

---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - INTEGRAL

---

**RICARDO LUIZ DALIA**

**VARIABILIDADE GENÉTICA E  
FILOGEOGRAFIA DE POPULAÇÕES DE  
*Prochilodus lineatus* (PISCES:  
PROCHILODONTIDAE) DAS BACIAS DOS  
RIOS PARAGUAI-PARANÁ E DA BACIA  
AMAZÔNICA: BASES PARA PROGRAMAS  
DE CONSERVAÇÃO E DE PISCICULTURA.**

RICARDO LUIZ DALIA

VARIABILIDADE GENÉTICA E FILOGEOGRAFIA DE POPULAÇÕES  
DE *Prochilodus lineatus* (PISCES: PROCHILODONTIDAE) DAS  
BACIAS DOS RIOS PARAGUAI-PARANÁ E DA BACIA AMAZÔNICA:  
BASES PARA PROGRAMAS DE CONSERVAÇÃO E DE  
PISCICULTURA

Orientador: Patricia Pasquali Parise Maltempi

Co-orientador: Edson Lourenço da Silva

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
ao Instituto de Biociências da Universidade  
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -  
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau  
de Bacharel em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2011

597

D143v

Dalia, Ricardo Luiz

Variabilidade genética e filogeografia de populações de *prochilodus lineatus* (pisces: prochilodontidae) das bacias dos rios Paraguai-Paraná e da Bacia Amazônica: bases para programas de conservação e de piscicultura / Ricardo Luiz Dalia. - Rio Claro : [s.n.], 2011  
65 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots., mapas

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas Integral) -  
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro

Orientador: Patricia Pasquali Parise Maltempi

Co-Orientador: Edson Lourenço da Silva

1. Peixe. 2. Atpase. 3. Mitochondrial. 4. Conservação. 5. mtDNA. 6. Curimbatá. I. Título.

# AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço meus pais, por tudo que me proporcionaram e sacrificaram por mim. Por todo amor que me deram sou muito agradecido. Também agradeço a toda minha família especialmente meu tio Beto, minhas avós Hilda e Dalva, meu primo Roberto e minhas primas Alessandra e Carolina.

Agradeço a minha orientadora Patrícia, que me deu essa oportunidade, permitindo que eu trabalhasse e com isso descobrir um ramo que tanto adoro na biologia. Agradeço as ajudas, as correções e peço desculpas por todo o trabalho e dor de cabeça que causei. Também ao professor Anderson, que me ajudou nesse em outros projetos, sem ele não teria como esse projeto ser feito e finalizado. Também a todos os professores que me ajudaram na minha vida acadêmica, são muitos, mas todos foram importantes para mim.

Um agradecimento especial ao meu amigo e co-orientador Edson, que me ensinou diversas coisas, sempre esteve lá para me ajudar em todos os momentos. Com muita paciência me levou para todos os lugares e tiramos o melhor deles. Também agradeço a sua família toda por me ajudar e abrir as portas de sua casa quando precisei.

Também sou muito agradecido por todos os meus colegas de laboratório Dany, Gabi, Pó, Diovanni, Jaqui, Duda, Bauru, Thiago, Simone, Annelise e Nádia por toda ajuda e tempos bons. Um agradecimento especial ao Allan e a Josi, que me ajudaram muito, sempre com disposição e bom humor em todos os momentos, meus agradecimentos sinceros a vocês.

Agradeço também aos meus colegas de classe, que juntos passamos por muitos momentos nesses 4 anos, especialmente a Bia, Noemi, Marcela, Brioco, Pajé, Aline, Isabele, Amanda, a outra Amanda e a última Amanda.

Ao meu bom amigo Danilo, um grande abraço por toda a paciência e ajuda por toda essa, que ajudou muito na minha vida acadêmica além da amizade. Agradeço também ao Piko, Marombes, Mendes, Greg, Mario, Fernandes, Giovana, Gabizinha e a todos outros amigos meus, por compartilharem dessa vida comigo.

A minha namorada, Ana Paula, amor da minha vida, que me ajudou e meu deu tanto amor por todo esse tempo, por todos os caminhos estaremos juntos além do agradecimento um beijo. Também a toda sua família, que sempre me tratou muito bem, especialmente a minha sogra Cláudia que sempre se preocupou comigo e sempre me ajuda e me procura para saber como estou.

Por último agradeço a todos que ficaram de fora, não por não merecerem, mas simplesmente pela minha falta de memória nesse momento.

Também agradeço você, que está lendo isso, talvez eu não saiba quem você é ou por que está lendo essas palavras e as próximas, mas você tem meus agradecimentos.

Obrigado.

“Der Vorteil des schlechten Gedächtnisses ist, dass man dieselben guten Dinge mehrere Male zum ersten Mal genießt.”

“A vantagem de ter péssima memória é divertir-se muitas vezes com as mesmas coisas boas como se fosse a primeira vez.”

**Friedrich Wilhelm Nietzsche**

# SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1 – O gênero <i>Prochilodus</i></b> .....	<b>11</b>
<b>1.2 – Marcadores Moleculares</b> .....	<b>12</b>
<b>1.3 – Filogeografia e sistemática molecular de peixes neotropicais</b> .....	<b>14</b>
<b>1.4 – Justificativa</b> .....	<b>16</b>
<b>2 – OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3 – MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 – Materiais</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 – MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.1 – Coleta da amostra</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.2 – Extração de DNA</b> .....	<b>24</b>
<b>3.2.3 – Amplificação do DNA</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2.4 – Limpeza do produto de PCR</b> .....	<b>28</b>
<b>3.2.5 – Sequenciamento das amostras</b> .....	<b>29</b>
<b>3.2.6 – Análises das Seqüências</b> .....	<b>29</b>
<b>4 – RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
<b>4.1 – Composição nucleotídica das seqüências do gene ATPase 6/8</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2 – Análises filogenéticas das populações de <i>P. lineatus</i> e <i>P.nigricans</i></b> .	<b>33</b>
<b>4.3 – Distâncias e variações genéticas populacionais</b> .....	<b>37</b>
<b>5 – DISCUSSÃO</b> .....	<b>42</b>
<b>6 – CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>49</b>
<b>8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>

## Lista de Figuras

- Figura 1:** Exemplar de *Prochilodus lineatus*. ..... 17
- Figura 2:** Mapa das principais hidrovias do Brasil e próximas do mesmo, destacando os pontos de coleta..... 23
- Figura 3.** Árvore consenso a partir da análise de “Neighbor Joining” para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e de *S. brasiliensis* com base na seqüência completa do gene ATPase 6/8..... 34
- Figura 4.** Árvore consenso a partir da análise de “Minimum Evolution” para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e de *S. brasiliensis* com base na seqüência completa do gene ATPase 6/8..... 35
- Figura 5.** Árvore consenso a partir da análise de “Máxima Parsimônia” para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e de *S. brasiliensis* com base na seqüência completa do gene ATPase 6/8..... 36
- Figura 6. (1)** Rede de Haplótipos evidenciando os haplótipos e as mutações; **(2)** Tabela contendo o número de espécimes e origem dos mesmo de cada haplótipo presente na rede de haplótipos) ..... 39
- Figura 7.** Mapa assinalando os grupos formados pela rede de haplótipos e os rios. Grupo 1 (marcação em vermelho) compreendendo o Rio Paraguai e o Alto Rio Paraná. Grupo 2 (marcação em verde) compreendendo o Baixo Rio Paraná. Grupo 3 (marcação em preto) Rio Uruguai. .... 41
- Figura 8.** Rede de Haplótipos evidenciando os haplótipos, as mutações e os grupos que se formaram e os rios correspondentes. .... 44
- Figura 9.** Mapa assinalando a provável rota de migração e colonização de *P. lineatus*.45

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Amostras de <i>P. lineatus</i> coletadas.....	<b>21</b>
<b>Tabela 2.</b> Seqüências de <i>P. lineatus</i> e <i>P. nigricans</i> obtidas através do National Center for Biotechnology Information – GenBank.....	<b>22</b>
<b>Tabela 3.</b> Freqüência da composição nucleotídica do gene ATP sintetase 6 e 8 para os espécimes de <i>P. lineatus</i> , <i>P. nigricans</i> e <i>S. brasiliensis</i> . ....	<b>32</b>
<b>Tabela 4.</b> Tabela de haplótipos e espécime correspondente.....	<b>37</b>

## RESUMO

A espécie *Prochilodus lineatus*, considerada um migrador por excelência, possui intensa ocorrência durante a migração reprodutiva. São peixes de elevado valor econômico e a sua adaptação em cativeiro os tornam altamente interessantes para desenvolvimento de programas de piscicultura. O monitoramento regular das variações genéticas nos estoques é importante em programas de conservação, evitando o declínio da variabilidade genética, essencial para a conservação das espécies. No entanto, os poucos dados moleculares populacionais para *Prochilodus lineatus* justificam a presente proposta. Nesse sentido, tivemos como objetivo caracterizar a variabilidade genética e estabelecer as relações filogeográficas entre 6 populações de *P. lineatus* das bacias dos rios Paraguai (2 do rio Paraguai e 3 do rio Cuiabá, MT) e Paraná (1 do rio Mogi-Guaçu, SP), num total de 34 indivíduos. Outros 16 indivíduos dos rios: da Prata, Uruguai, Paraná, Bermejo, Paraguai, Amazonas e Madeira, cujas sequências foram obtidas do National Center for Biotechnology Information (Genbank), foram analisados, totalizando assim, 50 indivíduos. Como grupo externo foi utilizado *Salminus brasiliensis*. O estudo foi realizado através das análises das sequências do gene mitocondrial ATPase 8/6. O interesse do uso de um gene mitocondrial está na vasta literatura que esse possui em análises filogenéticas e na confiança que existe nos dados gerados de tais análises. O gene citado foi completamente sequenciado (842pb), as análises filogenéticas foram conduzidas pelos métodos “Neighbor Joining (NJ)”, “Minimum Evolution (ME)” e “Máxima Parcimônia (MP)”, com 1000 réplicas de bootstrap no programa MEGA 5.0. Para análises filogeográficas as sequências foram analisadas no programa TCS e no programa Arlequin. Os resultados auxiliarão em uma melhor compreensão da história evolutiva, migração, estrutura genética e estrutura populacional de espécie. Tais conhecimentos propiciarão melhores medidas de conservação para a espécie e populações da mesma.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



# INTRODUÇÃO

## **1 – INTRODUÇÃO**

No planeta em que vivemos, cerca de 70% da superfície é coberta por água, seja por mares ou rios. Entre os animais que vivem nesse meio toda a sua vida ou parte dela, os peixes se destacam, pois correspondem a cerca de 50% dos vertebrados (NELSON, 1994).

Outros fatores que tornam os peixes tão importantes são suas impressionantes especializações morfológicas, fisiologias, comportamentais (PURDOM, 1993) e o fato de formarem a maior unidade entre os vertebrados, apresentando mais de 32.000 espécies reconhecidas (ABE, 2011), sendo que, aproximadamente, metade dessas espécies é de água doce (ESCHMEYER et al., 2010).

