

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CAMPUS ARAPIRACA
UNIDADE DE ENSINO PENEDO
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA

Edmara Ramos Melo

Caracterização da Variabilidade Genética de Tambaqui (*Colossoma macropomum* - Cuvier, 1818) usados na Piscicultura no Baixo São Francisco, utilizando a região ATPase do DNA mitocondrial.

Penedo - AL
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS - UFAL
CAMPUS ARAPIRACA
UNIDADE DE ENSINO PENEDO
CURSO DE BACHARELADO EM ENGENHARIA DE PESCA

Edmara Ramos Melo

Caracterização da Variabilidade Genética de Tambaqui (*Colossoma macropomum* - Cuvier, 1818) usados na Piscicultura no Baixo São Francisco, utilizando a região ATPase do DNA mitocondrial.

Penedo - AL
2015

Edmara Ramos Melo

Caracterização da Variabilidade Genética de Tambaqui (*Colossoma macropomum* - Cuvier, 1818) usados na Piscicultura no Baixo São Francisco, utilizando a região ATPase do DNA mitocondrial.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Unidade de Ensino Penedo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Themis de Jesus Silva

Penedo – AL

2015

Folha de aprovação
Edmara Ramos Melo

Caracterização da Variabilidade Genética de Tambaqui (*Colossoma macropomum* - Cuvier, 1818) usados na Piscicultura no Baixo São Francisco, utilizando a região ATPase do DNA mitocondrial.

Trabalho de conclusão de curso, apresentado como exigência parcial para obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Pesca, da Universidade Federal de Alagoas, Campus Arapiraca, Unidade de Ensino Penedo e aprovada em 24 de fevereiro de 2015.



Prof^a. Dr^a Themis de Jesus Silva
Universidade Federal de Alagoas - UFAL
(Orientador)

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho
Universidade Federal de Alagoas- UFAL
(Examinador externo)



Prof^a. Dr^a Julieta de Fatima Xavier da Silva
Universidade Federal de Alagoas- UFAL
(Examinador interno)



Prof. Dr. Alexandre Ricardo de Oliveira
Universidade Federal de Alagoas - UFAL
(Examinador interno)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mario Melo dos Santos e Ednai Ramos Melo pela confiança, amor, apoio e por não medir esforços, para que eu pudesse realizar este sonho, e aos meus avós Ana Maria dos Santos e José dos Santos Melo (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Deus pela oportunidade proporcionada e por me iluminar todos os dias.

Gostaria de prestar os meus agradecimentos à Professora Doutora Themis Silva, orientadora deste trabalho, pela disponibilidade e dedicação, pelo esclarecimento de dúvidas, pelos momentos de aprendizado e pelo estímulo constante.

Aos meus pais, Mário Melo dos Santos e Ednai Ramos Melo, pelo carinho, amor, dedicação, força e compreensão. Aos meus irmãos pelo apoio de sempre. Enfim, a toda a minha família (tias, tios, primos, primas, avós) pelo incentivo, preocupação e juntamente com meus pais e irmãos serem minha grande torcida. Não exagero em dizer que fui recebida e amada pela melhor família do mundo!

Ao Centro Integrado de Itiúba (CII) e Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Betume – CODEVASF/4ª SR, propiciando aquisição de tambaquis para a realização deste trabalho. Agradeço especialmente aos técnicos e diretores do CII, além do auxílio na coleta de material biológico, pelo espaço e equipamentos disponibilizados neste centro para realização da minha pesquisa. Meu muito obrigado aos técnicos: Fábio, Cavalcante, Mateus, Sérgio, Reginaldo, Vinícius e diretores do CII Alexandre Delgado e Álvaro Albuquerque. Enfim, a toda equipe que compõe o referido centro.

As Dr^{as} Izeni Pires Farias e Maria da Conceição Freitas Santos do Laboratório de Evolução e Genética Animal da Universidade Federal do Amazonas (LEGAL - UFAM) pela doação dos primers.

Aos professores do curso de Engenharia de Pesca que contribuíram com a minha formação.

As minhas colegas de laboratório Sophia Tenenbaum, Vanessa Salgueiro e Alany Pontes pela companhia de sempre, momentos de aprendizado e divertidos.

Ao Leonardo Barbosa pela grande ajuda com o envio das sequências Macrogen.

Gostaria de agradecer também aos colegas petianos e tutor Alexandre Ricardo Oliveira que durante a realização deste, entenderam a minha ausência.

Aos grandes parceiros que pude conhecer Iury Amorim, Dianesson Farias, Gildete Souza, Dilene Tavares, Wendel Novais, Franscolândio Alves “Ninho”, Eduardo “Loucura”, Eline, Mariana Lins, Aline Pereira, Sophia Tenenbaum, Juliete Rocha, aos colegas da turma de Engenharia de Pesca 2009 (turma a qual pertenci) e aos colegas da turma de 2011. Enfim, no intuito de não esquecer ninguém, agradeço a todos pela amizade que fiz durante a minha passagem como graduanda do curso de Engenharia de Pesca.

Agradeço também ao Edilson e aos vigilantes que indiretamente também colaboraram com esta pesquisa.

A FAPEAL e CNPq pelo financiamento do projeto.

RESUMO

O tambaqui, *Colossoma macropomum*, espécie originária da bacia Amazônica pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Serrasalminae. No Nordeste do Brasil, o tambaqui foi introduzido na década de 60 pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS). O tambaqui está entre as espécies mais cultivadas da produção aquícola nacional devido a suas qualidades como peixe apropriado para o cultivo. São várias as espécies de peixes de importância na pesca comercial e na aquicultura que vêm sendo estudadas com marcadores moleculares, entre elas o tambaqui *Colossoma macropomum*, pois, as características genéticas podem afetar a qualidade das larvas e de estoques juvenis, influenciando no desempenho zootécnico. Diante disso, objetivou-se caracterizar a variabilidade genética de estoques de tambaquis (*Colossoma macropomum*) cultivados no CII – AL e Betume, utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial, para verificar a variabilidade genética dos reprodutores e descendentes, visando à qualidade zootécnica. Dentre os genes que compõe o DNA mitocondrial temos, o da ATPase (subunidade seis e oito), objeto deste estudo, que codifica a enzima ATPase, responsável pela hidrólise do ATP. Foram realizadas coletas de nadadeira (adiposa e/ou caudal) e posteriormente extrações de DNA dos mesmos, utilizando kit específico. Após a extração o DNA foi quantificado, amplificado via PCR e sequenciado. Os dados gerados pelo sequenciador foram analisados em programas específicos para a verificação da variabilidade genética e de polimorfismo do DNA como: Dnasp 5.10.1, ARLEQUIN 3.5 e MEGA 6. Os genes mitocondriais (ATPase seis e oito) foram sequenciados para 118 indivíduos de *Colossoma macropomum* perfazendo um total de 871pb. Foram observados 82 sítios polimórficos e 27 haplótipos, sendo o mais comum H_2 (Cm 2) compartilhado com 77 indivíduos pertencentes as duas populações amostradas. A AMOVA mostrou a maior variação (98,96%) dentro das populações. Os baixos níveis de variabilidade genética encontrados para os tambaquis analisados ($H = 0,6005$ para Itiúba e $H = 0,4233$ para Betume) revelam não haver diferenças genéticas entre as duas populações estudadas e fornecem informações para um manejo mais eficaz.

Palavras chave: Piscicultura brasileira, Characiformes, marcador molecular, diversidade genética, genoma mitocondrial.

ABSTRACT

The Tambaqui, *Colossoma macropomum*, species native to the Amazon basin belongs to the order Characiformes, Characidae family, subfamily Serrasalminae. In northeastern Brazil, tambaqui was introduced in the 60s by the National Department of Works Against Drought (DNOCS). The Tambaqui is among the most cultivated species of national aquaculture production due to his qualities as an appropriate fish for farming. Are many species of fish in the importance of commercial fishing and aquaculture have been studied with molecular markers, including the tambaqui *Colossoma macropomum* thus the genetic characteristics can affect the quality of larvae and juvenile fish stocks, influencing on the performance. View of this objective was to characterize the genetic variability of tambaquis stocks (*Colossoma macropomum*) cultivated in CII - AL and Betume, using molecular markers of mitochondrial DNA to verify the genetic variability of the breeding and descendants, seeking to zootechnical quality. Among the genes that make up the mitochondrial DNA have the ATPase gene (six eight subunit), object of this study, which encodes the ATPase enzyme responsible for the hydrolysis of ATP. Were collected from fin (adipose and / or caudal) and subsequently DNA extractions thereof, using specific kit. After extraction the DNA was quantified, amplified by PCR and sequenced. The data generated by the sequencer will be analyzed in specific programs to verify the genetic variability and polymorphism of DNA as Dnasp 5.10.1, ARLEQUIN 3.5 and MEGA version 6. The mitochondrial genome (ATPase six and eight) were sequenced to 118 individuals *Colossoma macropomum* in a total of 871 base pairs. Were observed 82 polymorphic sites and 27 haplotypes, the most common H₂ (Cm₂) shared with in 77 individuals from the two sampled populations. The AMOVA showed the greatest variation (98.96%) within populations. Low levels of genetic variability found for the analyzed tambaquis ($H = 0,06005$ para Itiúba e $H = 0,4233$ para Betume) show there are no genetic differences between the two study populations and given information for more effective management.

Keywords: Brazilian fish farming, Characiformes, molecular marker, genetic diversity, mitochondrial genome.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Objetivos	14
3. Revisão Bibliográfica	15
3.1 <i>Colossoma macropomum</i>	15
3.2 Importância econômica	16
3.3 Variabilidade genética	16
3.4 Marcador molecular	17
3.5 DNA mitocondrial(DNAmt)	19
3.6 Gene ATPase	21
4. Materiais e Métodos	22
4.1 Locais de coleta e coleta de material biológico	22
4.2 Extração e quantificação de DNA	23
4.3 PCR e sequenciamento	23
4.4 Análises	25
5. Resultados e Discussões	27
5.1 Análises com todos os exemplares	29
5.2 Resultados por localidade amostradas	34
5.3 Reprodutores e progênies	35
6. Conclusão	36
7. Referências bibliográficas	37
8. Anexos	42

1. INTRODUÇÃO

Em 2011, a produção aquícola nacional discriminada por espécies, demonstrou que a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) foram as espécies mais cultivadas, onde ambas representaram 67% da produção nacional de pescado na modalidade (MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA, 2011). De acordo com Ostrensky et al. (2008), o Brasil possui uma gama de espécies nativas com potencial para aquicultura continental, no entanto, a maioria das espécies não possui aportes científicos e tecnológicos que viabilizem o potencial econômico dessas espécies e práticas zootécnicas adequadas.

