erro padrão e, portanto, dos intervalos de confiança.

Grupos de populações selvagens e de procriação podem ter: i) o mesmo número de alelos (e.g. grupos Blackwater, Tzenzaicut e Premier no locus 9D2 e Tzenzaicut no locus Omy77); ii) as fontes selvagens exibindo um número menor de alelos do que os estoques de procriação associados (grupo Pennask no locus 9D2; grupo Blackwater nos loci Omy 77 e OTS 100; grupo Tzenzaicut nos loci OTS 4 e OTS 103) ou, iii) menos frequentemente, a fonte selvagem pode possuir um número maior de alelos do que os estoques procriadores (grupo Tzenzaicut no locus OTS 100). No primeiro caso, ou as populações utilizadas para a fundação dos estoques procriadores foram representativas da variabilidade genética selvagem, ou as populações residentes nos lagos de procriação possuíam alelos complementares para a riqueza alélica, uma vez que sub-amostras de loci mais polimórficos nem sempre cobrem a diversidade alélica original. No segundo cenário, a população selvagem poderia ter um número de alelos inferior à população residente do lago de procriação, em função de possíveis eventos de introgressão de alelos novos ou privados, quando da mistura de estoques (introduzidos e residentes). No último caso, uma amostragem não representativa da população selvagem, ou efeitos de

deriva genética posteriores aos eventos de peixamentos poderiam levar aos estoques procriadores a terem uma diversidade alélica inferior às populações selvagens fundadoras.