O pescado apresenta grande importância para os seres humanos, por ser a parte principal da alimentação de certas populações e culturas humanas, ser a forma de sustento de várias pessoas e comunidades e também por sua grande participação na economia mundial (MACHADO, 2007). Porém, faz anos que se tem notado uma queda na quantidade de peixes pescados e cardumes encontrados (FAVERET FILHO & SIQUEIRA, 1997; ALLAN et al., 2005).

Vários estudos apontam diversas razões para a queda no número de peixes, sendo as principais a construção de barreiras ou hidrelétricas (AGOSTINHO et al., 2007), crescimento do turismo irregular, a expansão imobiliária nas costas e margens, a poluição de águas, o aterro de mangues e a destruição de muitos locais de pesca, além da pesca predatória (FAVERET FILHO & SIQUEIRA, 1997; MACHADO, 2007). Essas atividades acabam por escurecer as águas, modificar habitats, obstruir rios, impedir a migração de animais aquáticos e isolar populações de diferentes partes de rios (POZZOBON, 2009).

Animais que perderam suas rotas de migração acabam por ter seu ciclo de vida modificado, incapacitado de chegar a região de alimentação e deixando de reproduzir de forma correta ou em local apropriado. Muitas vezes, barragens e

hidrelétricas, escolhem pela construção das “escadas para peixes”, que funcionam, como o nome já diz, como uma escada por onde os peixes podem atravessar a região bloqueada e seguir sua rota normal de migração. Porém, algumas vezes essas escadas acabam por causar mais danos do que por ajudar os peixes, pois esses não reconhecem prontamente a entrada da escada, podendo permanecer em suas imediações por tempo prolongado, atrasando a migração e comprometendo a desova, ou mesmo jamais acessá-la (KUSMA & FERREIRA, 2010). Algumas vezes os peixes acabam por entrar nas escadas, mas são incapazes de subir toda a extensão delas.

Populações que foram isoladas física e geneticamente acabam por sofrer com uma queda no número de espécimes que a compõem e diminuição no número de intercruzamento e de variabilidade genética, o que pode acabar por gerar a extinção de tal população (SHAFFER, 1981; BROOK et al., 2002; MORITA et al., 2009).

Os fatores citados não só afetam o número de indivíduos, mas a biodiversidade. Uma queda na biodiversidade mostra que existe uma necessidade por maiores e melhores projetos de conservação (TEMPLETON, 1993).

Esses organismos afetados pelos seres humanos acabam por sofrer grandes estresses e pressões. Organismo nessas condições acabam por ter suas funções fisiológicas normais alteradas, o que pode contribuir para a não ocorrência da desova. Ovenden et al. (2009) salienta que é necessário um conhecimento detalhado de aspectos da biologia e genética desses organismo sobre pressão, pois as análises genéticas de suas populações são pontos importantes para a sua conservação e exploração sustentável.

O estudo da estrutura genética de espécies de peixes, além de ser de grande importância para medidas de preservação e de pesca sustentável, também é muito útil em criadouros, permitindo que esses consigam criar matrizes saudáveis, de interesse econômico e reproduzir com eficácia espécies em cativeiro a longo prazo.

### 1.1 – O Gênero *Prochilodus*

O gênero *Prochilodus* é um dos gêneros mais comuns e altamente dispersos da América do Sul (KOBBERSTEIN et al., 2001) presente em todas as bacias hidrográficas brasileiras (CASTRO, 1991). Atualmente, são consideradas para *Prochilodus* 13 espécies nominais (TURNER et al., 2004). Grande parte da abundância desse grupo pelas águas da América do Sul se deve a grande capacidade migratória de suas espécies (WELCOMME, 1979).

*Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836), também conhecido como curimatá, corimba, curimatã e grumatão é uma espécie relativamente grande, apresentando indivíduos com até 75 cm de comprimento e 8,2 Kg de peso (GODOY, 1975). É considerada a mais comum do Pantanal, apresenta característica reofílica em sua época de reprodução coincidindo com o período de chuvas (novembro a janeiro) na planície de inundação do Pantanal (BRITSKI, 1999).

Possuem alta capacidade reprodutiva, crescimento rápido, além de boa aceitação no mercado (ADRIANO et al., 2005) e em função da fácil reprodução em cativeiro tem sido exploradas comercialmente em pesqueiros (LOWE-MCCONNELL, 1975; BRITSKI, 1972; GODOY, 1975; GOULDING, 1981; VARI, 1983; CASTRO, 1993; OLIVEIRA et al, 1997; GARCEZ et al, 2005)

As populações naturais de *P. lineatus* têm apresentado uma queda nos últimos anos. Vários fatores têm contribuído para essa queda, sendo que as principais são a contaminação dos rios (MONTEIRO et al., 2006), a construção de usinas hidrelétricas (AHO et al., 2006), a sobrepesca (POVH, 2007) e o ecoturismo mal planejado (METZGER & CASATTI, 2006).

### 1.2 – Marcadores Moleculares

O advento da genética permitiu novos meios para se realizar estudos taxonômicos, além de também permitir desvendar mudanças evolutivas, eventos

ocorridos no passado das espécies e, com isso, nasce uma possibilidade de se melhor entender as relações genéticas entre espécies distintas e dentro das espécies (PONZETTO, 2010). Uma das ferramentas utilizada para tais estudos são os marcadores moleculares.

Um marcador molecular é todo fenótipo molecular expresso por um gene ou de um segmento específico de DNA, que possa ser evidenciado, sendo que um marcador molecular pode ser de uma região com capacidade de ser expressa (gene), ou não (SCHLÖTTERER, 2004).

Os primeiros marcadores moleculares foram desenvolvidos para se determinar a presença de aloenzimas (termo que designa as várias formas protéicas sintetizadas por alelos distintos de um mesmo loco cromossômico) em *Drosophila* (SCHLÖTTERER, 2004). Embora os marcadores moleculares de aloenzimas sejam utilizados até os dias atuais, eles acabam por possuir restrições muito marcantes ao seu uso nas análises genéticas, pois são muito insensíveis em demonstrar mudanças nos segmentos de DNA e não evidenciam tais mudanças diretamente. Devido a tais limitações, novos marcadores foram criados com a função de estudos genéticos.

Em 1960 Arber, Smith e Nathans descobriram e isolaram pela primeira vez enzimas que eles chamaram de enzimas de restrição. Tais enzimas seriam utilizadas futuramente em uma nova técnica para detectar marcadores moleculares, chamada de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Na técnica de RFLP, o DNA de interesse é fragmentado através do uso de enzimas de restrição e os fragmentos são separados e visualizados em gel de agarose, assim podendo se comparar alelos normais e afetados para cada mutação estudada. A técnica se tornou popular, pois as enzimas de restrição são previsíveis, pouco frequentes e clivam fragmentos sítio-específicos de DNA. Técnicas novas, baseadas, na RFLP surgiram posteriormente, como a RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA), os microsátélites e a AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism).

O desenvolvimento desses novos marcadores moleculares têm permitidos estudos que melhor expliquem as estruturas genéticas que formam as populações e espécies. Marcadores se tornaram tão versáteis que podem ser usados em uma infinidade de estudos e teste, desde reconstruções filogenéticas até testes de paternidades (SCHLÖTTERER, 2004).

Existem inúmeras técnicas dentro da genética molecular, porém, a que melhor tem gerado resultados nas análises de estruturação de populações ou subdivisão populacional e identificado as variações geográficas entre populações, tem sido o sequenciamento de DNA (HILLIS et al., 1996). Isso se deve ao fato de as técnicas de extração e posteriores sequenciamentos já se encontrarem bem descritas na literatura e por que o material genético guarda, como já citado, a história evolutiva da espécie e a relação existente entre indivíduos de uma mesma espécie ou não e o sequenciamento do material genético permite um estudo mais aprofundado e específico, possibilitando a visualização da mudança de vários ou somente um par de base.

O sequenciamento de DNA permite que se saiba a ordem exata dos nucleotídeos que compõem o genoma, gene ou parte não expressa de uma molécula de DNA. Frederick Sanger desenvolveu a técnica para se seqüenciar DNA mais utilizada até poucos anos, em 1977 na Inglaterra. Novas técnicas e equipamentos foram desenvolvidos e o método descrito por Sanger tem entrado cada vez mais em desuso, porém, as novas tecnologias ainda possuem limitações e em alguns casos a técnica de Sanger continua em uso.

Para os estudos filogenéticos, os genes mitocondriais têm se mostrado os mais confiáveis e úteis, pois esses têm se apresentando extremamente conservados em animais, variando de 14 a 26 kb (BILLINGTON et al., 1991). Ponzetto (2010) utilizou marcadores moleculares no gênero *Simpsonichthys* (CARAVALHO, 1959) para testar à hipótese da subdivisão do gênero e identificar o padrão filogeográfico histórico de distribuição das espécies que compõem esse gênero, sendo que esta

espécie está presente desde o sul da Flórida até o sul da Patagônia (COSTA, 2006; NIELSEN, 2008) e assim buscando contribuir com a conservação do gênero.

Além do trabalho de Ponzetto, existem vários outros trabalho que utilizaram genes mitocondriais em estudos filogenéticos (PATERNELLO et al, 2003; COSTA, 2006 ;Abe, 2011), filogeográficos (AVISE, 1987; CASTRO, 1991; SIVASUNDAR, 2001; STRECKER et al, 2004; PELLEGRINO, 2005), taxonômicos (CASTRO, 1993; POZZOBON, 2009; RODRIGUES, 2010) e para conservação (BERMINGHAM et al.; FALK et al., 1998; KOTLIK et al., 2002; PATERNELLO et al., 2003; PERDICES et al., 2004; STRECKER et al., 2004; WANG et al., 2004; BATISTA et al., 2006; HUBERT et al., 2007; WILLIS et al., 2007).

Os marcadores moleculares revelam a história da divergência populacional e dispersão das espécies e tais conhecimentos são muito úteis para estudos de manejos de conservação e de exploração econômica. Um conhecimento mais profundo da estruturação das espécies é necessário para melhores programas de conservação e programas de criação em cativeiro tanto para consumo quanto para repovoamento das reservas naturais.

### **1.3 – Filogeografia e sistemática molecular de peixes neotropicais**

O estudo de haplótipos de DNA mitocondrial permite delimitar localizações geográficas de populações diferentes que compõem uma mesma espécie (AVISE et al., 1987), permitindo a introdução de uma dimensão filogenética nas discussões sobre a estrutura das populações. Tais estudos são de grande importância, pois permitem criar uma ligação direta entre as mudanças que ocorrem nos ambientes e a evolução das espécies que habitam tais locais, já que a dispersão das espécies de peixes está diretamente relacionada com as interligações e morfologias dos rios (LUNDBERG 1993; BERMINGHAM et al., 1998; WANG et al., 2004). Em 1987, O termo, criado para para se determinar tais tipos de estudos, é a filogeografia.

A filogeografia é uma associação da genética populacional, a biogeografia e a filogenia molecular no estudo dos polimorfismos de genes em populações de uma espécie ou entre espécies próximas (AVISE et al., 1987; AVISE, 1998). A filogeografia é de vital importância para estudos comparativos entre eventos e a história evolutiva das espécies com a biodiversidade atual e impactos ambientais.