No Nordeste do Brasil, o tambaqui foi introduzido na década de 60 pelo Departamento Nacional de Obras Contra a Seca (DNOCS), tendo o primeiro lote 24 alevinos procedentes de Manaus (ALBUQUERQUE et al., 1981) enviados ao Centro de Pesquisas Ictiológicas Rodolpho Von Ihering (Pentecoste, Ceará, Brasil) em 1972. No mesmo ano, o DNOCS introduziu no Centro acima referido mais 98 alevinos desta espécie provenientes do Peru. No entanto, somente em 1974, iniciou pesquisas visando propagação artificial do tambaqui (BEZERRA-SILVA, 1984), com o intuito de povoar açudes e para criação em viveiros de engorda (MOLLE & CADIER, 1992).

Atualmente a CODEVASF (Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba), através do Centro Integrado de Itiúba – CII (antigo CERAQUA), é responsável pela distribuição de alevinos para os piscicultores da região do Baixo São Francisco, entre eles o tambaqui, que aparece como uma das principais espécies cultivadas nesta região (SILVA & FUJIMOTO, 2012).

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Serrasalminae (NELSON, 2006). É uma espécie de peixe de grande porte, capaz de atingir 100 cm de comprimento e pesos superiores a 30 kg (GOULDING & CARVALHO, 1982; SANTOS et al., 2006), oriunda das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco (SANTOS et al., 2006).

De acordo com Bartley et al. (2001), o tambaqui tem sido alvo de programas de hibridização nas últimas décadas e cruzado com diferentes espécies com o objetivo de produzir indivíduos estéreis ou produzir espécies diferentes das progênes. Devido a considerável fecundidade, a fêmea normalmente é selecionada para este procedimento e cruzada com machos de outras espécies de

Characiformes, como *Piaractus mesopotamicus* (Pacu) e *Piaractus brachypomus* (Pirapitinga) (GOMES et al., 2012). Esta hibridização visa aliar características de espécies diferentes para produzir um organismo economicamente mais viável, de rápido crescimento e mais resistente a doenças e baixas temperaturas (SENHORINI et al., 1998).

Contudo, em cultivos estabelecidos, a maioria dos plantéis de reprodutores possuem matrizes com idade bastante avançada e excesso de consanguinidade. Esta característica genética pode afetar a qualidade das larvas e de estoques juvenis, influenciando no desempenho zootécnico (CALCAGNOTTO & TOLEDO FILHO, 2000). A consanguinidade afeta diretamente a variabilidade genética (diversidade genética), que pode ser definida como a variedade de alelos e genótipos presentes no grupo estudado e constitui a força que dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais, diminuindo o risco de extinção. Pode ser medida usando-se estimativas genéticas como polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica (FRANKHAM et al., 2002). Segundo Lopes et al. (2009) o nível de variabilidade genética dos estoques de reprodutores depende do manejo reprodutivo, da origem, do número de reprodutores utilizados e da diversidade genética dos peixes que formam o estoque.

Na piscicultura brasileira, há uma tendência das matrizes serem peixes que possuem baixa variabilidade genética ou um alto grau de parentescos entre os mesmo. Este fato se deve a fatores como: utilização de baixo número de reprodutores, formação de lotes de reprodutores a partir de outras pisciculturas com problemas de endogamia e a falta de recursos para obter matrizes de boa qualidade (EMBRAPA, 2012).

Devido sua importância o tambaqui atualmente faz parte do projeto AQUABRASIL da EMBRAPA, que tem por objetivo contribuir com a modernização das cadeias produtivas da aquicultura no Brasil, estabelecendo programas de melhoramento genético de quatro espécies de interesse para a aquicultura (RESENDE, 2009).

Entre as várias espécies de peixes produzidas em escala comercial no Brasil está o tambaqui (*Colossoma macropomum*), dentre suas qualidades como peixe apropriado para o cultivo estão: boa adaptação ao cativeiro, carne saborosa e consistente, rápido crescimento, fácil manuseio, grande rusticidade, hábito alimentar onívoro, propagação artificial e produção de alevinos em grande escala, ótima

aceitação no mercado e pode ainda ser cultivado juntamente com outras espécies de peixes em sistemas de policultivo (CODEVASF, 1993, 2013).

Sendo assim, o conhecimento sobre a variabilidade genética se mostra uma ferramenta capaz de auxiliar e/ou melhorar o manejo dos reprodutores, a qualidade dos organismos cultivados e conseqüentemente uma maior qualidade dos alevinos produzidos e que estarão sendo cultivados por piscicultores na região do Baixo São Francisco.

2. OBJETIVOS

GERAL:

Caracterizar a variabilidade genética de estoques de tambaqui (*Colossoma macropomum*) cultivados no Centro Integrado de Itiúba (CII-AL) e do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Betume – CODEVASF/4ª SR, utilizando marcadores moleculares do DNA mitocondrial, a fim de verificar a qualidade genética dos reprodutores e descendentes.

ESPECÍFICOS:

- Verificar a variabilidade genética de reprodutores e progênes cultivados no CII - AL, utilizando o gene da ATPase subunidade 6 e 8 do DNA mitocondrial;
- Fornecer dados que auxiliem na conservação e/ou aumento da variabilidade genética do estoque de reprodutores visando à qualidade zootécnica.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Colossoma macropomum*

O tambaqui, *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818), pertence à ordem Characiformes, família Characidae, subfamília Serrasalminae (NELSON, 2006). Os Characiformes estão distribuídos em 23 famílias, cerca 270 gêneros e aproximadamente 1680 espécies. Desse total de espécies, 209 ocorrem na África e as restantes apresentam-se distribuídas pela região Neotropical, onde atingem sua maior diversidade, representando 30% da ictiofauna (NELSON, 2006). Esta ordem apresenta pequeno ou nenhum cuidado parental, períodos reprodutivos curtos, possui fecundidade intermediária a alta (VAZZOLER, 1996).

É uma espécie de peixe de grande porte, capaz de atingir 100 cm de comprimento e pesos superiores a 30 kg (GOULDING & CARVALHO 1982; SANTOS et al., 2006); oriunda das bacias do rio Amazonas e do rio Orinoco é uma espécie de vida longa (de pelo menos 13 anos); onívora (adultos se alimentam basicamente de frutos e sementes e utilizam o zooplâncton como complemento alimentar); apresenta desova total e uma alta fecundidade, com um número médio de 78 ovócitos por grama de peso corpóreo (SANTOS et al., 2006).

De acordo com Vieira et al. (1999), o tambaqui, é uma espécie migradora, com fecundação externa e sem cuidados com a prole. Com o período reprodutivo estendendo-se de setembro a fevereiro (VILLACORTA CORREA & SAINT-PAUL, 1999).



Figura 1: Exemplar de tambaqui *Colossoma macropomum* adulto.
Foto: Jonas Aguiar.

3.2 Importância econômica

Entre as várias espécies de peixes produzidas em escala comercial no Brasil está o tambaqui (*Colossoma macropomum*), dentre suas qualidades como peixe apropriado para o cultivo estão: boa adaptação ao cativeiro, carne saborosa e consistente, rápido crescimento, fácil manuseio, grande rusticidade, hábito alimentar onívoro, propagação artificial e produção de alevinos em grande escala, ótima aceitação no mercado e pode ainda ser cultivado juntamente com outras espécies de peixes em sistemas de policultivo (CODEVASF, 1993, 2013).

Em cativeiro aceita bem a ração peletizada e extrusada, sendo a segunda mais sugerida. Dependendo do nível de tecnologia empregado, a produtividade do tambaqui pode variar de 1,5 a 10 toneladas por hectare/ano. A temperatura é a maior restrição a essa espécie, seu metabolismo é reduzido a temperaturas abaixo de 22° C e inferiores a 16 °C pode levar a morte (CODEVASF, 2013). Esta espécie pode ser criada em qualquer sistema de cultivo, especialmente no Nordeste do Brasil, onde as condições climáticas são ideais ao seu desenvolvimento (PONZI JUNIOR, 2013).

A piscicultura de tambaqui na região Baixo São Francisco apresenta-se como uma atividade recente, com menos de 20 anos de produção e a maioria dos piscicultores estão na atividade de 1 a 10 anos. O sistema de produção familiar nesta região é semi-intensivo, caracterizada por viveiros de terra com o plantio de outros tipos de cultura e criações de outros animais, como ovinos e patos. A forma de comercialização se dá por vendas diretas ao consumidor como em feiras livres e nas portas das pisciculturas ou a atravessadores (SILVA & FUJIMOTO, 2012).

Além da preservação dos ecossistemas, a piscicultura é uma ferramenta que garante o estabelecimento da demanda por pescado, principalmente pelo tambaqui, devido ao contínuo aumento populacional e a natureza não prover a quantidade de pescado que a sociedade deseja, sendo então a demanda suprida pela criação em cativeiro (IZEL et al., 2013).

3.3 Variabilidade Genética

Variabilidade genética (diversidade genética) pode ser definida como a variedade de alelos e genótipos presente no grupo estudado, e constitui a força que

dá às populações capacidade de suportar pressões ambientais, diminuindo o risco de extinção. Pode ser medida usando-se estimativas genéticas como polimorfismo, heterozigosidade média e diversidade alélica (FRANKHAM et al., 2002). O nível de variabilidade genética dos estoques de reprodutores depende do manejo reprodutivo, da origem, do número de reprodutores utilizados e da diversidade genética dos peixes que formam o estoque (LOPES et al., 2009). De acordo com Calcagnotto & Toledo Filho (2000), o conhecimento da variabilidade genética é de grande importância para a conservação e manejo bem sucedidos de espécies de peixes. Essa ferramenta num determinado estoque é de grande interesse para empresas e piscicultores que trabalham almejando a qualidade dos produtos provenientes de cultivo e ótimo desempenho zootécnico. A perda da diversidade genética reduz o potencial evolutivo e está também associada com a redução do sucesso reprodutivo (FRANKHAM et al., 2008). De acordo com Santos (2010), se os organismos cultivados passam por uma redução da variabilidade genética, estes poderão estar mais susceptíveis a doenças, como parasitoses, podem ter menores índices de sobrevivência e menor sucesso reprodutivo.

De acordo com Porta et al. (2006), os efeitos do manejo e seleção das matrizes (reprodutores) podem representar um conjunto de características responsáveis pela drástica redução da variabilidade genética em apenas uma geração. O monitoramento da variabilidade genética e endogamia em estações de piscicultura são indispensáveis à manutenção da capacidade adaptativa de uma espécie (SAURA et al., 2006). Os altos níveis de endogamia podem apresentar aspectos como: diminuição na taxa de crescimento, taxas de sobrevivência baixas, organismos mais susceptíveis às doenças, deformidades na coluna vertebral e na formação dos opérculos (EMBRAPA, 2012).