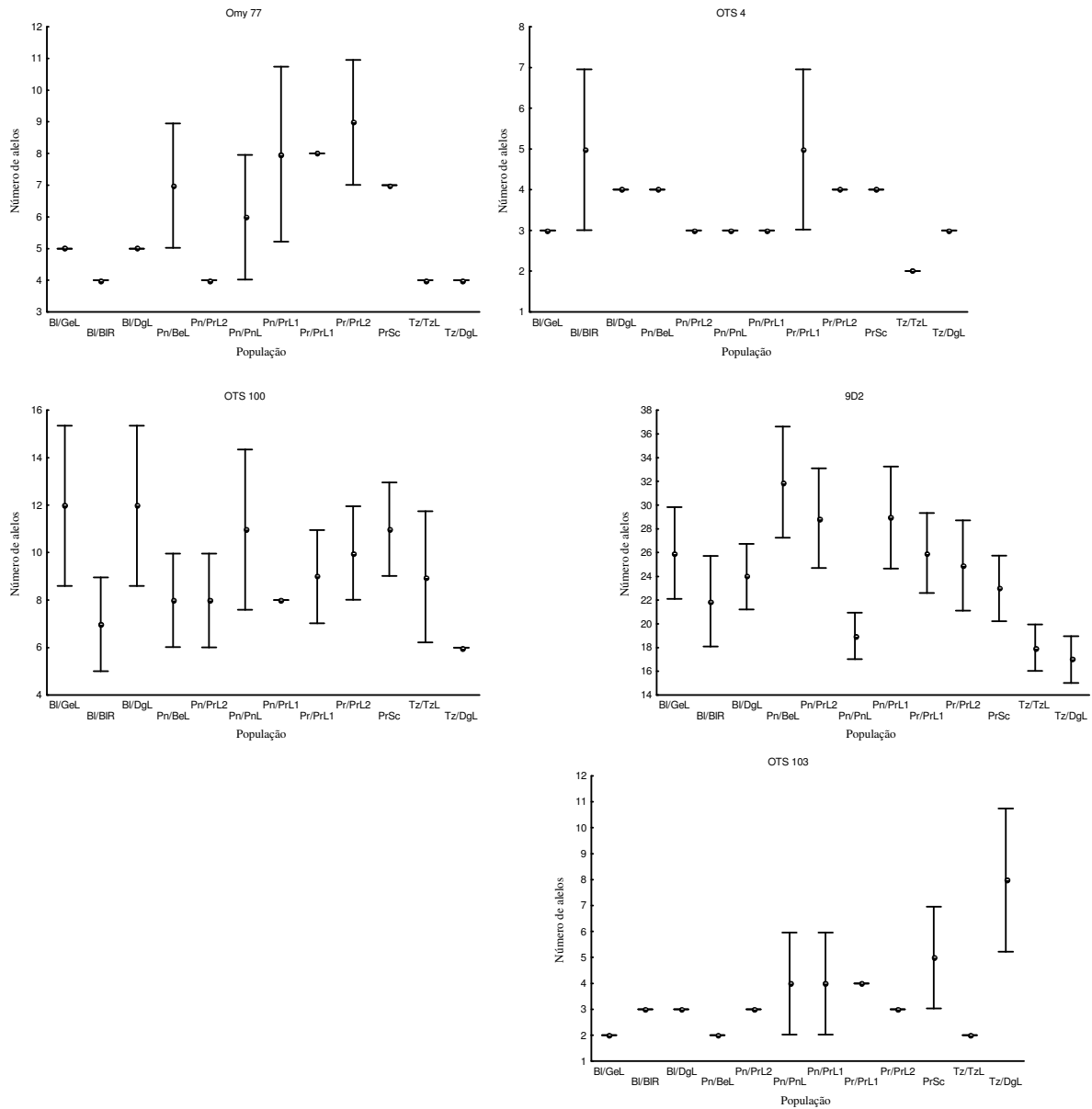


Figure 3: Comparações entre o número de alelos (riqueza alélica) em cada locus. As barras verticais representam intervalos de confiança (95%).

Tabela 3: Número de alelos observados em cada locus para todas amostras populacionais (riqueza alélica absoluta)

População	9D2	Omy77	Ots100	Ots103	Ots4
Pn/PnL	18	5	8	3	3
Bl/BlR	18	4	6	3	4
Bl/GeL	22	5	10	2	3
Bl/DgL	22	5	9	3	4
Pn/PrL1	24	6	8	3	3
Pr/PrL1	23	8	8	4	4
Pn/BeL	26	6	7	2	4
Tz/DgL	16	4	6	6	3
PrSc	21	7	10	4	4
Tz/TzL	17	4	7	2	2
Pn/PrL2	24	4	7	3	3
Pr/PrL2	20	8	9	3	4
Total	29	8	12	6	5

4.4 Diferenciação e estrutura populacional

Foi observada diferenciação genética significativa, medida através de F_{ST} ($p < 0.01$) entre a maioria dos pares de populações, incluindo lagos de procriação e suas populações de origem (Tabela 4). Esses valores foram considerados iguais a zero (ausência de estrutura) entre a população selvagem do lago Pennask (Pn/PnL) e seu estoque procriador no lago Beaver (Pn/BeL) - $p = 0,124$ – entre aquela e a primeira amostra de procriadores de Pennask no lago Premier (Pn/PrL1) - $p = 0,664$; e entre as duas últimas entre si (Pn/BeL vs Pn/PrL1 - $p = 0,15$). O par da população do rio Blackwater (Bl/BlR) e seu estoque procriador no lago Genier (Bl/GeL), também teve seu valor de F_{ST} não-significativo ($p = 0.022$). Esses resultados mostram que, inicialmente, o programa provincial consegue manter as características genético-populacionais da população selvagem. Porém, na maioria dos casos, os estoques procriadores exibem, desde uma pequena diferenciação genética com sua população originária (2,8% entre a população selvagem do rio Blackwater – Bl/BlR - e o estoque procriador de Blackwater no lago Dragon – Bl/DgL) até um valor moderado, entre a população selvagem de Pennask (Pn/PnL) e a segunda amostra populacional do seu estoque procriador no lago Premier (Pn/PrL2), de 10,3%. Este último resultado mostra que com o passar do tempo é de se esperar que haja uma diferenciação da população original. Essa divergência pode ser devida à forte deriva genética causada pela limitação dos tamanhos efetivos populacionais na formação do estoque procriador e/ou em função da mistura do estoque marcado de Pennask no lago Premier com peixes não-macados.