Na reconstrução filogenética, o uso do DNA tem se mostrado muito eficaz, por essa razão, tais metodologias têm sido amplamente empregadas em várias abordagens evolutivas, tais como nos estudos de fluxo gênico, especiação, sistemática e estrutura de populações (AVISE, 1994).

Um conhecimento profundo sobre a região do DNA utilizada na pesquisas filogenéticas é importante, pois a quantidade e o tipo de polimorfismo no DNA são informativos para a história de uma população, além dos mecanismos que produziram tais diferenças e as mantiveram (LI, 1997).

Os genes mitocondriais são amplamente usados em estudos de genética populacional e filogenia. Variabilidades presentes em genes mitocondriais de evolução rápida são úteis na investigação de táxons que divergiram em tempos geológicos mais recentes (AVISE 1994, SIMON et al. 1994, PAGE e HOLMES 1998). O DNA mitocondrial é caracterizado pela herança uniparental, a ausência de recombinação e as altas taxas evolutivas (quando comparado ao DNA nuclear). Essas características são o que o torna tão interessante em estudos filogenéticas de relações evolutivas entre indivíduos, espécies e populações (CALCAGNOTTO, 2004), além de ser muito utilizado em estudos designando unidades para conservação genética e populacional de espécies (AVISE 2000; CRANDALL et al. 2000; MORITZ 2002).

Os genes ATPase 6 e 8 tem se tornado os marcadores moleculares mais utilizados, devido a confiabilidade dos resultados e por recuperarem relações filogenéticas entre espécies relacionadas até níveis genéticos superiores (RODRIGUES, 2010).

Em um trabalho envolvendo o gênero *Rhamdia* (BLEEKER, 1858) por Perdices et al. (2002) na América Central, as inferências filogenéticas mostraram que *R. nicaraguensis* (GÜNTHER, 1864) é sinônimo de *R. laticauda* (KNER, 1858) e sugeriram dois clados para a América Central, *R. guatemalensis* e *R. laticauda* e não três como sugeria Silfvergrip (1996). Os autores ainda restringem a distribuição de *Rhamdia quelen* (QUOY & GAIMARD, 1824) apenas para a região cis-Andina da América do Sul, diferindo de Silfvergrip (1996) e Bockmann et al. (2003).

Para testar está hipótese filogeográfica de *Rhamdia quelen*, Alves et al. (2007; submetido) analisaram populações desta espécie ao longo das bacias da Plata, Amazônica, Orinoco e Essequibo na América do Sul, e além de confirmar a hipótese de que *Rhamdia quelen* não está presente na América Central e na porção trans-Andina da América do Sul, os autores ainda observaram 11 linhagens mitocondriais na região cis-Andina da América do Sul distintas geneticamente, sugerindo a ocorrência de um complexo de espécies, principalmente nas bacias dos rios costeiros e do Alto rio Paraná.

Embora estudos com enfoque filogeográfico tenha crescido nos últimos anos, ainda existe uma falta desse tipo de estudo em peixes de água doce na América do Sul (SIVASUNDAR et al., 2001) e mesmo os estudos que já existem sobre o assunto, vários acabam por focar em um número pequeno de rios ou em uma área geográfica pequena, quando comparada com a região onde a espécie estudada habita.

#### 1.4 – Justificativa

Devido à grande importância econômica e social da espécie *P. lineatus* existe a necessidade de melhores estudos da mesma dentro do território brasileiro. Devido à atual falta de dados moleculares populacionais para esse grupo e os poucos dados se encontrarem desatualizados, novos estudos e prognósticos precisos acabam afetados.

Um entendimento melhor da capacidade migratória do *Prochilodus lineatus* nos permite saber como ocorreu a sua dispersão pela América e também conhecer melhor as ligações entre os rios da América do Sul e assim realizar melhores previsões em futuras obras, impactos ambientais e a migração de outras espécies pelos rios. Dados que facilitarão a preservação da espécie e de outras parecidas ou ligadas ao *P. lineatus*, além de melhor se monitorar a variabilidade genética dessa espécie nos rios, o que permite se identificar declínios ou divergências genéticas.



**Figura 1.** Exemplar de *Prochilodus lineatus* retirado de [www.conhecaopantanal.com.br/index.php?modulo=RkFVTkFfRkxPUkE=&categoria=4&id\\_fauna\\_flora=13](http://www.conhecaopantanal.com.br/index.php?modulo=RkFVTkFfRkxPUkE=&categoria=4&id_fauna_flora=13).



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



# OBJETIVOS

## 2 – OBJETIVOS

O trabalho considerou a seguinte hipótese e objetivos específicos para a realização do trabalho:

### Hipótese:

- “Nas bacias dos rios Amazonas, Paraguai, Paraná e Uruguai, as populações de *Prochilodus lineatus* apresentam uma estrutura panmítica, sem restrições migratórias e reprodutivas, sendo assim, ocorrem poucas variações genéticas na espécie em toda América Latina”.

### Objetivos Específicos:

- Obtenção de mais dados moleculares populacionais de *Prochilodus lineatus* e atualizados ao longo dos rios Paraguai e Cuiabá, adquirindo assim novos dados sobre as reservas genéticas dessa espécie.
- Estabelecer relações filogenéticas e filogeográficas entre as populações coletadas e as amostras obtidas do National Center for Biotechnology Information – Genbank e com isso se determinar se a população da espécie é estruturada ao longo desses rios ou se é panmítica.
- Determinar a possível origem da espécie e a dispersão da mesma através da América do Sul.



# MATERIAIS E MÉTODOS

### 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 – Materiais

As amostras foram coletadas em rios que compõem as sub-bacias dos rios Paraguai, Cuiabá e Tietê (Figura 2), sendo, um ponto estabelecido no Rio Paraguai, no município de Barra do Bugres, dois no Rio Cuiabá, um em São Gonçalo que é uma comunidade tradicional de pescadores próxima a cidade de Cuiabá e um no município de Santo Antônio do Leverger, além de um ponto no Rio Cuiabazinho, principal afluente do rio Cuiabá. Na bacia do rio Tietê, uma amostragem foi realizada no Rio Mogi Mirim. Sequências de indivíduos dos rios, da Prata, Uruguai, Paraná, Bermejo, Paraguai, Amazonas e Madeira foram obtidas através do National Center for Biotechnology Information – Genbank (Tabela 02).

**Tabela 1.** Amostras de *P. lineatus* coletadas.

Rio	Sub-Bacia	Localidade	Nº de Amostras
Rio Cuiabá	Cuiabá	São Gonçalo	10
Rio Cuiabá	Cuiabá	Santo Antonio do Leverger	05
Rio Cuiabazinho	Cuiabá	*	03
Rio Paraguai	Paraguai	Cáceres	02
Rio Paraguai	Paraguai	Barra do Bugres	04
Rio Mogi-Guacu	Tietê	*	05
<b>Total de Amostras</b>			<b>29</b>

\* As amostras foram coletadas em pontos distantes de áreas habitadas, logo não possuem identificações de localidades.

**Tabela 2.** Sequências de *P. lineatus* e *P. nigricans* obtidas através do National Center for Biotechnology Information – GenBank.

<b>Rio</b>	<b>Cidade</b>	<b>País</b>	<b>Amostra</b>	<b>Identificação</b>
Rio da Prata	Buenos Aires	Argentina	PRliARth1	AF281827
Rio Paraná	Bella Vista	Argentina	PRliBRpr2	AF281828
Rio Paraná	Bella Vista	Argentina	PRliARpr2	AF281830
Rio Paraná	Bella Vista	Argentina	PRliARpr1	AF281831
Rio Paraná	Bella Vista	Argentina	PRliBRpr1	AF281835
Rio Paraguai	Riacho Mercedes	Argentina	PRspARpa1	AF281829
Rio Paraguai	Riacho Mercedes	Argentina	PRspARpa2	AF281838
Rio Paraguai	Corumbá	Brasil	PRliBRcr1	AF281832
Rio Paraguai	Corumbá	Brasil	PRliBRcr2	AF281836
Rio Paraguai	Asuncion	Paraguai	PRliPAas1	AF281833
Rio Bermejo	Embaracacion	Argentina	PRliARem1	AF281834
Rio Uruguai	Gualeduaychu	Argentina	PRliARgu1	AF281837
Rio Uruguai	Salto Grande	Argentina	PRliARsg1	AF281839
Rio Amazonas	Manaus	Brasil	PRniBRpt1	AF281840
Rio Madeira	Manu	Peru	PRniPEma1	AF281841
Rio Madeira	Manu	Peru	PRniPEma2	AF281842



## 3.2 – MÉTODOS

### 3.2.1 - Coleta da amostra

Dos peixes foi retirada uma pequena parte de uma das nadadeiras laterais, o suficiente para a extração do DNA e preservação do tecido, mas sem que isso causasse a morte do animal ou dificuldades do mesmo na sua locomoção pela água. Após a retirada do tecido, os animais foram devolvidos ao rio. O tecido extraído então foi conservado em álcool 70% à -20°C em microtubos de 1,5 mL.

### 3.2.2 - Extração de DNA

O DNA total foi obtido utilizando-se a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico descrita por Sambrook e Russell (2001) da seguinte forma:

#### 1. Preparação da solução de lise:

<b>SOLUÇÕES</b>	<b>VOLUME/AMOSTRA</b>
TNE 1X	300µL
Tris-HCl 1M (pH 8,0)	30 µL
SDS 10%	20 µL
Proteinase K (20 mg/mL)	25 µL
<b>Volume Final</b>	<b>375 µL</b>

2. As amostras de tecido foram trituradas com a ajuda de um micropistilo e postas em um microtubo junto com a solução de lise previamente. Cada tubo foi agitado em um vórtex por 15 segundos.

3. As amostras foram deixadas em estufa regulada à 37°C *overnight*. Após esse período, foram adicionados 8 µL de RNase 10 mg/mL.
4. As amostras foram mantidas com a RNase em estufa regulada a 37°C por 1 hora, agitando os tubos em vórtex após a adição de RNase e após 30 minutos.
5. Em uma capela foram adicionados 400 µL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25/24/1) aos tubos contendo o tecido digerido.
6. Os tubos foram agitados em vórtex por 30 segundos e, em seguida, centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos.
7. Os tubos foram retirados da centrífuga com cuidado para não misturar as fases e a fase sobrenadante (fase aquosa contendo o DNA) foi transferida, para um novo tubo, com o auxílio de uma micropipeta.
8. Foram adicionados 60 µL de acetato de sódio 3M (pH 5,3) a cada tubo e cada tubo foi invertido lentamente para misturar completamente o sal com a solução de DNA.
9. Foram adicionados 600 µL de etanol absoluto gelado a cada tubo e cada tubo foi invertido lentamente para misturar completamente o álcool com a solução de DNA.
10. Os tubos foram mantidos a -20°C por 30 minutos. Após o término desses 30 minutos, os mesmos foram centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos.
11. Com cuidado para não desprender o “pellet” (precipitado de DNA) do fundo do microtubo, o sobrenadante contendo a mistura de etanol + acetato de sódio foi descartado.
12. Foram adicionados 150 µL de etanol 70% à temperatura ambiente e os tubos foram novamente centrifugados à 14.000 rpm por 30 minutos.