3.4 Marcador Molecular

Segundo Ferreira & Grattapaglia (1998), marcador molecular é todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como isoenzimas ou de um segmento específico de DNA. A importância dos marcadores moleculares abrange desde as questões evolutivas até a elaboração de programas de manejo para uso em conservação, auxiliando também no planejamento do manejo adequado dos estoques cultivados em piscicultura. Em unidades de cultivo, os

marcadores moleculares são ferramentas amplamente utilizadas na seleção de linhagens e programas de melhoramento de características tais como crescimento e ganho de peso (MARQUES, 2002). Para isso uma ampla variedade de marcadores moleculares tem sido utilizada pelos programas de aquicultura como DNA mitocondrial, RFLP, RAPD e microssatélites (LIU & CORDES, 2004).

Uma grande contribuição à biologia molecular foi a técnica PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) desenvolvida por Kary Mullis em 1983 (REGITANO, 2001 *apud* POVH et al., 2008), que consiste na amplificação de DNA (obtenção de milhões de cópias de fragmentos específicos de DNA) por meio da enzima DNA polimerase e dos oligonucleotídeos (iniciadores/primers) sobre o DNA molde (HARTL & CLARK, 2010).

Os marcadores SSR (Simple Sequence Repeats- Sequências Simples Repetidas) ou microssatélites são sequências no DNA constituídas de um a seis nucleotídeos de comprimento repetidos lado a lado no genoma dos eucariotos, caracterizam-se por serem codominantes, multialélicos, abundantes, aparentemente distribuídos por todo o genoma (BUSO et al., 2003), além de ser o marcador que possui o mais elevado conteúdo de informação de polimorfismo (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998).

Entre os marcadores moleculares o RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição) tem como característica a codominância o que o torna vantajoso para estudos da estimativa da variabilidade genética populacional e geração de árvores filogenéticas (MARQUES, 2002).

Existe ainda o RAPD ((Randomly Amplified polymorphic DNA- Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso), que detecta polimorfismos sem a necessidade de conhecimento prévio das sequências utilizadas. Em estimativas de variabilidade e similaridade entre populações, este marcador possibilita a inferência da história recente de determinadas populações (MARQUES, 2002). Para Pohv et al. (2008), esta técnica é uma ferramenta potencial para o monitoramento da variação genética de populações, devido ao baixo custo e simplicidade, pode ser usada como técnica complementar no manejo reprodutivo com o intuito de minimizar as perdas da variabilidade genética das progênes.

Atualmente os marcadores moleculares tem sido utilizados no estudo de muitas espécies de peixes com grande participação comercial, com a finalidade de

conhecer a variabilidade genética, entre elas podemos citar: a pescada *Plagioscion squamosissimus* (GALLETTI, 2009), o tambaqui *Colossoma macropomum* (SANTOS, 2010) e (SANTOS et al., 2007), o pirarucu *Arapaima gigas* (HRBEK et al., 2005), o bagre *Brachyplatystoma rousseauxii* (BATISTA & ALVES-GOMES, 2006), a pescada-gó *Macrodon ancylodon* (SANTOS et al., 2006), a tilápia *Oreochromis niloticus* linhagem Gift (genetically improved farmed) (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ et al., 2013), o aruanã branco *Osteoglossum bicirrhosum* (SILVA, 2009) entre outros.

3.5 DNA Mitocondrial (DNAMt)

De acordo com Meyer (1993), o DNA mitocondrial (DNAMt) animal tem aproximadamente 16.500 pares de bases (pb), distribuídos em 13 genes codificadores de proteínas (sete subunidades da NADH desidrogenase, três subunidades da citocromo C oxidase, duas subunidades da ATP sintetase (6 e 8) e o citocromo b); 22 de RNAs transportadores (RNAt); dois de RNA ribossômicos (12S e 16S) totalizando 37 genes. Existe ainda uma região não codificadora denominada região controle (D-loop) que contém os sítios de iniciação para replicação do DNA mitocondrial e transcrição do RNA (Figura 02).

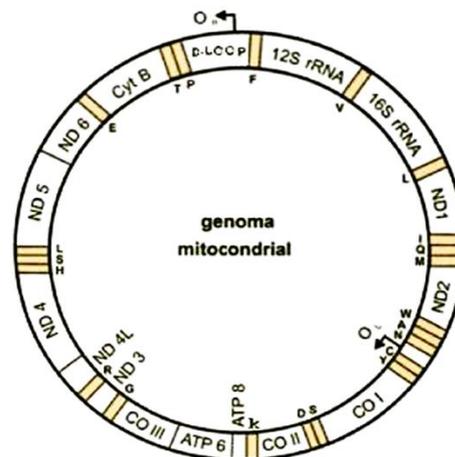


Figura 2: Esquema do genoma mitocondrial (modificado de Meyer, 1993).

Para a maioria dos animais, o DNAMt é haploide e de herança materna (BEAUMONT et al., 2010; MEYER, 1993; DUHAM, 2004). Dentre os genes que compõe o DNAMt, temos o gene da ATPase (subunidade seis e oito), que codifica a enzima ATPase, responsável pela hidrólise do ATP (LEHNINGHER, 2004). Por ser

um gene codificante, tem como característica principal ser mais conservado que os outros segmentos do DNA mitocondrial, como a região controle (D-loop) (ARIAS et al., 2003; LUI, 2010).

A taxa de mutação do DNAm é superior ao genoma nuclear devido a baixa capacidade de reparo da enzima DNA polimerase e a alta exposição da molécula de DNA aos agentes oxidativos gerados durante o processo de respiração celular (BEAUMONT et al., 2010; MEYER, 1993). Dentre as regiões do DNAm, a região controle é chamada de hipervariável, porque é a que mais acumula mutações (BUDOWLE et al., 2003), permitindo assim estudos sobre evolução recente (BEAUMONT et al., 2010).

Os marcadores moleculares mitocondriais têm sido amplamente adotados em estudos genéticos, pois, entre suas principais características estão a grande variação nucleotídica, sua estrutura e organização simples (AVISE 1994,2000 *apud* SCHNEIDER, 2007).

Hrbek et al. (2005), em estudo com *Arapaima gigas* (pirarucu), verificou níveis de variabilidade genética baixos tendo como uma possível causa a sobre exploração dos estoques naturais e a possibilidade da espécie formar uma única população. Farias et al. (2010), utilizando a região controle do DNAm de *C. macropomum*, observaram que as corredeiras do rio madeira não constituíam uma barreira ao fluxo gênico entre as populações da Amazônia brasileira e boliviana. Sivasundar et al. (2001), estudando a ATPase (subunidade seis e oito) e a região controle do gênero *Prochilodus* em diferentes rios das bacias da América do Sul encontraram baixa distância genética entre os peixes, e os haplótipos localizados para estas regiões nas diferentes bacias formaram grupos monofiléticos. Haplótipo pode ser definido como variações na sequência de pares de base (FUTUYMA, 1992). Segundo Frankham et al. (2008), pode também ser definido como genótipo haploide, ou, a composição alélica de vários locos diferentes em um cromossomo. Santos et al. (2006), aliando análises morfométricas quantitativas da forma do corpo e sequências do gene Citocromo b em *Macrodon ancylodon* (pescada-gó) constataram diversidade nucleotídica baixa e níveis de diversidade haplotípica variando de moderada a elevada, podendo o padrão genético das populações tropicais e subtropicais indicar expansão populacional recente e de constituírem um grupo monofilético.

3.6 Gene ATPase

Gene pode ser definido como unidade física e funcional da hereditariedade, que carrega informação de uma geração para a seguinte. Em termos moleculares, é a totalidade da sequência de DNA necessária para a produção de uma proteína funcional, ou RNA (LODISH et al.2000).

O tamanho deste gene é de aproximadamente 850 pares de bases. Estudos do genoma mitocondrial completo de *Piaractus mesopotamicus* (PIMENTEL et al., 2014) e com *Myleus sp.* (NATAKANI et al., 2011) comprovam esta afirmação, pois encontraram para este gene, 851 pb correspondente a subunidades 6 e 8 do DNAm. Outros autores, como Habib et al. (2012) e Xin-Hong et al. (2004) para a mesma região do DNAm, encontraram 842 pb, devido a uma região de sobreposição de 10 pares de bases entre as subunidades 6 e 8 da ATPase.

O gene da ATPase, tem sido utilizado para deduções sobre aspectos evolutivos, populacionais e filogeográficos de espécies de peixes (BERMINGHAM & MARTIN, 1998; SIVASUNDAR et al., 2001; PERDICES et al., 2002). Ainda segundo com Zardoya & Meyer (1996) o gene da ATPase é pobremente apropriado para estudos filogenéticos, mas um dos mais recomendados para estudos fitogeográficos e de diversidade genética (BERMINGHAM & MARTIN, 1998).

Xin-Hong et al. (2004) e Yan et al. (2009), sugere que genes da ATPase subunidades 6 e 8 são marcadores genéticos úteis para o monitoramento das genealogias e das variações que ocorrem nas progênies.

Estudos realizados na Amazônia com populações selvagens como os de Santos (2010) com a espécie *C. macropomum* e Silva (2009) utilizando exemplares de *Osteoglossum bicirrhosum* reforçam a afirmação de que o gene da ATPase é adequado para análises de variabilidade genética, pois utilizaram esta ferramenta molecular nas populações estudadas e puderam inferir a estrutura populacional das espécies alvos e sua distribuição ao longo da bacia Amazônica por meio das diferenciações genéticas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Locais de coleta e coleta de material biológico

As coletas foram realizadas nas instalações do CII (Centro Integrado de Itiúba - Centro de Referência em Aquicultura da Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba - (CODEVASF) no município de Porto real do Colégio (AL), responsável pela distribuição de alevinos para os piscicultores da região do Baixo São Francisco, sendo obtidas no total 199 nadadeiras adiposa e/ou caudal dos exemplares (25 reprodutores e 174 progênie) e 45 reprodutores do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Betume – CODEVASF/4ª SR, localizado no município de Neópolis (SE), totalizando 244 indivíduos.

As nadadeiras foram colocadas em tubos tipo eppendorf devidamente identificados contendo etanol 95% e armazenadas em freezer a $- 10^{\circ} \text{C}$ no laboratório de genética molecular do CII.



Figura 3: Instalações do Centro Integrado de Itiúba- CII. Fotos: Sérgio Antônio Medeiros Marinho.