No entanto, de forma geral, os valores de F_{ST} entre pares de populações formados por estoques procriadores e suas fontes selvagens foram consideravelmente mais baixos do que de pares não relacionados. Valores significativos de F_{ST} entre pares variaram de 0,028 (Bl/BlR vs Bl/Bl/DgL) até 0,161 (Tz/TzL vs Pr/PrL2). A amostra histórica de escamas coletadas em 1987 (PrSc) e a primeira

amostragem de peixes não-marcados (Pr/PrL1), mostraram uma baixa diferenciação genética (1,2%). Porém, tanto a amostra histórica, quanto a segunda amostragem de peixes não-marcados do lago Premie (Pr/PrL2) se mostraram mais diferenciadas da primeira amostra de peixes não-marcados (Pr/PrL1) – 2,3% e 4,9% respectivamente). A distância das duas amostras de peixes não-marcados do lago Premier e das duas amostras de peixes de Pennask no lago Premier sugere que os animais não-marcados do lago Premier, têm origem distinta dos estoques de procriação de Pennask naquele lago. Porém a aparente convergência dos animais não-marcados de 2003 (Pr/PrL2) e dos animais marcados coletados no mesmo ano nesse lago (Pn/PrL2), parece implicar em uma mistura dos estoques marcados e não-marcados dos peixes co-habitando o mesmo lago.

Como esses estimadores são acurados em amostras exibindo EHW, nós testamos a diferenciação de frequências genotípicas entre pares de populações, para confirmar os resultados encontrados. Esse teste não depende de pressupostos de EHW nas amostras e foi também realizado para cada locus separadamente. Todos pares de populações exibiram diferenciação sobre a combinação de todos o loci, exceto entre os dois estoques de procriação oriundos do lago Pennask (Pn/PrL1 e Pn/BeL, $p=0,11$) e entre Pn/PrL1 e a população selvagem fonte (Pn/PnL) – $p=0,54$. Porém, quando analisados locus por locus, vários pares de estoques procriadores e suas populações originárias mostram uma não diferenciação genotípica. Por exemplo, o locus mais polimórfico, 9D2 (portanto, aquele que possui o maior número de classes genotípicas) aponta para uma conservação (não-diferenciação) das frequências genotípicas entre os seguintes pares: Bl/DgL vs. Bl/GeL ($p=0,048$); Pn/PrL1 vs. Pn/PnL ($p=0,30$); Pn/BeL vs. Pn/PrL1 ($p=0,68$); Pn/PrL2 vs. Pn/BeL ($p=0,26$); Pr/PrL2 vs. Pn/PrL2 ($p=0,21$) e PrSc vs. Pr/PrL1 ($p=0,13$). Estes resultados não só apontam para as mesmas conclusões alcançadas com os valores de F_{ST} entre pares de populações, mas também confirmam as semelhanças entre os peixes não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2) e os animais marcados de Pennask nos lagos Beaver (Pn/BeL) e Premier (Pn/PrL2).

Uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada sobre as diferenças entre pares de populações, organizando-se populações selvagens e de estoques de procriação relacionados em grupos (Tabela 5). A análise indica que 9,78% da variação genética total está alocada entre populações (F_{ST} geral). Esse valor tem alta significância estatística ($p<0,0001$) e é considerado moderado pelos critérios sugeridos por Wright. Ele indica que a grande maioria da variabilidade é devida a diferenças de indivíduos dentro de populações. Dessa variação entre populações, 6,94% da variação é devida a diferenças entre grupos de populações e apenas 2,84% é devida a diferenças entre populações dentro de grupos. Esse resultado corrobora a existência de uma maior similaridade genética entre populações selvagens e os estoques procriadores originados destas. Isso indica que ainda que esteja havendo uma pequena diferenciação genética nos estoques procriadores, eles ainda mantêm grande parte das características genético-populacionais das populações selvagens.

Tabela 4: Valores de F_{st} entre pares de populações. Valores em negrito são não significativos a 5% de probabilidade e indicam ausência de estruturação entre o par de populações