13. Com cuidado para não desprender o “pellet” do fundo do microtubo, o sobrenadante foi descartado e adiciono novamente 150  $\mu$ L de etanol 70% à temperatura ambiente e novamente centrifugado à 14.000 rpm por 30 minutos.
14. O sobrenadante cuidadosamente descartado.
15. Os “pellets” foram secos em estufa à 37°C por 30 minutos.
16. O DNA foi ressuspenso em 100  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada e agitando delicadamente o tubo para soltar o “pellet” sem danificar o DNA.
17. O DNA ressuspenso foi mantido em estufa à 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferidos para a geladeira (4°C) e mantidos *overnight*.
18. O DNA completamente ressuspenso foi armazenado à -20°C para conservação por longo prazo.

As amostras de DNA extraídas foram aplicadas em gel de agarose 1,0%, corados com 2  $\mu$ L de SYBER Safe (10.000X, Invitrogen®), em 1  $\mu$ L de tampão de corrida *Blue Juice* (10X) e visualizados em um transluminador de luz ultravioleta, verificando a qualidade da extração.

### 3.2.3 - Amplificação do DNA

Os genes mitocondriais ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8) incluindo sequências conservadas de tRNA (RNA transportadores) que flanqueiam este complexo de genes que possuem 842 pares de bases ao todo, foram amplificados utilizando o conjunto de primers **L-8331** (5'- AA GCR TYR GCC TTT TAA GC-3'), **H-9236** (5'- GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC-3') desenvolvidos por Eldredge Birmingham (<http://striweb.si.edu/bermingham/research/primers/index.html>). A reação de PCR foi realizada em um termociclador de marca EPPENDORF®, modelo MasterCycler EP Gradient.

A reação de amplificação foi a seguinte:

SOLUÇÕES	VOLUME/AMOSTRA
* Mix PCR (Qiagen®)	6,25 µL
Água Milli-Q	5,25 µL
Primer F 10 µLM	0,5 µL
Primer R 10 µLM	0,5 µL
DNA	1,0 µL
<b>Volume Final</b>	<b>13,5 µL</b>

\*Na solução de Mix PCR (Qiagen) estão contidos os reagentes Taq DNA Polimerase 5U, tampão de enzima 10X, MgCl<sub>2</sub> 1,5mM e dNTP 200 µM.

O programa utilizado no termociclador para esse gene apresentou os seguintes tempos e temperaturas:

ETAPA	TEMPERATURA/TEMPO	
1 <sup>a</sup>	94°C / 2 minutos	} 1 ciclo
2 <sup>a</sup>	94°C / 45 segundos	
3 <sup>a</sup>	55°C / 45 segundos	} 35 ciclos
4 <sup>a</sup>	68°C / 90 segundos	
5 <sup>a</sup>	72°C / 5 minutos	} 1 ciclo
<b>Tempo Total</b>	<b>112 minutos</b>	

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose, seguindo as mesmas especificações utilizadas no gel já citado na extração de DNA. A quantificação do produto gênico amplificado foi realizada utilizando o marcador de peso molecular comparativo Lambda ( $\lambda$ ) DNA 30ng e 50ng em gel de agarose.

### 3.2.4 – Limpeza do produto de PCR

Para as análises de sequências, o DNA amplificado foi purificado pelo tratamento com a enzima EXOSAP-IT(GE Healthcare) através do protocolo:

1. Limpar 10  $\mu$ L do produto de PCR, adicionando 2  $\mu$ L de EXOSAP e 2  $\mu$ L de água Milli-Q autoclavada.
2. Levar os microtubos ao termociclador com o seguinte programa:

ETAPA	TEMPERATURA/TEMPO	
1 <sup>a</sup>	37°C / 60 minutos	} 1 ciclo
2 <sup>a</sup>	80°C / 15 minutos	
<b>Tempo Total</b>	<b>75 minutos</b>	

3. Os tubos foram retirados do termociclador e dois novos microtubos foram preparados, aliquotando 5  $\mu$ L do DNA limpo em cada tubo novo e adicionando 2,5  $\mu$ L de *primer forward* (F) a um tubo e 2,5  $\mu$ L de *primer reverse* (R) ao outro.

### 3.2.5 – Sequenciamento das amostras

O DNA purificado foi sequenciado com o kit *DYEnamic ET terminator reagent premix* para MEGABACE (Amersham Biociences) e em um sequenciador automático de DNA modelo MEGABACE 1000 (GE HealthCare™), pela empresa MacroGen situada na Coreia do Sul.

### 3.2.6 Análises das Sequências

A obtenção das sequências consenso foi dada a partir da visualização simultânea entre as sequências *forward* (F) e *reverse* (R) e seus respectivos eletroferogramas. O alinhamento inicial gerado pelo programa BioEdit 7.0.5.3 (HALL, 2001) foi testado manualmente e as posições foram corrigidas quando necessário.

Árvores filogenéticas foram elaboradas através dos métodos de “Neighbor Joining (NJ)”, “Minimum Evolution (ME)” e “Máxima Parcimônia (MP)”, com 1000 réplicas de *bootstrap* no programa MEGA 5.0 (TAMURA et al., 2010) O teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), foi utilizado para gerar um maior suporte aos resultados obtidos pelas análise filogenéticas através dos métodos de NJ, ME e MP.

Para as análises filogeográficas as sequencias foram analisadas no programa TCS v1.18 (CLEMENT et al., 2000). O programa TCS foi utilizado também para gerar redes de haplótipos usando parcimônia estatística (TEMPLETON et al., 1987).

O programa Arlequin 3.11 (EXCOFFIER et al., 2005) foi utilizado para se determinar os valores de AMOVA - Analysis of Molecular Variance (EXCOFFIER et al., 1992) e de  $F_{st}$  (COCKERHAM & WEIR, 1993).

O AMOVA determina quanto das variações totais dos materiais genéticos ocorrem entre as populações estudadas e quanto ocorre dentro das populações.

Para se determinar a ocorrência de estruturações e para quantificá-las, Sewall Wright (1943, 1965) desenvolveu cálculos estatísticos sobre a correlação

entre gametas unidos ( $F_{st}$ ). Em 1973, Cockerham adaptou os cálculos de Wright para uso de locos multialélicos e, em 1984, Cockerham e Weir adaptaram o uso do  $F_{st}$  para amostras pequenas e populações pequenas, esse novo tipo de cálculo permitiu melhores pesquisas e inferências sobre a estruturação de e entre populações.



# RESULTADOS

## 4 – Resultados

### 4.1 – Composição nucleotídica das seqüências do gene ATPase 6/8

As seqüências *foward* e *reverse* foram alinhadas e comparadas, junto ao eletreferograma e suas extremidades foram retiradas. O alinhamento das seqüências de *P. lineatus*, *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) e de *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) mostraram um total de 842 pares de base para o gene ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8). Os nucleotídeos que compõem as seqüências analisadas apresentavam a seguinte composição média: 28,9% de timina, 30,6% de citosina, 28,5% de adenina e 12,0% de guanina (Tabela 3).

Essa composição nucleotídica reforça que o gene seqüenciado foi realmente um gene mitocondrial, pois em vertebrados tais genes possuem uma composição de guanina (G) notavelmente inferior as das outras bases nitrogenadas (DESALLE et al., 1987; KOCHER et al., 1989; ZHANG & HEWITT, 1996; KOTLÍK & BERREBI, 2002).

**Tabela 3.** Frequência da composição nucleotídica do gene ATP sintetase 6 e 8 para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e *S. brasiliensis*.

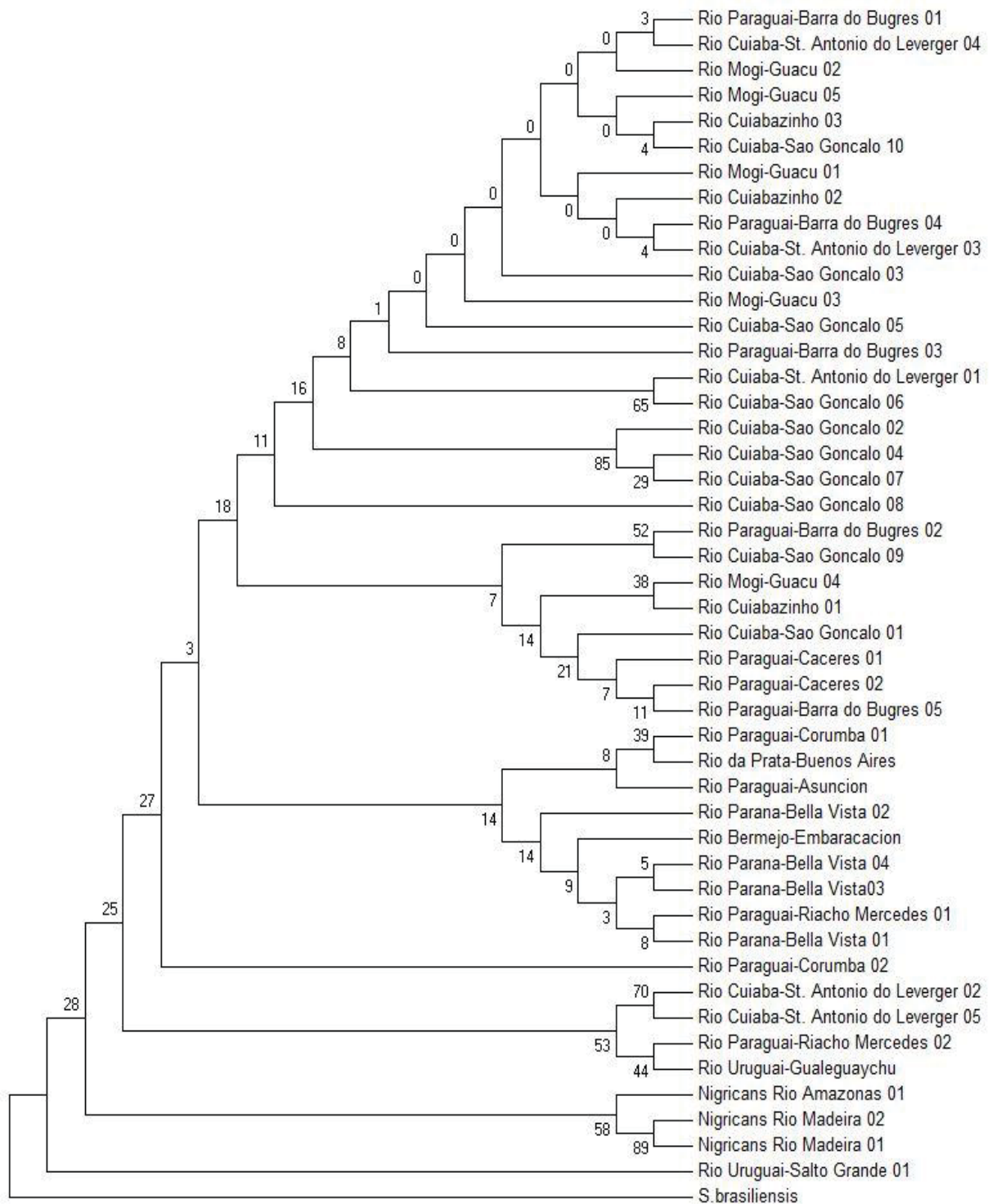
Amostra	T(U)	C	A	G	Total
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 01	28,7	30,8	28,6	11,9	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 02	28,9	30,6	28,4	12,1	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 03	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 04	28,9	30,6	28,4	12,1	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 05	28,9	30,6	28,7	11,8	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 06	28,9	30,6	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 07	28,9	30,6	28,4	12,1	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 08	28,6	30,9	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 09	28,9	30,6	28,7	11,8	842,0
Rio Cuiaba-Sao Goncalo 10	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Paraguai-Caceres 01	28,7	30,8	28,6	11,9	842,0
Rio Paraguai-Caceres 02	28,7	30,8	28,6	11,9	842,0
Rio Mogi-Guacu 01	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Mogi-Guacu 02	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Mogi-Guacu 03	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0

**Tabela 3 - Continuação.** Frequência da composição nucleotídica do gene ATP sintetase 6 e 8 para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e *S. brasiliensis*.