4.2 Extração e quantificação de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corporation, Madison, WI, USA) conforme instruções do fabricante (anexo I). As amostras de tecido passaram pelos seguintes estágios:

- Lise das membranas plasmáticas e nucleares com 600 µL da solução Nuclei Lysis Solution;
- Digestão de proteínas com 30 µL Proteinase K;
- Degradação do RNA com 5 µL RNase;
- Remoção ou separação das proteínas celulares com 200 µL Protein Precipitation Solution deixando somente o DNA genômico;
- Precipitação do DNA com 600 µL isopropanol e purificação (lavagem) com 600 µL etanol;
- Reidratação do DNA com 100 µL Rehydration Solution.
- Armazenamento em freezer.

Depois da extração o DNA foi aplicado em gel de agarose 0,8% corado com SYBR® Safe DNA e submetido à eletroforese, que permitiu verificar a quantidade e qualidade dos fragmentos extraídos (quantificação), nesta etapa o DNA extraído das amostras foi comparado com marcador de peso molecular conhecido (Low DNA mass- Invitrogen).

4.3 PCR e Sequenciamento

O gene ATPase foi amplificado via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando o Kit comercial para PCR Top Taq™ Master Mix (Qiagen) (Tabela 1).

Reagentes	Volumes utilizados
Kit PCR Qiagen (TopTaq Master Mix 2X. Componentes: Tampão Tris-KCL, MgCl ₂ , dNTPs, enzima Taq polimerase	10 µL
Coral (10x)	1,5 µL
Iniciador específico ATP 8.2_L8331 (2 µM)*	1,5 µL
Iniciador específico CO3.2_H9236 (2 µM)*	1,5 µL
Água ultrapura	1,5 µL
DNA	4 µL
Volume final	20 µL

Tabela 1: Condições de PCR utilizadas neste trabalho.

*Iniciadores ATP 8.2_L8331 e CO3.2_H9236(Sivasundar et al. (2001)

A amplificação foi realizada utilizando o termociclador onde as amostras foram submetidas a diferentes ciclos de temperaturas de acordo com o quadro 1.

Quadro 1 : Etapas de PCR com respectivos temperatura e tempo.

Etapas	Temperatura (° C)	Tempo (minutos)
Desnaturação inicial	92	2
Desnaturação	92	1
Anelamento (hibridização)	50	1
Extensão	72	2
Extensão final	72	5
Conservação das amostras	4	-

Para verificar a eficiência da amplificação foi aplicado 2 µL do produto de PCR em gel de agarose a 1% corado com SYBR® Safe DNA e para comparação foi utilizado 4 µL de marcador 100bp (DNA ladder - Invitrogen) para estimar a concentração do PCR. Cerca de 30 minutos foram necessários para migração das amostras no gel a 100 volts, que posteriormente foram visualizadas e registradas no transiluminador.

Após a confirmação da amplificação, as amostras com 40 ng/µL ou mais foram enviadas à Macrogen (Seul, Coréia do Sul) para o sequenciamento, utilizando iniciador ATP 8.2_L8331 (2 pmol/µL) específico para o gene da ATPase. As sequências obtidas foram então alinhadas no programa *Clustal W* (THOMPSON et

al., 1994) implementado no programa *Bioedit* 7.2.5 (HALL, 1999) e editadas no mesmo programa.

4.4 Análises

O gene da ATPase de *C. macropomum*, foi checado e comparado com o mesmo gene dos Characiformes *Myleus sp* e *Piaractus mesopotamicus*, cujo genoma mitocondrial completo está disponível no GenBank, para fins de identificação e comparação.

Através do programa MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) foi possível traduzir o gene sequenciado em aminoácidos hipotéticos para determinar se o fragmento obtido realmente correspondia ao gene de interesse. A sequência de aminoácidos gerada pelo MEGA 6 (TAMURA et al., 2013) foi então comparada com as disponíveis no GenBank para verificação da proteína.

Adicionalmente o mesmo foi realizado no GenBank, onde uma sequência de nucleotídeos foi selecionada, traduzida e comparada com as depositadas no banco de dados do GenBank, através da ferramenta BLASTtx.

As análises de polimorfismo de DNA foram realizadas no programa Dnasp 5.10.1 (ROZAS et al., 2010), entre os parâmetros calculados estão: a) diversidade haplotípica (H), que é a probabilidade de cada duas sequências serem distintas; b) diversidade nucleotídica (π), que indica a quantidade média de diferenças nucleotídicas por sítio; c) número total de mutações (Eta) e também a porcentagem das quatro base nitrogenadas encontradas no conjunto de sequências. A variabilidade genética foi também verificada utilizando o ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

Foram também observados o número de haplótipos nos programas Dnasp 5.10.1 (ROZAS et al., 2010) e ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010). Para a construção da rede de haplótipos foi utilizado o programa Network versão 4.6.1.3 (BANDELT et al,1999).

Utilizando o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010) foi obtido o número de mutações, em outras palavras, as substituições de bases, como as transições (troca de uma base por outra que possui característica química

semelhante, ou seja, purina por purina ou pirimidina por pirimidina) e as transversões (substituição de bases com características químicas diferentes, ou seja, purina por pirimidina) (PAGE & HOLMES, 1998). Através do programa mencionado acima também foi calculada a AMOVA (Análise de Variância Molecular) calcula o grau de diferenciação e estruturação das populações, sendo os níveis hierárquicos de diferenciação populacional, entre populações e dentro das populações. Na AMOVA, também é possível calcular o F_{ST} , índice este que reflete a quantidade de endocruzamentos em uma população, estimando a diferenciação populacional a partir da variância das frequências alélicas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 174 amostras apresentou boa qualidade e quantidade de DNA (quantificação) (Figura 04), estas foram então selecionadas para a etapa seguinte que consistia na amplificação (PCR) do fragmento desejado. A PCR gerou 125 amplificações positivas (Figura 05). Para o sequenciamento foram selecionadas 122, que representaram os melhores produtos de PCR e 118 foram selecionadas para análises.

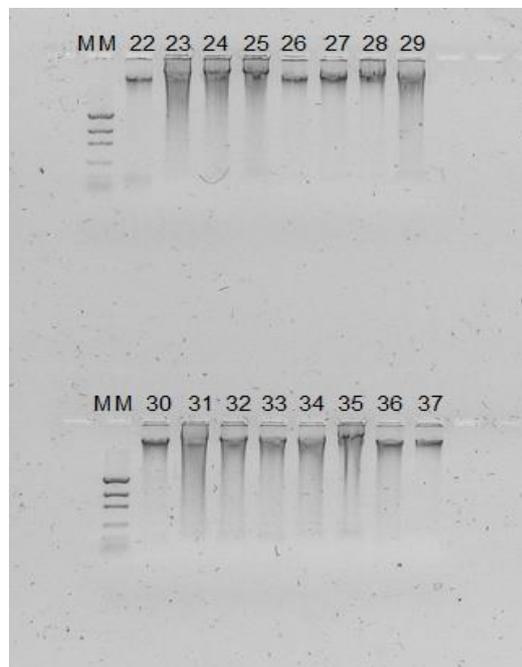


Figura 4: Fotografia do gel de agarose mostrando a concentração de DNA em indivíduos de *C. macropomum*. Amostra de DNA contém 100 ng/ μ L, exceto a 25 que contém 80 ng/ μ L. MM- Marcador Molecular Low DNA Mass Ladder.

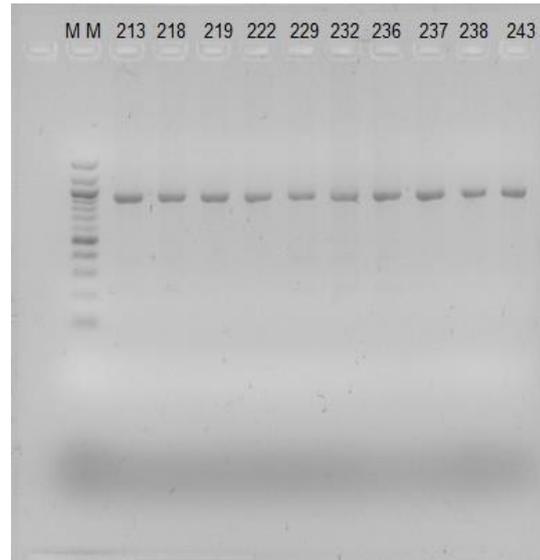


Figura 5: Fotografia do gel de agarose mostrando o perfil dos fragmentos produzidos (800 pbs) pelo primer ATP8.2_L8331 em indivíduos de *C. macropomum*. MM- Marcador Molecular (100 pb) (DNA ladder - Invitrogen).

Por meio do programa MEGA 6 (Tamura et al 2013) o gene sequenciado foi traduzido em aminoácidos hipotéticos e verificado que o fragmento obtido realmente correspondia ao gene ATPase. Posteriormente, por meio da ferramenta BLASTx (GenBank), foi novamente constatado que se tratava do gene ATPase 6 e 8 do DNAmT (figura 6).

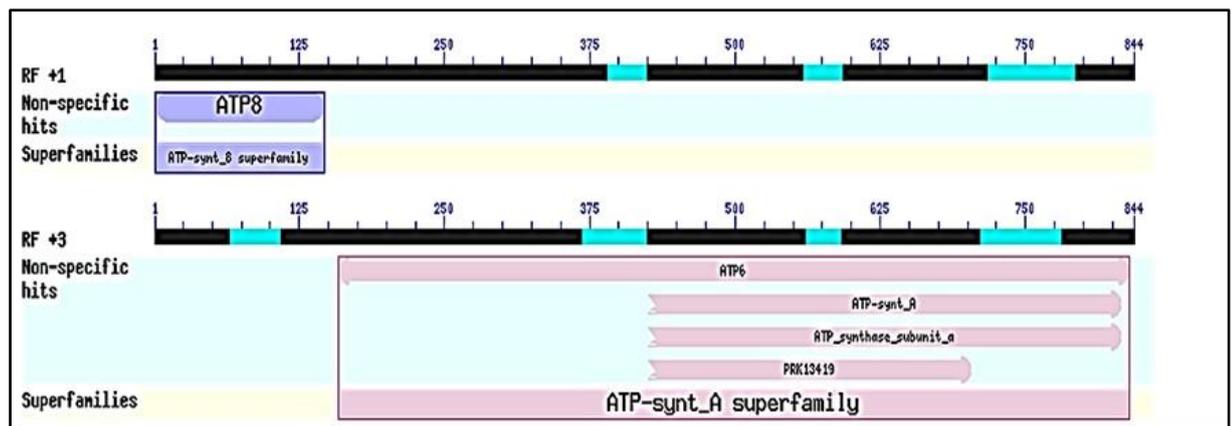


Figura 6: Resultado da tradução do segmento amplificado realizada no GenBank.