	Pn/PnL	Bl/BlR	Bl/GeL	Bl/DgL	Pn/PrL1	Pr/PrL1	Pn/BeL	Tz/DgL	PrSc	Tz/TzL	Pn/PrL2	Pr/PrL2
Pn/PnL	-											
Bl/BlR	0.128	-										
Bl/GeL	0.115	0.009^{ns}	-									
Bl/DgL	0.119	0.028	0.010	-								
Pn/PrL1	0.004^{ns}	0.128	0.107	0.107	-							
Pr/PrL1	0.095	0.093	0.069	0.043	0.075	-						
Pn/BeL	0.003^{ns}	0.099	0.085	0.085	0.003^{ns}	0.060	-					
Tz/DgL	0.155	0.084	0.094	0.110	0.156	0.135	0.129	-				
PrSc	0.085	0.074	0.059	0.033	0.071	0.012	0.053	0.117	-			
Tz/TzL	0.139	0.088	0.073	0.097	0.128	0.113	0.106	0.056	0.102	-		
Pn/PrL2	0.103	0.114	0.098	0.074	0.103	0.103	0.082	0.178	0.073	0.211	-	
Pr/PrL2	0.105	0.088	0.068	0.034	0.092	0.049	0.073	0.154	0.023	0.161	0.019	-

Tabela 5: Análise de Variância Molecular – AMOVA. Todas estimativas são altamente significativas. Os grupos de populações foram definidos da seguinte forma: Pennask (Pn/PnL, Pn/BeL, Pn/PrL1 e Pn/PrL2); Blackwater – (Bl/BlR, Bl/GrL e Bl/DgL); Tzenzaicut – (Tz/TzL e Tz/DgL) e Premier (PrS, Pr/PrL1, e Pr/PrL2).

Fonte de variação	g.l.	Soma de quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre grupos	3	201,12	0,1138	6,94
Entre populações dentro de grupos	8	72,97	0,0465	2,84
Dentro de populações	2030	3001,72	1,48234	90,22
Total	2041	2375,81	1,63	

$F_{ST}: 0,0978 \quad p < 0,0001$

4.5 Distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards e estoques mistos

Uma árvore de similaridade foi construída a partir da distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards (1967), por meio de metodologia de *neighbour joining*. A árvore resultante obteve um bom suporte estatístico (todos valores *bootstrap* acima de 60%) e pode ser visualizada na Figura 3. A árvore claramente reflete os arranjos esperados de grupos de populações selvagens fonte e estoques de procriação associados. A única exceção é a última amostragem de peixes não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2), que se encontra entre os ramos que formam os grupos Pennask e Premier. Isso parece apoiar a hipótese de que os peixes residentes no lago devem estar se misturando com os peixes marcados oriundos de Pennask no lago Premier.

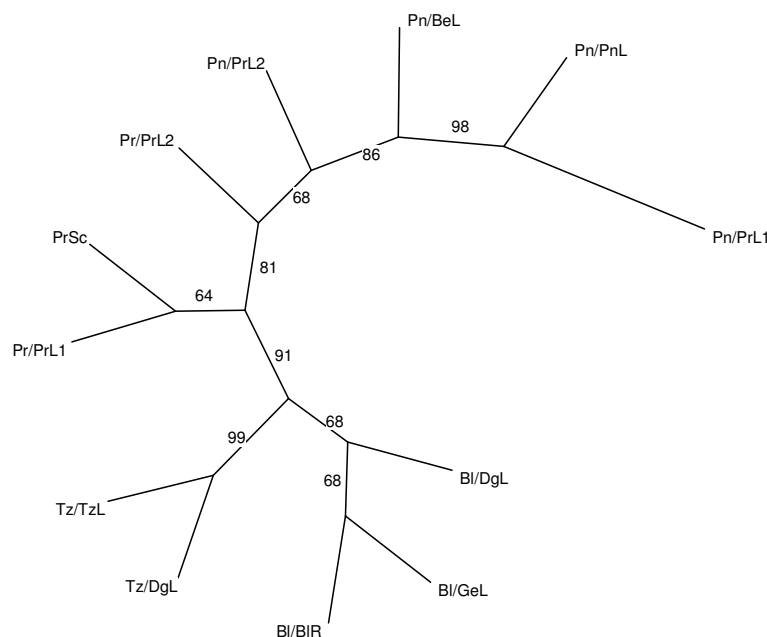


Figura 3: Árvore *neighbour joining* de similaridade utilizando-se a distância de corda de Cavalli-Sforza e Edwards.