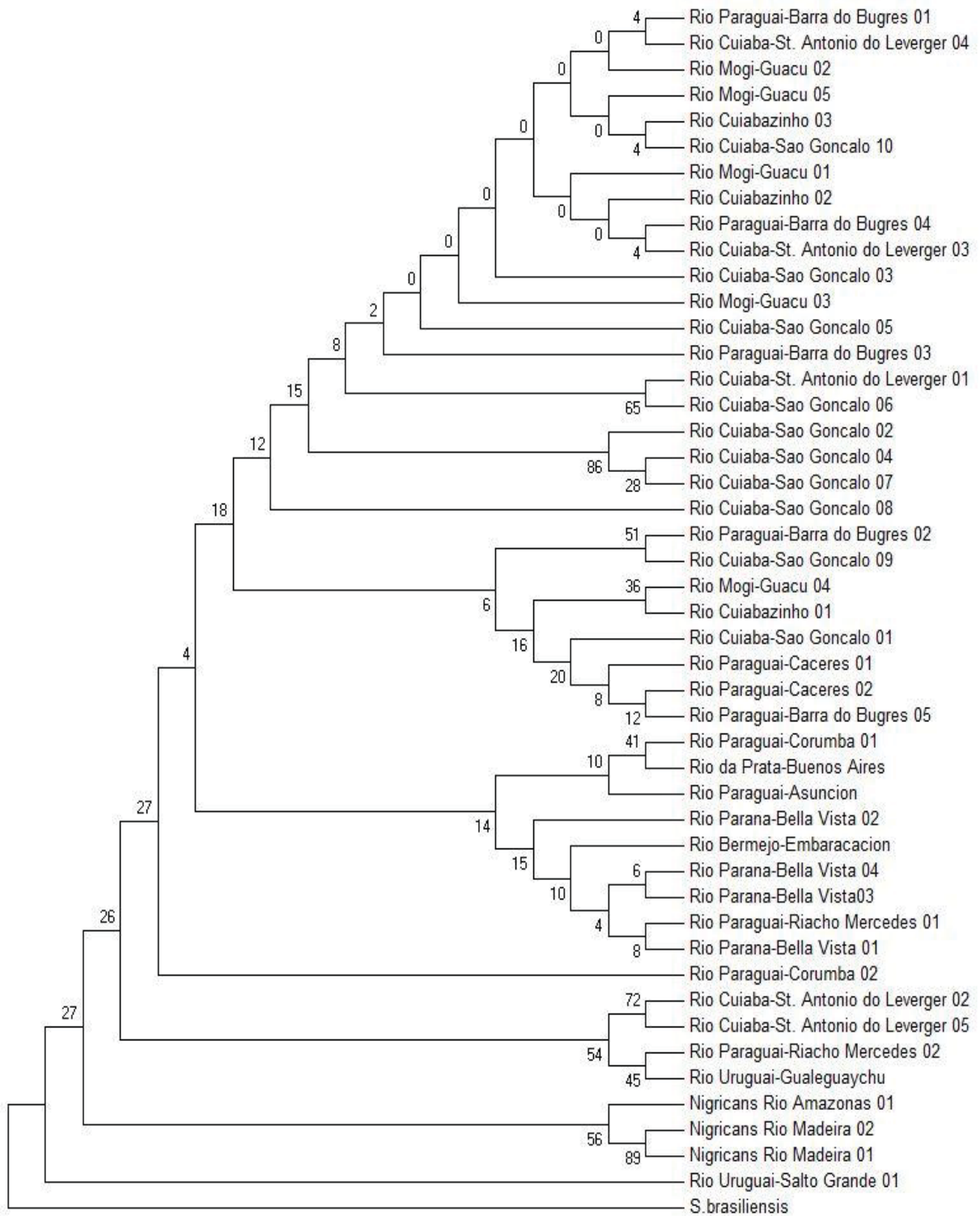
Rio Mogi-Guacu 04	28,5	31,0	28,6	11,9	842,0
Rio Mogi-Guacu 05	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Cuiabazinho 01	28,5	31,0	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiabazinho 02	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Cuiabazinho 03	28,7	30,8	28,6	11,9	842,0
Rio Paraguai-Barra do Bugres 01	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Paraguai-Barra do Bugres 02	28,7	30,8	28,7	11,8	842,0
Rio Paraguai-Barra do Bugres 03	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Paraguai-Barra do Bugres 04	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Cuiaba-St. Antonio do Leverger 01	28,9	30,6	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiaba-St. Antonio do Leverger 02	29,1	30,4	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiaba-St. Antonio do Leverger 03	29,0	30,5	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiaba-St. Antonio do Leverger 04	28,9	30,6	28,5	12,0	842,0
Rio Cuiaba-St. Antonio do Leverger 05	29,1	30,4	28,5	12,0	842,0
Nigricans Rio Madeira 02	29,1	30,3	28,4	12,2	842,0
Nigricans Rio Madeira 01	29,1	30,3	28,4	12,2	842,0
Nigricans Rio Amazonas 01	29,0	30,4	28,4	12,2	842,0
Rio Uruguai-Salto Grande 01	28,5	30,9	28,6	12,0	842,0
Rio Paraguai-Riacho Mercedes 02	29,1	30,3	28,5	12,1	842,0
Rio Uruguai-Guauguaychu	29,1	30,3	28,6	12,0	842,0
Rio Paraguai-Corumba 02	28,9	30,6	28,6	11,9	842,0
Rio Parana-Bella Vista 04	28,9	30,5	28,6	12,0	842,0
Rio Bermejo-Embaracacion	28,9	30,5	28,6	12,0	842,0
Rio Paraguai-Asuncion	28,7	30,6	28,5	12,1	842,0
Rio Paraguai-Corumba 01	28,7	30,6	28,5	12,1	842,0
Rio Parana-Bella Vista03	28,9	30,5	28,6	12,0	842,0
Rio Parana-Bella Vista 02	28,6	30,8	28,6	12,0	842,0
Rio Paraguai-Riacho Mercedes 01	28,9	30,5	28,6	12,0	842,0
Rio Parana-Bella Vista 01	28,7	30,6	28,6	12,0	842,0
Rio da Prata-Buenos Aires	28,7	30,6	28,6	12,0	842,0
<i>S.brasiliensis</i>	29,7	29,9	26,4	14,0	842,0
Média	28,9	30,6	28,5	12,0	842,0

#### 4.2 – Análises filogenéticas das populações de *P. lineatus* e *P.nigricans*

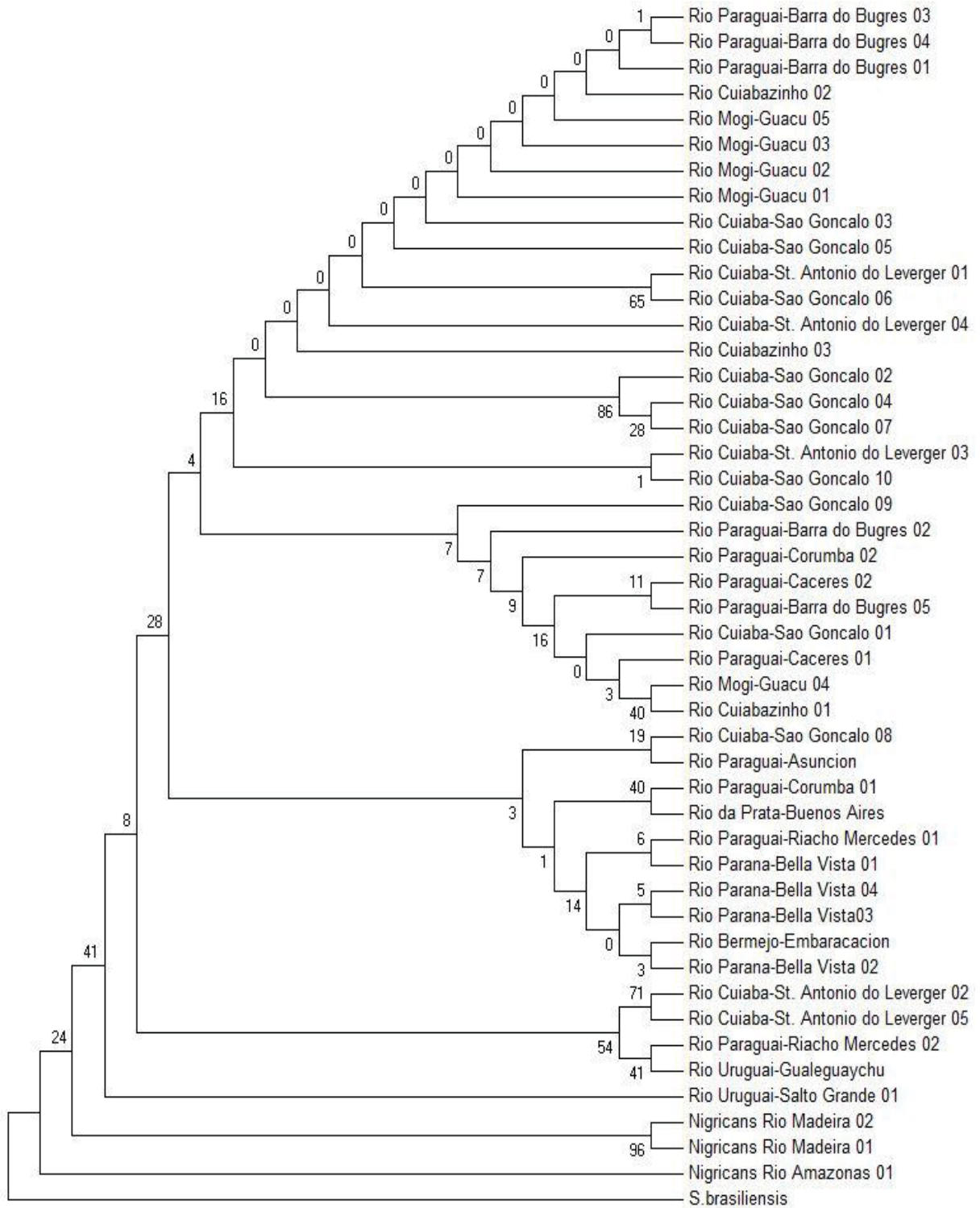
As árvores filogenéticas geradas pelos métodos de “Neighbor Joining” (Figura 3), “Minimum Evolution” (Figura 4) e “Máxima Parcimônia” (Figura 5) mostraram que As populações de *P. lineatus* formam um grupo monofilético, tendo *P. nigricans* e *S. brasiliensis* como grupo irmão.