5.1 Análises com todos os exemplares

O sequenciamento de 118 amostras gerou um total de 871pb para cada amostra, porém foram utilizados para as análises 841 pb, que corresponde as duas subunidades (6 e 8) do gene da ATPase.

Foram observados 27 haplótipos (anexo II), sendo três compartilhados e 24 haplótipos únicos (tabela 2). Santos et al. (2010), estudando populações naturais de tambaqui com a região ATPase, também encontraram um maior número de haplótipos únicos, dos 444 haplótipos apenas 44 eram compartilhados e 400 eram únicos

Tabela 2: Haplótipos totais encontrados

Haplótipos	Quantidades de haplótipos	Indivíduos	Localidades
H_1(Cm 01)	1	01	Itiúba
H_2(Cm 02)	77	02, 10, 12, 34,40, 43, 46, 47, 48, 49, 51, 55,56, 57, 62, 63,64, 65, 68,71, 72,74, 75, 78, 79, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 89, 91, 95, 97, 98, 105,106, 108, 110, 112, 127, 132, 149, 151, 161,189,190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 209, 210, 211, 212, 213, 216, 219, 220, 222, 223,234, 235, 236, 237, 238, 239, 241,242 e 243	Itiúba e Betume
H_3(Cm 03)	1	03	Itiúba
H_4(Cm 04)	13	04, 05, 20, 21,23, 28, 29, 32, 33,37, 70, 229 e 232	Itiúba e Betume
H_5(Cm 05)	1	06	Itiúba
H_6(Cm 06)	1	07	Itiúba
H_7(Cm 07)	1	08	Itiúba
H_8(Cm 08)	1	09	Itiúba
H_9(Cm 09)	1	13	Itiúba
H_10(Cm 10)	1	15	Itiúba
H_11(Cm 11)	1	16	Itiúba
H_12(Cm 12)	1	17	Itiúba
H_13(Cm 13)	1	18	Itiúba
H_14(Cm 14)	1	19	Itiúba
H_15(Cm 15)	4	22, 31,218 e 240	Itiúba e Betume
H_16(Cm 16)	1	24	Itiúba
H_17(Cm 17)	1	27	Itiúba
H_18(Cm 18)	1	30	Itiúba
H_19(Cm 19)	1	35	Itiúba
H_20(Cm 20)	1	36	Itiúba
H_21(Cm 21)	1	45	Itiúba
H_22(Cm 22)	1	50	Itiúba

H_23(Cm 23)	1	53	Itiúba
H_24(Cm 24)	1	60	Itiúba
H_25(Cm 25)	1	80	Itiúba
H_26(Cm 26)	1	214	Betume
H_27(Cm 27)	1	215	Betume

Constatou-se 756 sítios monomórficos e 85 polimórficos. O número encontrado de mutações totais foi de 94 (Eta), sendo, transições 41 e transversões 53. No estudo de Santos et al. (2010), foram observadas 234 mutações (Eta), destas mutações observadas, 193 consistiam de transições (TS) e 41 transversões (TV).

Santos et al. (2007), trabalhando com a região controle de tabaquis de ambiente natural, obteve um total de 1077 pb, 47 haplótipos únicos e apenas um compartilhado, 71 sítios eram variáveis, com 59 transições e 12 transversões. Com os dados obtidos foi possível verificar uma tendência de aparecimento de haplótipos únicos, também encontrados nas populações naturais. Em populações de cativo, o fato de terem sido observados haplótipos únicos, pode ser devido ao fato da população ter um pequeno tamanho devido ao efeito fundador. Sendo assim, inicia-se o período de expansão populacional e com isso originando mutações e o aparecimento de novos haplótipos dentro da população. Posteriormente, alguns indivíduos cultivados ou um grupo deles são selecionados e se tornam fonte de diversidade que irá originar as próximas gerações.

Os resultados obtidos por Santos (2010) e Santos (2007) em relação às mutações concordam com a afirmação de Page & Holmes (1998), em que as transições são mais frequentes que as transversões porque modificam menos a estrutura do DNA. Porém neste foi verificado um maior número de transversões, que segundo Meyer (1993) pode estar relacionado às transversões terem a capacidade de apagar o registro prévio de transições, sendo acumuladas lentamente e deste modo ultrapassam o número de transições.

O haplótipo mais comum H_2 (Cm 02) foi compartilhado por 77 indivíduos este foi seguido pelo haplótipo H_4 (Cm 04) com 13 indivíduos (figura 6). Em relação ao compartilhamento dos haplótipos, verificou-se que os haplótipos: H_2, H_4 e H_15, estão presentes nas duas localidades amostradas (Itiúba e Betume). O compartilhamento de haplótipos se deve ao efeito fundador, pois, indivíduos de Itiúba foram levados para compor o plantel de Betume.

Uma rede com os 27 haplótipos é mostrada (figura 6), sendo possível observar a presença de vários haplótipos únicos e menor quantidade de haplótipos compartilhados.

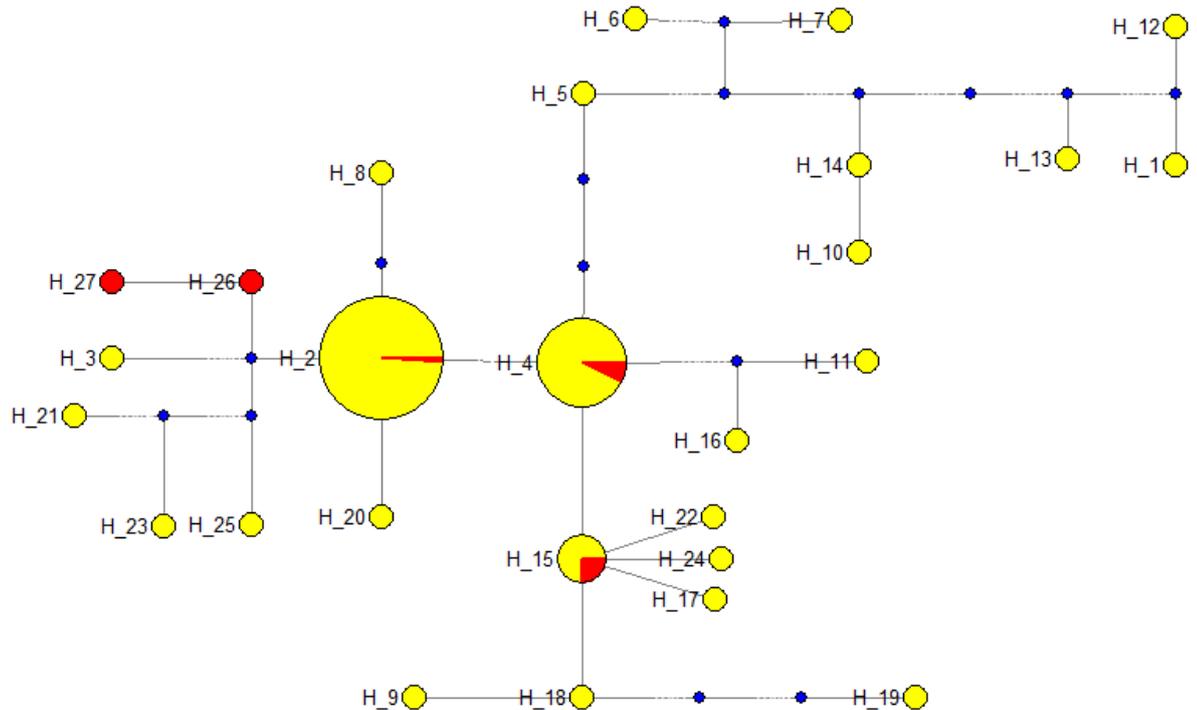


Figura 7: Rede de haplótipos das subunidades 6 e 8 do gene codificador da ATPase, construída no programa Network 4.6.1.3. Os círculos azuis pequenos representam haplótipos não amostrados. Haplótipos: Betume – vermelho e Itiúba – amarelo.

A diversidade haplotípica encontrada foi igual a 0,564 e a diversidade nucleotídica 0,00482, ambas são consideradas baixas se comparados com os resultados de populações selvagens (Santos, 2010) utilizado também a ATPase em que observou grande diversidade haplotípica ($h=1.000$ a 0,984) e diversidade nucleotídica (0.0095 a 0.0133). Em populações naturais, podemos perceber que a variabilidade genética das mesmas se mantém a níveis elevados quando comparados aos de cativeiro. Alguns cultivos podem introduzir haplótipos no seu estoque provenientes de populações naturais quando a obtenção das matrizes ou reposição das mesmas se dá por coletas de juvenis. Como descrito por Aguiar (2012), onde as populações de reprodutores ($H=0,93$) apresentaram diferenças

discretas quando comparadas com as populações naturais ($H= 0,99$). Esse fato é devido a uma prática na região, em que piscicultores coletam juvenis da natureza e misturam ao seu estoque cultivado, introduzindo assim novos haplótipos.

Gomes et al. (2012), trabalhando com a região controle (D-loop) encontraram menor número de haplótipos, com 93 indivíduos de tambaqui obtiveram apenas dois haplótipos a partir de 10 pisciculturas localizadas no norte do país, o que caracteriza uma variação genética muito baixa para um cultivo. Para a mesma região, Aguiar et al. (2012), encontraram 18 haplótipos e altos valores de diversidade haplotípica ($H=0.84$) para 63 exemplares de 15 pisciculturas do oeste do Pará, fato este que difere do encontrado por Gomes et al. (2012) . Mesmo com estas contradições foi possível verificar que, estudos sobre pisciculturas com tambaquis revelam redução da variabilidade genética, que pode ser devido ao manejo utilizado, a seleção das matrizes, o número de reprodutores utilizados, aumentando os níveis de endogamia.

A composição nucleotídica observada nas 118 sequências foi de 29,38% para adenina, 33,40% para citosina, 25,43% para timina e 11,79% para guanina, mostrando uma baixa porcentagem de guanina (gráfico 1) . Este evento é chamado de tendência anti-G, esta forte tendência contra a guanina é padrão para o genoma mitocondrial (MEYER, 1993). De acordo com Xia (1996), esta característica pode ser devido à preferência por adenina (A) durante a transcrição do RNA mensageiro, por ser o ATP o ribonucleotídeo mais disponível nas mitocôndrias, o que tornaria a transcrição muito mais eficiente. Clayton (1982) explica que a seleção contra a guanina pode ser devido a menor estabilidade deste nucleotídeo na fita leve, durante a replicação do DNAmt.