Para confirmar essa hipótese realizamos uma análise genética de estoques mistos com o programa GMA (Kalinowski, 2003). Nesse programa utilizamos as populações do grupo Pennask e do grupo Premier (as amostras históricas e a primeira amostragem de animais não-marcados – Pr/PrL1) como base de referência e a população mais recente de animais não-marcados do lago Premier (Pr/PrL2) como sendo o suposto estoque misto. Foram feitas análises de estimativa de proporções de populações contribuindo para a formação do estoque misto, segundo procedimento descrito em Ranalla e Moutain, (1997), onde os indivíduos do suposto estoque misto (Pr/PrL2) são verificados quanto às chances de origem a partir das populações de referência. A análise de mistura atribuiu aos animais não-marcados coletados recentemente no lago Premier (Pr/PrL2) uma composição de quase 46% dos indivíduos como tendo origem a partir da amostra histórica do lago Premier (PrSc), quase 40% de indivíduos recentes marcados de Pennask no lago Premier (Pn/PrL2) e cerca de 15% de animais oriundos da população de Pennask no lago Beaver (Pn/BeL). É interessante notar que em anos recentes, anteriores à segunda amostragem do lago Premier, o lago sofreu peixamento com animais de Pennask no lago Beaver, devido a uma baixa populacional temporária da população selvagem de Pennask (Pn/PnL). Essa mesma análise foi realizada com os primeiros animais não-marcados de Premier (Pr/PrL1) sendo considerado o estoque misto, e os resultados apontam para uma constituição quase que exclusiva (98,5%) de origem da amostra histórica deste lago (PrSc).

Esses resultados parecem confirmar as suspeitas de que os animais não-marcados do lago Premier estão sofrendo introgressão a partir dos animais marcados de Pennask neste lago. Os peixes não-marcados parecem ter uma origem distinta dos animais marcados, porém recentemente, estão se tornando mais semelhantes aos animais marcados usados para os peixamentos em outros lagos. Com essa conclusão, podemos afirmar que os animais não-marcados podem ser usados nas práticas de peixamento, se for tolerado uma certa quantidade de divergência dos estoques de procriação. A tendência é a de que os animais não-marcados se tornem cada vez mais próximos dos animais de Pennask, se não houver um esforço no sentido de impedir a mistura dos estoques.

5 Conclusões

As análises genético-populacionais realizadas em estoques do sistema provincial de procriação e peixamentos de truta arco-íris na Columbia Britânica, Canadá, nos permite alcançar as seguintes conclusões:

- Os estoques de truta-arco-íris analisados mostram um grau de divergência moderado (quase 10%) no total, sendo que desta variação, menos de 3% é devido às diferenças entre populações dentro de um mesmo grupo.
- O esquema de lagos de procriação pode, até certo ponto, manter as características genético-populacionais das populações selvagens, porém quase sempre são observadas pequenas diferenciações genéticas. Essas pequenas divergências observadas entre estoques procriadores e populações selvagens associadas devem ser devidas, principalmente, a efeitos de deriva genética, associados ao número de indivíduos contribuindo para a formação dos estoques procriadores.
- A população selvagem do rio Blackwater se mostrou uma fonte apropriada para a formação de estoques procriadores devido à constatação da existência de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) em todos seus loci e devido aos mais baixos valores de diferenciação dos estoques procriadores associados. A população selvagem de Pennask, apesar de não exibir EHW na combinação dos loci analisados, obteve, inicialmente, os mais bem sucedidos resultados com estoques procriadores (ausência completa de diferenciação genética em relação a alguns estoques procriadores associados).
- Populações fundadoras de estoques procriadores podem exibir: i) mais alelos (perda de diversidade por deriva), ou ii) o mesmo número de alelos (representatividade amostral ou complementaridade de riqueza alélica), ou um número menor de alelos (mistura de populações/efeitos de introgressão), do que os estoques fundados.
- Os peixes não-marcados do lago Premier parecem ter uma origem distinta dos estoques de Pennask cultivados naquele lago. Porém, a última amostragem dos animais não-marcados aponta para uma mistura populacional dos peixes residentes do lago Premier, com peixes marcados oriundos de Pennask no lago Premier.
- Os animais não-marcados do lago Premier devem apenas ser utilizados na composição de estoques de peixamento, se um certo grau de divergência do estoque de Pennask criado no lago Premier for tolerado.