**Figura 3.** Árvore consenso a partir da análise de “Neighbor Joining” para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e de *S. brasiliensis* com base na seqüência completa do gene ATPase 6/8. Os valores dos ramos representam os valores de bootstrap (1.000 réplicas), que servem de suporte para os clados.



**Figura 4.** Árvore consenso a partir da análise de “Minimum Evolution” para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e de *S. brasiliensis* com base na seqüência completa do gene ATPase 6/8. Os valores dos ramos representam os valores de bootstrap (1.000 réplicas), que servem de suporte para os clados.



**Figura 5.** Árvore consenso a partir da análise de “Máxima Parsimônia” para os espécimes de *P. lineatus*, *P. nigricans* e de *S. brasiliensis* com base na seqüência completa do gene ATPase 6/8. Os valores dos ramos representam os valores de bootstrap (1.000 réplicas), que servem de suporte para os clados.

### 4.3 – Distâncias e variações genéticas populacionais

A divergência genética encontrada entre as 14 populações foi baixa, variando de 0,1 a 1,3 % (média de 0,5%).

Os resultados obtidos das análises filogeográficas indicaram a ocorrência de uma rede contendo 27 haplótipos (Figura 6), sendo 20 únicos com divergência entre 1 e 3 pares de bases, e 6 compartilhados entre populações dos rios Paraguai/Cuiabá, Paraguai/Cuiabá/Paraná, Bermejo/Paraguai/Paraná.

A população do rio Cuiabá (Cuiabá, Mato Grosso - Brasil) foi a que apresentou o maior número de haplótipos (11). O haplótipo H1, identificado como ancestral, agrupou 90% dos indivíduos do rio Mogi-Guaçu (Rio Paraná-Brasil), além de populações da bacia do rio Paraguai/Cuiabá (Rio Paraná-Brasil).

A partir do haplótipo ancestral foram identificadas 3 linhagens distintas: **Grupo 1** – compreendendo as populações das bacias do rio Paraná e Paraguai (Brasil) com pouca variação (1-4 mutações); **Grupo 2** – agrupando populações do rio Paraguai (Argentina e Paraguai) (2-6 mutações) e **Grupo 3** – incluindo populações do rio Uruguai (Uruguai) (6-10 mutações) (Figura 7).

**Tabela 4.** Relação de haplótipos e espécime correspondente.

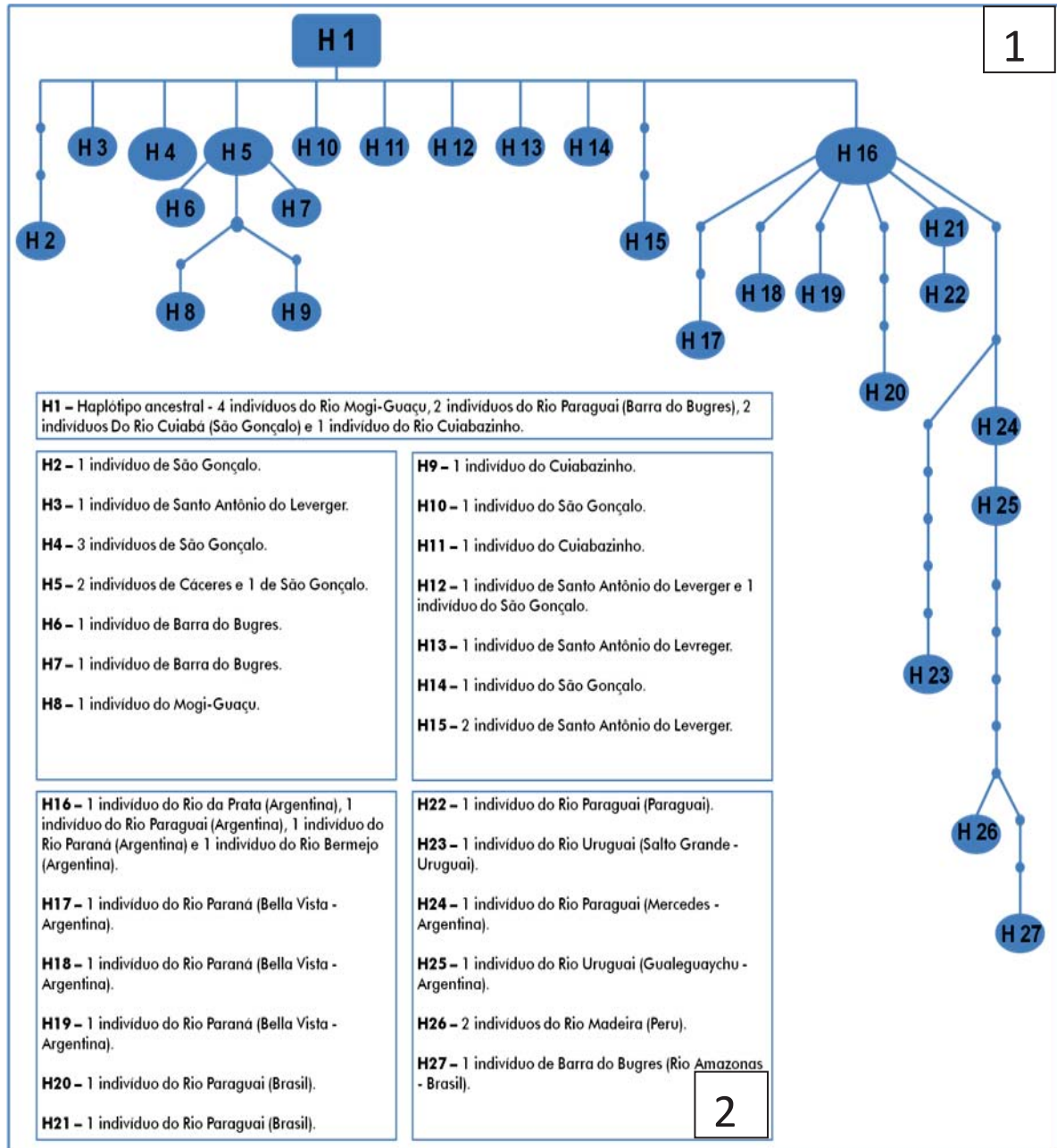
Haplótipo	Identificação	Rio	Localização
H1*	Mogi-Guacu 01	Mogi-Guacu	**
H1*	Mogi-Guacu 02	Mogi-Guacu	**
H1*	Mogi-Guacu 03	Mogi-Guacu	**
H1*	Mogi-Guacu 05	Mogi-Guacu	**
H1*	Rio Cuiabá-São Gonçalo 03	Rio Cuiabá	São Gonçalo
H1*	Rio Cuiabá-São Gonçalo 10	Rio Cuiabá	São Gonçalo
H1*	Rio Paraguai-Barra do Bugres 02	Rio Paraguai	Barra do Bugres
H1*	Rio Paraguai-Barra do Bugres 03	Rio Paraguai	Barra do Bugres
H1*	Rio Cuiabazinho 02	Rio Cuiabazinho	**
H2	Rio Cuiabá-São Gonçalo 08	Rio Cuiabá	São Gonçalo
H3	Rio Cuiaba-St. Ant. do Leverger 03	Rio Cuiabá	St. Ant. do Leverger
H4	Rio Cuiabá- São Gonçalo 02	Rio Cuiabá	São Gonçalo

**Tabela 4 - Continuação.** Relação de haplótipos e espécime correspondente.

<b>H4</b>	Rio Cuiabá- São Gonçalo 04	Rio Cuiabá	São Gonçalo
<b>H4</b>	Rio Cuiabá- São Gonçalo 07	Rio Cuiabá	São Gonçalo
<b>H5</b>	Rio Cuiabá- São Gonçalo 01	Rio Cuiabá	São Gonçalo
<b>H5</b>	Rio Paraguai-Cáceres 01	Rio Paraguai	Cáceres
<b>H5</b>	Rio Paraguai-Cáceres 02	Rio Paraguai	Cáceres
<b>H6</b>	Rio Paraguai-Barra do Bugres 04	Rio Paraguai	Barra do Bugres
<b>H7</b>	Rio Paraguai-Barra do Bugres 01	Rio Paraguai	Barra do Bugres
<b>H8</b>	Mogi-Guacu 04	Mogi-Guacu	**
<b>H9</b>	Rio Cuiabazinho 01	Rio Cuiabazinho	**
<b>H10</b>	Rio Cuiabá- São Gonçalo 05	Rio Cuiabá	São Gonçalo
<b>H11</b>	Rio Cuiabazinho 03	Rio Cuiabazinho	**
<b>H12</b>	Rio Cuiaba-St. Ant. do Leverger 01	Rio Cuiabá	St. Ant. do Leverger
<b>H12</b>	Rio Cuiabá- São Gonçalo 01	Rio Cuiabá	São Gonçalo
<b>H13</b>	Rio Cuiaba-St. Ant. do Leverger 04	Rio Cuiabá	St. Ant. do Leverger
<b>H14</b>	Rio Cuiabá- São Gonçalo 04	Rio Cuiabá	São Gonçalo
<b>H15</b>	Rio Cuiaba-St. Ant. do Leverger 02	Rio Cuiabá	St. Ant. do Leverger
<b>H15</b>	Rio Cuiaba-St. Ant. do Leverger 05	Rio Cuiabá	St. Ant. do Leverger
<b>H16</b>	AF281827	Rio da Prata	Buenos Aires
<b>H16</b>	AF281829	Rio Paraguai	Riacho Mercedes
<b>H16</b>	AF281831	Rio Paraná	Bella Vista
<b>H16</b>	AF281834	Rio Bermejo	Embaracacion
<b>H17</b>	AF281828	Rio Paraná	Bella Vista
<b>H18</b>	AF281830	Rio Paraná	Bella Vista
<b>H19</b>	AF281835	Rio Paraná	Bella Vista
<b>H20</b>	AF281836	Rio Paraguai	Corumbá
<b>H21</b>	AF281832	Rio Paraguai	Corumbá
<b>H22</b>	AF281833	Rio Paraguai	Asuncion
<b>H23</b>	AF281839	Rio Uruguai	Salto Grande
<b>H24</b>	AF281838	Rio Paraguai	Riacho Mercedes
<b>H25</b>	AF281837	Rio Uruguai	Gualeguaychu
<b>H26</b>	AF281841	Rio Madeira	Manu
<b>H26</b>	AF281842	Rio Madeira	Manu
<b>H27</b>	AF281840	Rio Amazonas	Manaus

\* Haplótipo ancestral.

\*\* Amostras coletadas em pontos distantes de localidades.