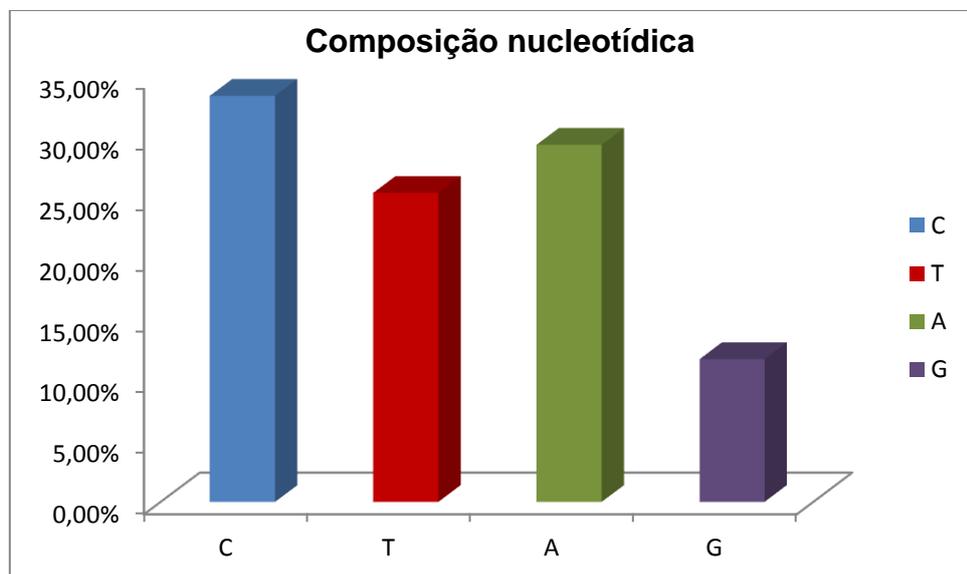


Gráfico 1: Média das frequências de bases nucleotídicas, dos 841 pb sequenciados das subunidades 6 e 8 da ATPase de *C. macropomum* mostrando a tendência anti-guanina.

Tabela 3: Panorama geral de estudos com DNAm em *Colossoma macropomum* e índices de diversidade genética.

	Aguiar (2013)	Santos (2010)	Gomes (2012)	Presente estudo
Região do DNAm	D-loop	ATPase	D-loop	ATPase
Populações	Selvagens (51) Cativeiro(102)	Selvagens	Cativeiro	Cativeiro
N	153	539	93	118
Pb	703	732	505	841
Hap. totais	67	444	2	27
Hap. únicos	51	400	1	24
Hap. comp.	16	44	1	3
Eta	*	234	*	94
TS	*	193	*	41
TV	*	41	*	53
H	Selvagens 0,99 e Cativeiro - 0,83 a 0,93	1.000 a 0,984	*	0,564
π	Selvagens 0,016 e Cativeiro - 0,013 a 0,015	0.0095 a 0.0133	*	0,00482

Legenda: N - número de indivíduos; Hap. – Haplótipos; Comp.- compartilhado; Eta – Mutações totais; TS – Transições; TV- Transversões; H - diversidade Haplótípica e π - diversidade nucleotídica.

* Índices não observados

Uma análise feita retirando três indivíduos considerados como mais divergentes (indivíduos 7,15 e 17), houve uma redução do número de haplótipos (24 haplótipos) e conseqüentemente em outros índices de diversidade genética como: (H=0,541), (π = 0,00317), total de 62 mutações, respectivamente, 40 transversões (TV) e 22 transições (TS).

5.2 Resultados por Localidades Amostradas

A população de Itiúba apresentou a maior diversidade haplotípica se comparada com a de Betume (quadro 02), isso pode ser devido ao maior número de indivíduos desta população, o que influenciou no maior número haplótipos. Foram observados 22 haplótipos únicos em Itiúba enquanto que em Betume apenas dois. Na população de Itiúba são compartilhados três haplótipos, em Betume também foi observado o mesmo número (quadro 2).

Quadro 2: Índices de diversidade da região ATPase do DNAm_t em *Colossoma macropomum*.

Local	N	Número de haplótipos	Diversidade Haplotípica	Diversidade Nucleotídica
Itiúba	93	25	0.6005+/- 0.0586	0.005558+/- 0.003093
Betume	25	5	0.4233+/- 0.1194	0.001538+/- 0.001110

Os resultados da AMOVA (Análise de Variância Molecular) apresentaram a maior variação genética dentro das populações amostradas (98,96%) que entre as populações (1,04%). Enquanto o valor observado de F_{st} foi de 0,01038, evidenciando a pouca diferenciação genética, como sugere Wright (1978), F_{st} entre 0 e 0,05 indicam pequena diferenciação genética. Uma razão para a maior variação ocorrer dentro das populações deve estar aliada ao fato de ter sido encontrado haplótipos exclusivos nas duas populações e as divergências encontradas nas sequências, causando assim, diferenças entre os indivíduos dentro de suas populações.

Quadro 3: Análise de variância molecular nas populações de *Colossoma macropomum* analisadas (Itiúba e Betume).

Fonte de variação	Componentes da variância	Porcentagem da variância
Entre as populações	0.02120	1.04
Dentro das populações	2.02089	98.96

F_{ST} : 0,01038

Significance tests (1023 permutations)

5.3 Reprodutores e progênies

Analisando os resultados levando em consideração os reprodutores e progênies, foram encontrados para as progênies 23 haplótipos totais, sendo três compartilhados e 20 únicos. Foram observados 761 sítios monomórficos e 80 polimórficos. Já para os reprodutores, foram observados sete haplótipos totais, sendo três compartilhados e quatro únicos. Encontrados 29 sítios polimórficos e 812 sítios monomórficos. O fato de serem observados haplótipos compartilhados se deve ao efeito fundador, que como explicado anteriormente, alguns indivíduos de Itiúba foram levados à Betume para compor o plantel do Centro Integrado de Recursos Pesqueiros e Aquicultura de Betume – CODEVASF/4ª SR. Sugere-se que o motivo para o aparecimento de haplótipos únicos se deve ao pequeno tamanho das populações causado pelo efeito fundador.

A diversidade haplotípica foi maior para as progênies que conseqüentemente mostrou maior diversidade genética, fato devido ao maior número de indivíduos o que gerou maior número de haplótipos, enquanto para os reprodutores foram verificados índices inferiores (quadro 5).

Analisando o número de mutações por reprodutores e progênies foi possível verificar; 13 transições e 16 transversões para reprodutores, totalizando 29 mutações. E 39 transições e 50 transversões para progênies totalizando 89 mutações. Os maiores índices de transversões encontrados são explicados pela capacidade das transversões de apagar o registro prévio de transições, sendo acumuladas lentamente e deste modo ultrapassam o número de transições (MEYER, 1993).

Quadro 4: Índices de diversidade da região ATPase do DNAm_t em *Colossoma macropomum*.

Local	N	Número de haplótipos	Diversidade Haplotípica	Diversidade Nucleotídica
Reprodutores	45	7	0.3596 +/- 0.0907	0.002061 +/- 0.001357
Progênies	73	23	0.6705 +/- 0.0600	0.006424 +/- 0.003471

6. CONCLUSÃO

- Os resultados encontrados comprovam que o gene da ATPase foi um marcador eficiente para a caracterizar a variabilidade genética dos indivíduos de Itiúba e Betume.
- Baixos níveis de variabilidade genética foram encontrados para os tambaquis analisados.
- Não foi observado diferenças genéticas entre as populações estudadas.
- O haplótipo H_2 (Cm 2) mostrou ser o mais abundante dos 27 haplótipos encontrados nas populações amostradas, sendo compartilhados por 77 indivíduos
- As análises mostraram maior número de haplótipos únicos.
- A aplicação da genética molecular em pisciculturas se faz uma ferramenta auxiliar para o melhor desempenho zootécnico, maior sucesso reprodutivo e indivíduos menos suscetíveis a doenças.
- Aconselha-se a introdução de novos métodos de manejo para a reprodução desta espécie, garantindo menores índices de endogamia entre os organismos que constituem o estoque cultivado, incrementado desta forma a variabilidade genética na população cultivada.
- Faz-se necessário a introdução de novos reprodutores com a finalidade de aumentar a variabilidade genética do estoque.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, J.P. **Identificação e variação genética de *Colossoma macropomum* e seus híbridos, nativos e de cativeiros da região oeste do Pará.** 2012.171p. Tese de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará. Santarém – Pará, 2012.
- AGUIAR, J.P. et al. Genetic variation in native and farmed populations of Tambaqui (*Colossoma macropomum*) in the Brazilian Amazon: regional discrepancies in farming systems. **An. Acad. Bras. Cien.**, v.85, n.4, p.1439-1447, 2013.
- ALBUQUERQUE, M.O., BEZERRA - SILVA, J.W., KOVÁCS, G. **Sobre o desenvolvimento do ovo e embrião do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818.** DNOCS, Boletim Técnico, Fortaleza, 47/52 (1/2): p.79-100, 1981, 22p.
- ARIAS, M.C.; FRANCISCO, F.D.O.; SILVESTRE, D.O. DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica* (GAR Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.). **Editora UNESC**- Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, p.305-309, 2003.
- AVISE, J. C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York. 511pp. In: SCHNEIDER, C.H. **Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia Central.** 2007. 88p. Tese de mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.
- AVISE, J. C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. **Harvard University Press, London.** 447pp. In: SCHNEIDER, C.H. **Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia Central.** 2007. 88p. Tese de mestrado em Biologia Tropical e Recursos Naturais. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2007.
- BARTLEY, D.M; RANA, K.; IMMINK A.J. The use of inter-specific hybrids in aquaculture and fisheries. **Rev. Fish Biol. Fisheries** v.10, p.325-337, 2001.
- BATISTA, J. S.; ALVES-GOMES. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes – Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, n.4, p.723-740, 2006.
- BEAUMONT, A.; BOUDRY, P.; HOARE, K. Biotechnology and genetics in fisheries and aquaculture. **Wiley-Blackwell**, 2 ed., 2010. 222p. ISBN 978-1-4051-8857-9
- BERMINGHAM, E.; MARTIN, A. P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes: testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology** v.7, p.499–517, 1998.
- BENSON, D. A., BOGUSKI, M., LIPMAN, D. J., & OSTELL, J. (1996). **GenBank. Nucleic Acids Research**, 24(1), 1–5. Disponível em < <http://www.pubmedcentral.nih.gov> > Acesso em 15/01/15.
- BEZERRA – SILVA et al. **Resultados de um experimento de policultivo de tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818, híbrido de tilapias (*Oreochromis hornorum* TREW. X *O. niloticus* L., 1766) e carpa espelho, *Cyprinus carpio* L., 1758 VR. Speculares.** DNOCS, Boletim Técnico, Fortaleza, 42(1): 63-89, 1984, 27p.
- BUDOWLE, B. et al. Forensics and mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations. **Annu. Rev. Genom. Human. Genet.**, v. 4, p. 119-141, 2003.
- BUSO, G.S.C et al. Marcadores microssatélites em espécies vegetais: Desenvolvimento e caracterização de marcadores microssatélites em espécies vegetais tropicais. **Revista Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento.** Edição nº 30, 2003.

- CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO FILHO, S. A. Loss of genetic variability at the transferrin locus in five hatchery stocks of tambaqui (*Colossoma macropomum*). **Genetics and Molecular Biology**. v.23, p. 127-130, 2000.
- CLAYTON, D.A. Replication of animal mitochondrial DNA. **Cell**, v. 28,p. 693-705,1982.
- CODEVASF. **Manual de Criação de peixes em viveiro**. Brasília: Regina Helena Sant'Ana de Faria, Marister Morais ,Maria Regina Gonçalves de Souza, Soranna Willibaldo Brás Sallum, 2013, 136p. ISBN: 978-85-89503-13-6.
- CODEVASF. **Manual de Piscicultura**.Brasília, Brasília : Elek Woynarovich, 1993, 67 p.
- DUNHAM,R.A.**Aquaculture and fisheries biotechnology: genetic approaches**.CABI Publishing.2004. 385p. ISBN 0-85199-596-9.
- EMBRAPA,2012. **Cartilha de genética na Piscicultura**: Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA. 1 ed. Brasília: Diogo Teruo Hashimoto, Anderson Luís Alves, Eduardo Sousa Varela,Gionanni Vitti Moro. Embrapa,2012,34p.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. Arlequin suite ver 3.5: An integrated software package for population genetics data analysis. **Mol. Ecol. Resour.** 2010, 10:564-567.
- FARIAS, I. P.et al. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 56, p.1129-1135, 2010.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Embrapa. Brasília, DF, 3 ed.,1998, 220p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.R.; BRISCOE, D.A. **Introduction to Conservation Genetics**. Cambridge University Press. Cambridge, England., 2002. 617p.
- FRANKHAM, R. BALLOU, J.D. BRISCOE, D.A. **Fundamentos de genética da Conservação**. Traduzido por Mercival Roberto Francisco e Izeni Pires Farias. SBG (Sociedade Brasileira de Genética), Ribeirão preto, São Paulo, 2008,617p.
- FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. Sociedade Brasileira de Genética. Cap 4-5, 1992.
- GALLETTI, E. S. **Distribuição da variabilidade genética da pescada *Plagioscion squamosissimus* (HEKEL, 1840) na calha do rio Amazonas**.2009. 67p. Dissertação de Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - INPA, Manaus,2009.
- GOMES F.et al.Innovative molecular approach to the identification of the tambaqui (*Colossoma macropomum*) and its hybrids. **An. Acad. Bras. Cien.**,v.84, n.2,p.5-8,2012.
- GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Live history and management of the tambaqui, *Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v.1, p. 107-133, 1982.
- HABIB,M. et al. Assemente of ATPase 8 and ATPase 6 mtDNA sequences in genetic diversity studies of *Channa marulius* (Channidae: Peciformes). **The National Academy. Sciences**, India, v.82,n.4,p.497-501, 2012.
- HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.Version 7.2.5, last update(12/11/2013). **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.
- HARTL,D.L & CLARK, A.G. **Princípios de genética de populações**. Artmed, 4ª ed., 2010.660p.
- HRBEK, T. et al. Population Genetic Structure of *Arapaima gigas*, World's Biggest Freshwater Fish: Implications for conservation. **Animal Conservation**. v.8: 297-308, 2005.

IZEL, A.C.U. et al. **Produção intensiva de tambaqui em tanques escavados com aeração**. Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental, 2013, 4 p. ISSN: 1517-2449.

LODISH, H. et al. *Molecular cell biology*. New York: **W.H. Freeman**, 4 ed, 2000. ISBN-10: 0-7167-3136-3.

LOPES, T. S. et al. Diversidade genética de estoques de reprodutores de *Colossoma macropomum*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.61, n.3, p.728-735, 2009.

LIU, R.L. **Análises comparativas citogenéticas e do DNA mitocondrial em *Parauchenipterus galeatus* Bleeker, 1862, (Siluriformes, Auchenipteridae) coletados no alto rio Paraná, no alto rio São Francisco e no rio Piumhi: um enfoque biogeográfico**. 2010. 136p. Tese de Mestrado em Genética e Evolução-Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.

LIU, Z. J.; CORDES, J. F. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. **Aquaculture**, v. 238, p. 1-37. 2004.

MARQUES, K.S. **Aplicação da biologia molecular em programas de conservação de recursos pesqueiros**. Corumbá: Embrapa Pantanal, 2002, 24p.

MEYER, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and molecular biology of fishes**. v. 2, p.1-38. 1993.

MINISTÉRIO DA PESCA E AQUICULTURA – MPA. **Boletim Estatístico da Pesca Aquicultura**, 2011, p.37.

MOLLE, F.; CADIER, E. **Manual do pequeno açude: construir, conservar e aproveitar pequenos açudes no nordeste brasileiro**. Recife: SUDENE: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 1992. 523 p.

NAKATANI, M. et al. Evolutionary history of Otophysi (Teleostei), a major clade of the modern freshwater fishes: Pangaeen origin and Mesozoic radiation. **Evolutionary Biology**, 11:177, p.2-25, 2011.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. New York: Wiley- Interscience. 4 ed., 2006. 601p.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. W.H. Freeman New York. 4 ed., 2004. 1100p.

OSTRENSKY, A.; BORGHETTI, JR.; SOTO, D. **Aquicultura no Brasil: O Desafio é Crescer**. Brasília, 2008. 276p.

PAGE, R.D.M.; HOLMES, E.C. **Molecular evolution: A phylogenetic approach**. Oxford: Blackwell Science. 1998, 346p.

PERDICES, A. et al. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. v. 25, p.172–189, 2002.

PIMENTEL, J. da S. M. et al. Complete mitochondrial genome sequence of *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887). **Mitochondrial DNA**, p.1-2, 2014. ISSN: 1940-1744.

PONZI JUNIOR, M. **Otimização da taxa de fertilização e eclosão de larvas de tambaqui *Colossoma macropomum* (CUVIER, 1818) sem instrumentos**. 2003. 34p. Tese de mestrado em Recursos Pesqueiros, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.

PORTA, J. et al. Genetic structure and genetic relatedness of a hatchery stock of Senegal sole (*Solea senegalensis*) inferred by microsatellites. **Aquaculture**, v.251, p.46-55, 2006.

POVH et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Cien. Inv. Agr.** v. 35, n.1. p. 5-15, 2008.

- RESENDE, E.K. Pesquisa em rede em aquicultura: bases tecnológicas para o desenvolvimento sustentável. da aqüicultura no Brasil. Aquabrazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.52-57, 2009.
- REGITANO, L.C.A. 2001. Introdução à análise de marcadores moleculares. Pages 25-39. In: POVH et al. Monitoreo genético en programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Cien. Inv. Agr.**v. 35, n.1. p. 5-15,2008.
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ,M.D.P et al.Caracterização genética de gerações de tilápia Gift por meio de marcadores microssatélites. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v.48, n.10, p.1385-1393, 2013.
- ROZAS,J;LIBRADO,P;SÁNCHEZ-DELBARRIO ,J.C.;MESSEGUER, X & ROZAS,R. **DnaSP v5.10.1: A software for package for the analysis of nucleotide polymorphism from aligned DNA sequence data**. Universitat de Barcelona, Current Released Version: 5.10.1 (March 4, 2010).
- SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. Manaus: IBAMA. 2006.144 p.
- SANTOS, M. C. F. **Caracterização da diversidade genética de populações naturais de tambaqui (*Colossoma macropomum*) através de marcadores moleculares**: uma contribuição para conservação da espécie. 2010.171p. Tese de Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal do Amazonas – Manaus, 2010.
- SANTOS, M. C. F., RUFFINO, M. L., FARIAS,I.P. High levels of genetic variability and panmixia of tambaqui*Colossomamacropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology** v.71, p.33 – 44, 2007.
- SANTOS, S.et al. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**. v.15, p.4361-4373, 2006.
- SAURA, M. et al. Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) populations in the Ulla and Lérez rivers, Galicia, Spain. **ICES J. Mar. Sci.** v. 63, 1290-1296, 2006.
- SENHORINI J.A. et al. Larvicultura e alevinagem do pacu *Piaractus mesopotamicus* (Holmberg, 1887), tambaqui *Colossoma macropomum* (CURVIER, 1818) e seus respectivos híbridos. **Bol. Tec. CEPTA** v.1,p.19-30,1988.
- SILVA,C.A.;FUJIMOTO,R.Y. **A piscicultura familiar do tambaqui na região do Baixo São Francisco**.Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2012. 16 p, ISSN 1517-1329; 169.
- SILVA, T.J. **Marcadores moleculares para análise da variabilidade genética de populações do aruanã (*Osteoglossum bicirrhosum*)**.2009. 91p. Tese de Doutorado em Biotecnologia – Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.
- SIVASUNDAR, A., BERMINGHAM, E.;ORTI´, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology** ,v.10, p.407–417, 2001.
- TAMURA,K; STECHER,G.;PETERSON,G.; FILIPSKI,A. & KUMAR,S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**:30 2725-2729.
- VAZZOLER,A.E.A.M. **Biologia da Reprodução de Peixes Teleósteos: Teoria e Prática**. Maringá: EDUEM; São Paulo:SBI, 1996.169 p.
- VIEIRA, E.F., ISAAC, V.J., FABRÉ, N.N. Biologia Reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum*. Cuvier, 1818 (Teleostei, Serrasalmidae): no Baixo Amazonas, Brasil. **Acta Amazônica**, v. 29, n.4,p. 625-638,1999.
- VILLACORTA-CORREA, M. A.; SAINT-PAUL, U. Structural indexes and sexual maturity of tambaqui *Colossoma Macropomum* (CUVIER, 1818) (Characiformes: Characidae) in central Amazon, Brazil. **Rev. Brasil. Biol.**,v. 59,n.4,p. 637-652, 1999.