6 Bibliografia

- Allendorf, E W., and N. Ryman. 1987. Genetic management of hatchery stocks: 141- 159 in N. Ryman and F. Utter, eds., University of Washington Press, Seattle and London
- Banks, M.A., M.S. Blouin, B.A. Baldwin, V.K. Rashbrook, H.A. Fitzgerald, S.M. Blankenship, and D. Hedgecock. (1999) Isolation and inheritance of novel microsatellites in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *J. Hered.* 90:281- 288.
- Behnke RJ (1992) *Native Trout of Western North America*. American Fisheries Society Monograph 6. American Fisheries Society, Bethesda. 384
- Briscoe, D.A., Malpica, J.M., Robertson, A., Smith, G.J., Frankham, R., Banks, R.G. e Barker, J.S.F. (1992) Rapid loss of genetic variation in large captive populations of *Drosophila* flies: implications for the genetic management of captive populations. *Conservation Biology* 6: 416-425
- Carl L.M., Hunt C., e Ihssen P.E. (1994) Rainbow trout of the Athabasca River, Alberta: a unique population. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123: 129–140.
- Cavalli-Sforza, L.L. e Edwards, A.W.F. (1967). Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am. J. Hum. Gen.* 19: 233-257.
- Colwell, R. K. 2000. EstimateS: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 6 Beta. User's Guide and application published at: <http://purl.oclc.org/estimates>
- Excoffier, L.; Smouse, P. E. e Quattro, J. M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131, 479-491
- Felsenstein, J. (1989) . PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5: 164-166
- FFSBC – Freshwater Fisheries Society of British Columbia (2004) *Rainbow trout strains currently stocked in BC waters*. FFSBC, Victoria, 18p
- Frankham, R. (1996) Relationship of genetic variation to populations size in wildlife. *Conservation Biology* 10: 1500-1508
- Guo, S.W. e Thompson, E.A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48(2): 361-372
- Kalinowski, S.T. (2002) How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? *Heredity* 88: 62-65

- Kalinowski, S.T. 2003. Genetic Mixture Analysis 1.0. Department of Ecology, Montana State University, Bozeman MT 59717. Available for download from <http://www.montana.edu/kalinowski>
- Kalinowski, S.T. (2004) Genetic polymorphism and mixed-stock fisheries analysis. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 61: 1075–1082
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. e Sambrook, J. (1982). *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- McConnell, S., L. Hamilton, D. Morris, D. Cook, D. Paquet, P. Bentzen, and J. Wright. (1995) Isolation of salmonid microsatellite loci and their application to the population genetics of Canadian east coast stocks of Atlantic salmon, *Aquaculture* 13:19-30.
- Nelson, R.J. e Beacham, T.D. (1999). Isolation and cross species amplification of microsatellite loci useful for study of Pacific salmon. *Animal Genetics* 33: 228-229
- Nelson, R.J., Beacham, T.D. e Small, P.M. (1998) Microsatellite analysis of the population structure of a Vancouver Island sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) stock complex using non-denaturing gel electrophoresis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 7: 312-319
- Øverli Ø., Pottinger T.G., Carrick T.R., Øverli E., Winberg, S., (2002) Differences in behaviour between rainbow trout selected for high- and low-stress responsiveness. *J. Exp. Biol.* 205: 391-395.
- Page, R.D. (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Comput Appl Biosci.* 12(4): 357-8.
- Raymond, M.L. e Rousset, F. (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49: 1280-1283
- Rice, W.R., (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*. 43: 223-225
- Ryman, N. e Stahl, G., (1980) Genetic changes in hatchery stocks of brown trout (*Salmo trutta*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquaculture Sciences* 37: 82-87
- Small, M.P., T.D. Beacham, R.E. Withler, e R.J. Nelson. (1998) Discriminating coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) populations within the Fraser River, British Columbia. *Mol. Ecol.* 7: 141-155.
- Smith C. T., B. F. Koop, and R. J. Nelson. (1998) Isolation and characterization of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) microsatellites and their use in other salmonids. *Mol. Ecol.* 7: 1614-1616.
- Taniguchi, N. (2003) Genetic factors in broodstock management for seed production. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 13: 177-185
- Wang, S., Hard, J.J. e Utter, F. (2002) Genetic variation and fitness in salmonids. *Conservation Genetics* 3(3): 331-333
- Weir, B.S. e Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370