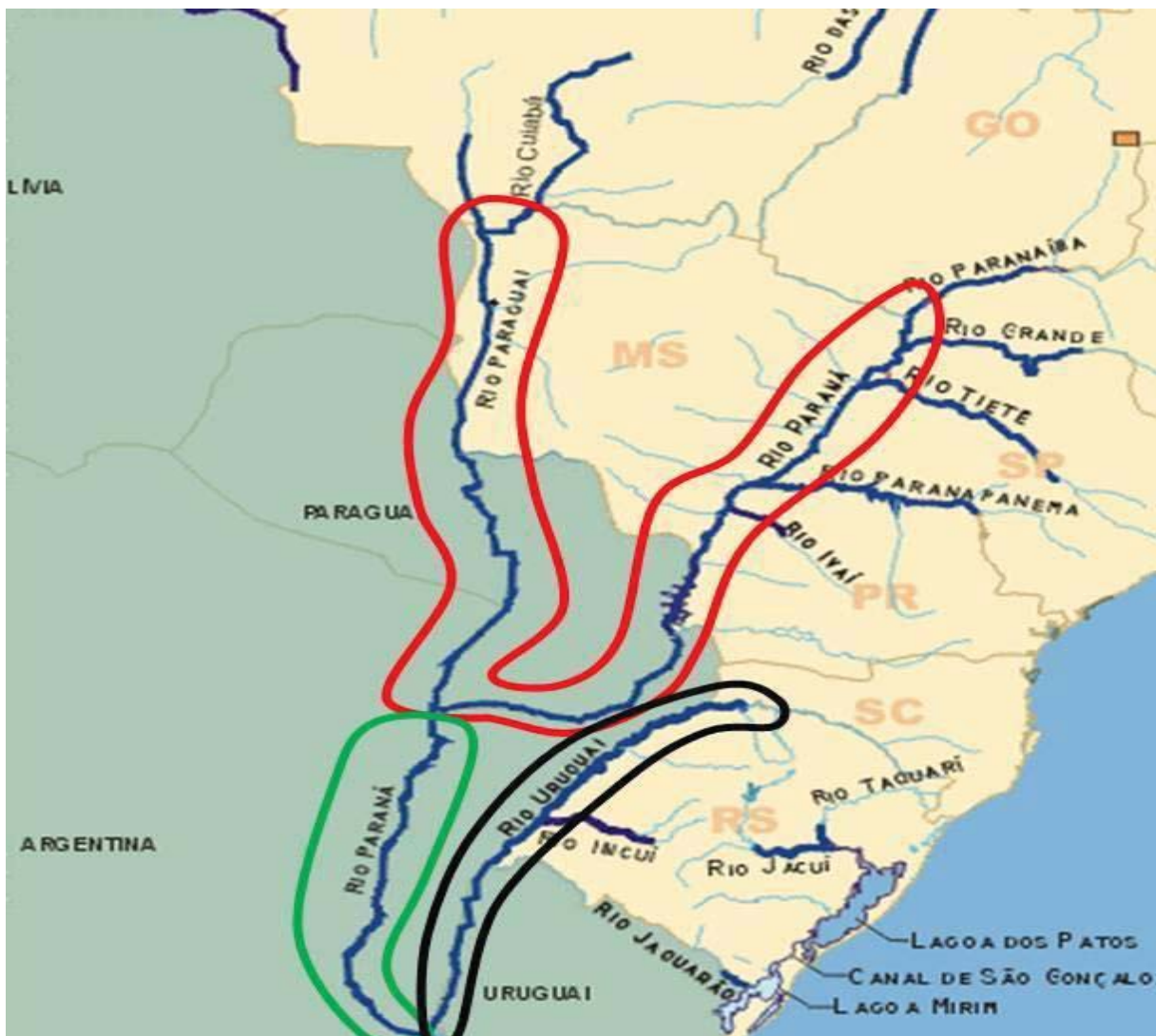


**Figura 6.** (1) Rede de Haplótipos evidenciando os haplótipos e as mutações; (2) Tabela contendo o número de espécimes e origem dos mesmo de cada haplótipo presente na rede de haplótipos.

As maiores variações genéticas se encontram dentro das populações, aproximadamente 80%, enquanto que entre as populações, as variações genéticas correspondem apenas à aproximadamente 20% do total. O valor estimado de Fst foi

de 0,16, indicando que existe uma moderada estruturação genética entre todas as populações analisadas.

Porém, em uma segunda análise  $F_{st}$  realizada, dessa vez com as populações agrupadas de acordo com a rede de haplótipos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 3), o valor de  $F_{st}$  se mostrou superior ao anterior, aproximadamente 0,19 e com uma divergência genética entre os três grupos variando de 0,5 a 1,0 % (média de 0,8%).



**Figura 7.** Mapa assinalando os grupos formados pela rede de haplótipos e os rios. Grupo 1 (marcação em vermelho) compreendendo o Rio Paraguai e o Alto Rio Paraná. Grupo 2 (marcação em verde) compreendendo o Baixo Rio Paraná. Grupo 3 (marcação em preto) Rio Uruguai.



# DISCUSSÃO

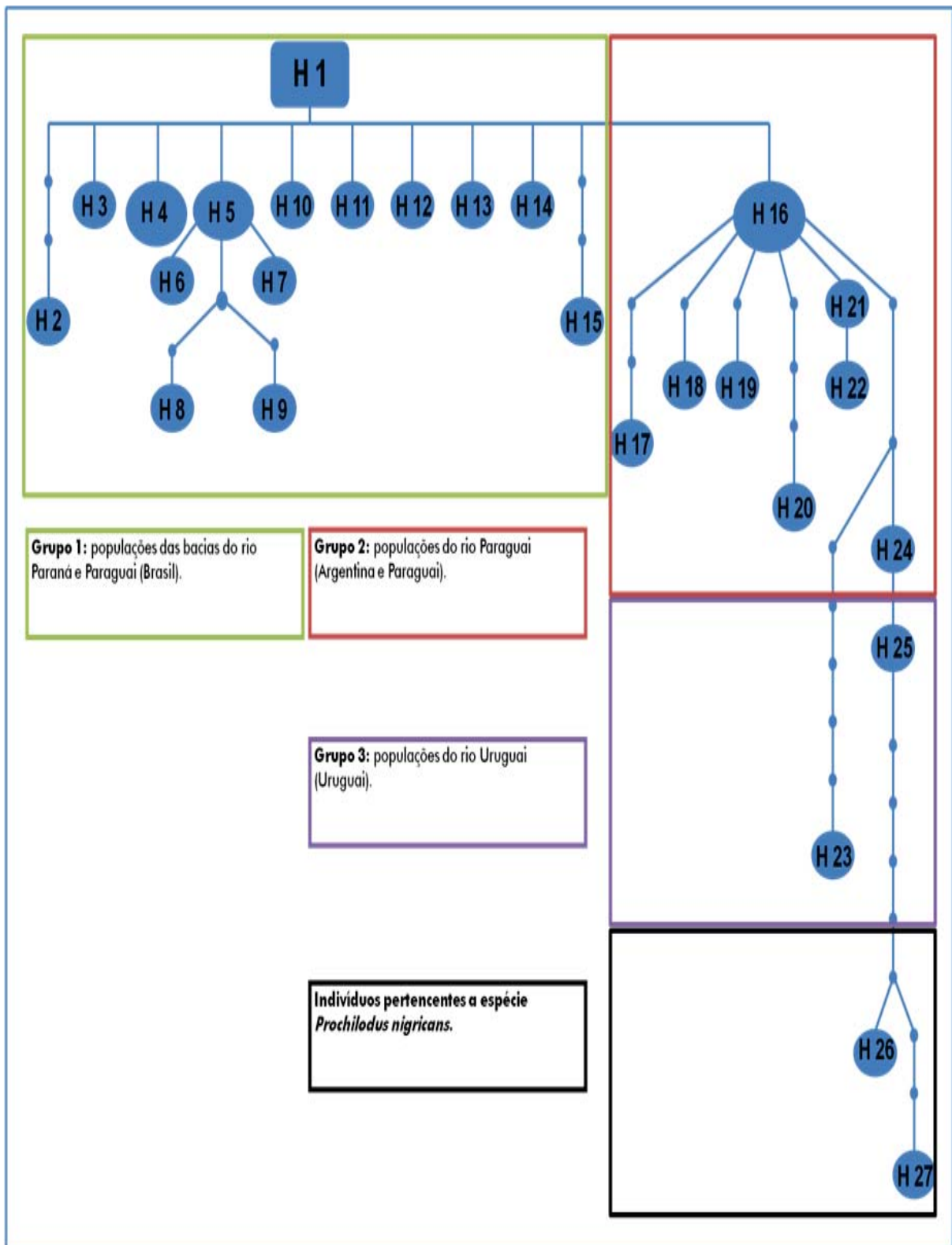
## 5 - Discussão

Estudos anteriores indicavam que as populações de *P. lineatus* apresentavam uma estrutura panmítica (SIVASUNDAR, 2001). Ao se realizar as análises filogenéticas e filogeográficas utilizando as amostras coletadas nesse trabalho e as sequências obtidas no GenBank, os resultados foram iguais ou muito parecidos. As árvores filogenéticas indicaram pouca variação entre indivíduos de rios diferentes. Os dados das divergências genéticas, os resultados da AMOVA e do FST sem os agrupamentos (Grupo 1, Grupo 2 e Grupo3) indicam que o *P. lineatus* forma uma grande população panmítica ao longo dos rios e bacias analisadas, sem restrições ou barreiras reprodutivas e migratórias.

Porém, o resultado da rede de haplótipos indica a existência de uma estruturação entre três grupos geográficos distintos (Figura 8). Quando se considera a formação dos grupos e se repete a análise, só que dessa vez assumindo cada grupo como uma população, o novo valor de FST aumenta consideravelmente o que fortalece tal hipótese de ocorrência de três populações.

Também é possível se inferir, a partir da rede de haplótipos, que o grupo 3 é derivado do grupo 2 e este derivado do grupo 1. Sendo assim é possível se sugerir que a rota de dispersão e colonização desta espécie ao longo da Bacia do Prata, se originou da região da cabeceira dos rios Paraguai e Cuiabá (Alto Paraguai), movendo-se para as porções média e baixa desse mesmo rio. Posteriormente houve a colonização dos rios da Bacia do Paraná (Alto Paraná: Mogi Guaçu) e do rio Uruguai a partir do baixo Paraná.

Apesar de não estarem presentes barreiras físicas que impeçam o fluxo migratório entre as populações dos rios Paraguai/Alto Paraná e Baixo Paraná e entre as populações dos rios Baixo Paraná e Uruguai (Figura 9). As três populações se apresentam moderadamente estruturadas, mostrando que existe uma barreira não-física que diminui significativamente ou impede o intercruzamento dessas 3 populações.



**Figura 8.** Rede de Haplótipos evidenciando os haplótipos, as mutações e os grupos que se formaram e os rios correspondentes.