- WRIGHT, S. **Evolution and Genetics of Populations**. Chicago: University of Chicago, 1978. 511p.
- XIA, X. Maximizing transcription efficiency causes codon usage bias. **Genetics** v.144,p.1309-1320, 1996.
- XIN-HONG,G.,SHAO-JUN,L.; YUN,L.Evidence for maternal inheritance of mitochondrial DNA in polyploid fish of crosses by ATPase 8 and ATPase 6 genes.**Acta Zoologica Sinica**,v. 50,n.3,p.408–413, 2004.
- YAN,J.et al. Maternal inheritance in polyploidy fish inferred from mitochondrial ATPase genes analysis. **Progress in Natural Science**, v. 19,p. 693-698, 2009.
- ZADOYA,R.; MEYER, A. The complete sequence of the mitochondrial genome (*Protopterus dolloi*) supports its phylogenetic position as a close relative of land vertebrates.Genetics Society of America. **Genetics**, v.142 , p.1249-1263, 1996.

ANEXOS

ANEXO I

Wizard® Genomic DNA Purification Kit

INSTRUCTIONS FOR USE OF PRODUCTS A1120, A1123, A1125 AND A1620.

Quick
PROTOCOL

Isolation of Genomic DNA from Animal Tissue and Tissue Culture Cells

Prepare Tissues

Tissue Culture Cells: Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ for 10 seconds. Wash the cell pellet with PBS, vortex and then add 600 μl of Nuclei Lysis Solution and mix by pipetting.

Animal Tissue: Add 10–20mg of fresh or thawed tissue to 600 μl of chilled Nuclei Lysis Solution and homogenize for 10 seconds. Alternatively, use 10–20mg of ground tissue. Incubate at 65°C for 15–30 minutes.

Mouse Tail: Add 600 μl of chilled EDTA/Nuclei Lysis Solution to 0.5–1cm of fresh or thawed mouse tail. Add 17.5 μl of 20mg/ml Proteinase K and incubate overnight at 55°C with gentle shaking.

Lysis and Protein Precipitation

1. Add 3 μl of RNase Solution to the cell or animal tissue nuclei lysate and mix. Incubate for 15–30 minutes at 37°C. Cool to room temperature.
2. Add 200 μl of Protein Precipitation Solution. Vortex and chill on ice for 5 minutes.
3. Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ for 4 minutes.

DNA Precipitation and Rehydration

4. Transfer supernatant to a fresh tube containing 600 μl of room temperature isopropanol.
5. Mix gently by inversion.
6. Centrifuge at $13,000\text{--}16,000 \times g^*$ for 1 minute.
7. Remove supernatant and add 600 μl of room temperature 70% ethanol. Mix.
8. Centrifuge as in Step 6.
9. Aspirate the ethanol and air-dry the pellet for 15 minutes.
10. Rehydrate the DNA in 100 μl of DNA Rehydration Solution for 1 hour at 65°C or overnight at 4°C.

*Maximum speed on a microcentrifuge.

Additional protocol information is available in Technical Manual #TM050, available online at: www.promega.com

Cells or tissue
with Nuclei
Lysis Solution.



Add RNase
Solution.
Incubate at 37°C.



Add Protein
Precipitation
Solution.



Centrifuge.



Transfer
supernatant
to new tube
containing
isopropanol.



Centrifuge.



Discard
supernatant.
Add ethanol.



Centrifuge.



Aspirate ethanol.
Air-dry pellet.
Rehydrate DNA.

ANEXO II

H_1 (Cm01Iti) Haplótipo único

ATGCGCCAATTATACCCCGCCCCATGGAACGCCATCCTGGTATTCTCTTGACTAAGCTGGCTGACG
GTCATTCCACCCAAAGTCCTTTGACACACCTTCACTAATGAACCGACGACACTCAGCACTGAAAGA
CCAAAACCAAACCCTGAAACTGACCATGACACGAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACAT
ACTTAGGCATTTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAAT
CGGTGACTAAACAACCGAGTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAATA
CTCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCT
TATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACAT
AGGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGC
CCTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAAC
AATCAGCCTATTTATTGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCA
CTTACTATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATC
TTAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACG
TATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_2 (Cm02Iti) Haplótipo compartilhado

ATGCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAATACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
ATCAGCCTATTTATTGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
TACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_3 (Cm03Iti) Haplótipo único

ATGCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAATACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
ATCAGCCTATTTATTGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
TACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAGCCCTACGT
ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_4 (Cm04Iti) Haplótipo compartilhado

ATGCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAATACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA

GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAICTATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_5 (Cm06Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTGTCTAACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTTGACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CCAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAICTATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_6 (Cm07Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAAGCTGTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTTGACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAAAAAC
 CCAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCAAACA
 ATCACCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAICTATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTAAAATTTTCAGTAACCATAATCCAACCCTACTT
 ATTTTTTCTCCTACTAAACCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_7 (Cm08Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATACGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAAGCTGTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTTGACACACCTTCACTAATTGAACCAACGACACTCAGCAGTGAAAAAC
 CCAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAICTATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_8 (Cm09Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAAACGGGCTAACG
 GTCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAA
 CCAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACAT
 ACTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAAT

CGGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTA
 CTCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCT
 TATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACAT
 AGGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGC
 CCTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAAC
 AATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCA
 CTTACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATC
 TTAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACG
 TATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_9 (Cm13Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAAGCTGTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACGAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_10 (Cm15Iti) Haplótipo único

ATGCGCCAATTAACCCCGCCCCACGGAGCACCCCTCGCTGTATTCTCTTGATTAAGGGGGCTGACG
 GCCTTTCCACCTAAGGTCTGTTGACCCATCTTCACTAATGAACCTGCGTCACTCAGCACTGAAAGGC
 CAAAACCGAACCAGAACCTGACAATCACACTACCCTTCATAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTAATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCTTACTAAGCCTCTAGCTACAAGAAAACGTCTA

H_11 (Cm16Iti) Haplótipo único

ATGCGCCTATTAAACCCCGCCCCATGATTCCCCCTCCTGGTATTCTCCTGACTATGCTTGCTAACGG
 TTCTTCCACCTAAAGTCCGTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAACCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_12 (Cm17Iti) Haplótipo único

ATGCGCCTATTATACCCCGCCACATGGAACGCCTTCTGGTATTCTCTTGATTAAGCTGGCTAACGG

CCATTTACCCAAGGTCTGTTGACACACCTTCACTATTGAACCAACGACACTCAGCACTGAGGGAC
 CCACAACCAAACCTGAAACTGACCATGACACGAACCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAAC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_13 (Cm18Iti) Haplótipo único

ATGCGCCAATTATACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAAGCTGTCTGACGG
 TCATTCCACCCAAAGTCCTTTGACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAGAC
 CCACAACCAAACCTGAAACTGACCATGACACGAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_14 (Cm19Iti) Haplótipo único

ATGCGCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCGTGGTATTCTCCTGACTAAGCTGTCTGACGG
 TCATTCCACCCAAAGTCCTTAGACACACCTTCACTAATGAACCAGCGACACTCAGCACTGAAAAAC
 CCAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTACGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_15 (Cm22Iti) Haplótipo compartilhado

ATGCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CCAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACCTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCCTAATCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_16 (Cm24Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCGTTAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_17 (Cm27Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCGACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CCACAACCGAACCCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_18 (Cm30Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTGTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_19 (Cm35Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCGCCACATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCGGTCTGACGG
 TCATTCCACCCAAAGTCCCTTAGACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCCCGGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCCTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCAGCACCCCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_20 (Cm36Iiti) *Haplótipo único*

ATGCCCCAATTAAACCCCGCCACATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTCCTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGGCAC
TTACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAAAGACCACGGTAGCAATCT
TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_21 (Cm45Iiti) *Haplótipo único*

ATGCCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTCCTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
TTACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAACCCTACGT
ATTTTTTCTCCTACTAACCCTCTACCTACAAAAAACTTCTA

H_22 (Cm50Iiti) *Haplótipo único*

ATGCCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTGACGG
TCATTCCACCCAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTCCTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
ATCAGCCTATTTATTTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
TTACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGT
ATTTGTTCTCCTACTAAGCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_23 (Cm53Iiti) *Haplótipo único*

ATGCCCCAATTAAACCCCGCCCCATGATTTCGCCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTGACGG
CCATTCCACCCAAAGTCCTTAGACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
CCAAAACCGAACCCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
CTTAGGCATTCCTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCCCTCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC

CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCAAAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAAAGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACATTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAACCCTACCT
 ATTTTTTCTCCTACTAACCCTCTACCTACAAAAAACGTCTA

H_24 (Cm60Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTGACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTAGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTACCCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTTCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTAACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAAGCTCTACCTACAAAAAACGTCTA

H_25 (Cm80Iti) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCCGTACCACTAATCCCCGTATTAATCATTATCGAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCTACGT
 ATTTTTTCTCCTACTAAGCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_26 (Cm214Bet) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC
 TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
 ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
 GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
 CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCCGTACCACTAATCCCCCTATTAATCATTATCAAAAACA
 ATCAGCCTATTTATTCGACCCCTAGCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCAC
 TTAATCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCT
 TAACCGCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAACCCTACGT
 ATTTGTTCTCCTACTAACCCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA

H_27 (Cm215Bet) Haplótipo único

ATGCCCCAATTAACCCCCGCCCCATGATTGCGCATCCTGGTATTCTCCTGACTAATCTTTCTAACGG
 TCATTCCACCTAAAGTCCTTAAACACACCTTCACTAATGAACCAACGACACTCAGCACTGAGAAAC
 CAAAACCGAACCTGAAACTGACCATGACACTAAGCTTCTTCGACCAATTTATGAGCCCCACATA
 CTTAGGCATTCCTTTAATTGCTATCGCACTTGTATTTCCATGAATCCTTTACCCCTCACCATCAAATC
 GGTGACTAAACAACCGACTCATCACCTCCAAAGCTGACTTATTAACCGTTTTACACAACAACACTAC

TCCTCCCCCTCAACCCAGGCGGACATAAATGAGCCCTAATCTTAACCTCATTAAATAATCTTCCTCTT
ATCCATAAACCTATTAGGACTCCTCCCATATACTTTTACCCCAACGACGCAACTTTCACTAAACATA
GGATTAGCAGTTCCATTCTGACTAGCTACCGTAATTATTGGAATACGAAACCAACCCACCGCAGCC
CTAGGACACCTCCTACCAGAAGGAACCCCGTACCACTAATCCCCCTATTAATCATTATCAAAACA
ATCACCTATTTATTCAACCCCTACCCTTAGGCGTACGACTAACAGCCAACCTCACAGCCGGCCACT
TACTCATTCAACTCATCGCAACTGCAGCCTTCGTCCTGCTACCTATAATGACCACGGTAGCAATCTT
AACCCCCACAGTTCTCTTCCTCCTTACCCCTCCTTGAGATTGCAGTAGCCATAATCCAAGCCTACGTA
TTTGTTCTCCTACTAAACCTCTACCTACAAGAAAACGTCTA