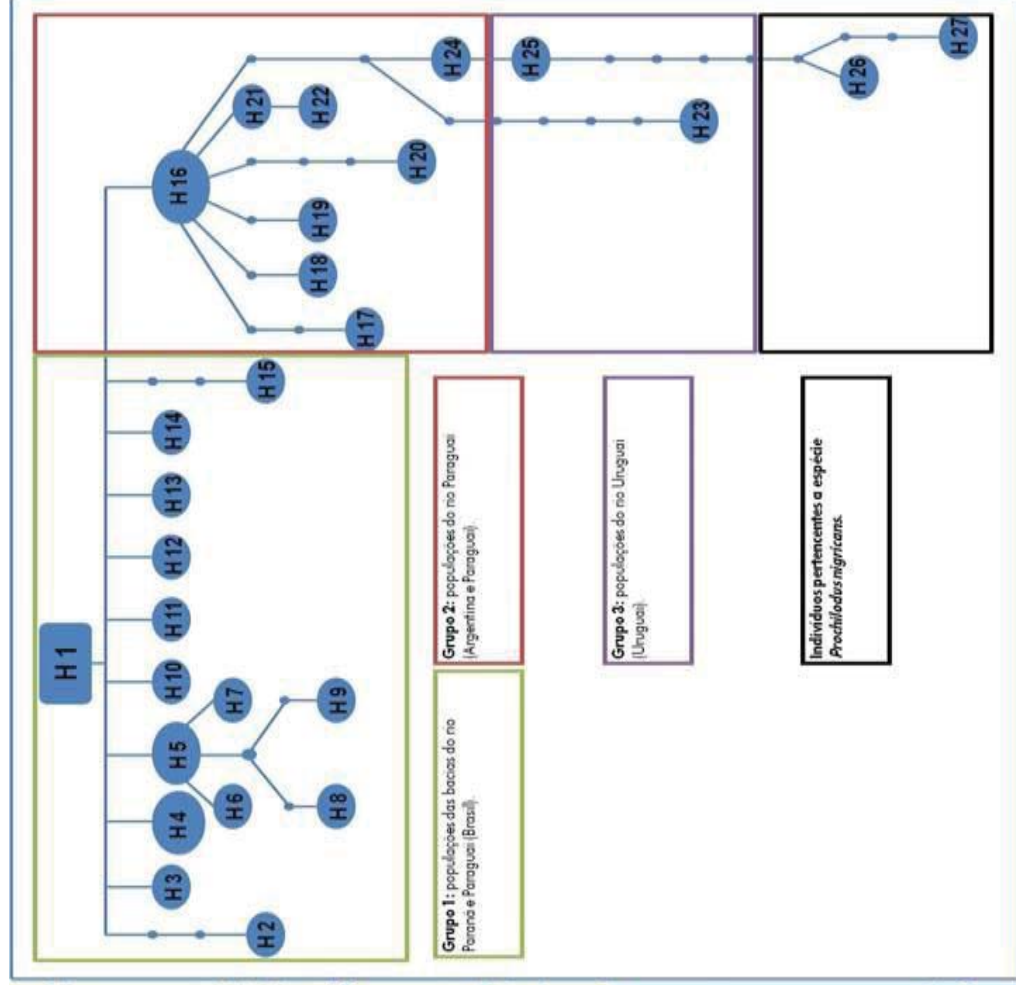
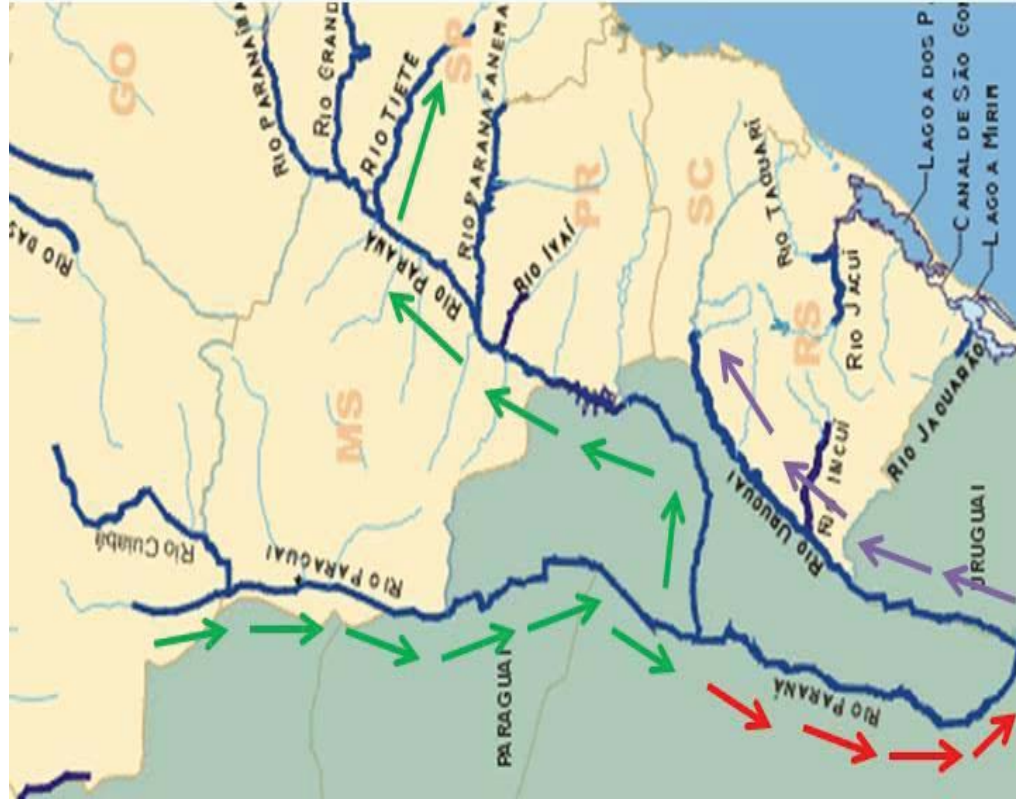


Figura 9. Mapa assinalando a provável rota de migração e colonização de *P. lineatus*.



# CONCLUSÃO

## 6 – CONCLUSÃO

Novas informações sobre as populações nativas apresentam grande importância do ponto de vista conservacionista, para estudos ecológicos, para bancos genéticos e para programas de aquicultura.

Um melhor conhecimento das características migratórias, reprodutivas e da estruturação genética de suas populações, permitem melhores meios e programas para se garantir a conservação da espécie. O profundo conhecimento da ecologia de tal espécie permite um entendimento melhor da mesma, mas também abre a possibilidade de diferentes visões para outras espécies de peixes migratórios.

Um conhecimento mais profundo da ecologia do *P. lineatus* é vital para a criação e manutenção de bancos genéticos, além da necessidade de tais conhecimentos para o planejamento de programas de aquicultura, podendo assim manter a integridade genética normal da espécie em cativeiro.

Como já citado, existe uma falta de dados filogenéticos e filogeográficos de peixes de água doce da América do Sul (SIVASUNDAR, 2001). Essa falta de dados implica em dificuldades quando se tenta realizar análises filogenéticas comparativas, dificultando a análise dos dados e limitando a área geográfica estudada e de inferência do estudo.

As seguintes conclusões podem ser inferidas de acordo com os resultados desse trabalho:

1 – Observou-se a formação de três grupos genéticos na população de *P. lineatus*, indicando uma estruturação na espécie. Essa afirmação difere da idéia que as populações apresentavam uma estruturação panmítica.

2 – Embora não existam barreiras físicas evidentes separando os rios estudados, as populações tendem a manter um mínimo de intercruzamento, evidenciando o início de uma separação geográfica e isolamento reprodutivo.

3 – A possível rota de colonização da espécie começou no Alto Paraguai se movendo para as porções média e baixa desse mesmo rio, colonizando posteriormente o Alto Paraná. Depois houve a colonização dos rios da Bacia do Paraná e do rio Uruguai, este a partir do baixo Paraná.

4 – A eficiência dos marcadores moleculares foi ressaltada, pois permitiram a observação da ocorrência de uma estruturação na espécie e a provável rota de dispersão da mesma.



# CONSIDERAÇÕES FINAIS

## 7 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil é o país com o maior recurso hídrico do mundo, porém é possível perceber a falta de estudos dirigidos para a preservação e melhor uso dos nossos recursos pesqueiros.

Um dos objetivos do trabalho era a obtenção de novos dados úteis sobre as populações de *P. lineatus* e tal objetivo pode ser alcançado.



# REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

## 8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, K.T. **Análise das relações filogenéticas entre espécies da subfamília Bryconinae (Ostariophysi: Characiformes: Characidae) utilizando sequências de DNA mitocondrial e nuclear.** 2011. 122f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas, Área de concentração: Zoologia) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2011.

ADRIANO, E.A.; ARANA, S.; CORDEIRO, N.S. Histopathology and ultrastructure of *Henneguya caudalongula* sp. n. infecting *Prochilodus lineatus* (Pisces: Prochilodontidae) cultivated in the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.100, n.2, p.177-181, 2005.

AGOSTINHO, A.A. **Estrutura da população, idade, crescimento e reprodução de *Rhinelepis áspera* (Agassiz, 1829) (Osteichthyes, Loricariidae) do rio Paranapanema, São Paulo.** 1985. 231f. Tese (Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais) – Departamento de Ciência Biológicas, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 1985.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; FERNANDEZ, D.R.; SUZUKI, H.I. Efficiency of fish ladders for Neotropical ichthyofauna. **River Research and Applications**, London, v.18, p. 299-306, 2002.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; JÚLIO JR., H.F. Migratory fish from the upper Parana river basin, Brazil. *In*: CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. (Ed.) **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status.** Canadá: World Fisheries Trust, British Columbia, 2003. 380p.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. **Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil.** Maringá: EDUEM, 2007. 500p.

AHO, T.; RÖNN, J.; PIIRONEN, J.; BJÖRKLUND, M. Impacts of effective population size on genetic diversity in hatchery reared Brown trout (*Salmo trutta* L.) populations. **Aquaculture**, Amsterdam, v.253, n.1- 4, p.244-248, 2006.

ALLAN, J.D.; ABELL, R.; HOGAN, Z.; REVENGA, C.; TAYLOR, B.W.; WELCOMME, R.L.; WINEMILLER, K. Overfishing of inland waters. **Bioscience**, Uberlândia, v.55, p.1041–1051, 2005.

ALVES, A.L.; PERDICES, A.; REIS, S.F.; OLIVEIRA, C. Phylogeography and evolutionary history of the Neotropical catfish *Rhamdia quelen* (Teleostei: Heptapteridae) implications for their taxonomy and conservation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit. (Submetido).

ALVES, A.L.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F. Molecular phylogenetic analyses of the Loricariidae family (Teleostei: Siluriformes) inferred from mtDNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit. (Submetido).

ARAÚJO, S.A. de; GURGEL, H. de C.B.; NASCIMENTO, R.S.S. Indicadores do desenvolvimento gonadal e nutricional de *Prochilodus cearensis* (Steindachner, 1911) (Characiformes, Prochilodontidae) no açude Itans/Caicó, Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 25, n. 2, p. 377-384, 2003.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, New York, v.18, p.489-522, 1987.

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. New York: Chapman & Hall, 1994. 541p.

AVISE, J.C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. **Molecular Ecology**, Canadá, v.7, p.371 – 379, 1998.

AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Cambridge: Harvard University Press, 2000. 447p.

BATISTA, J.S.; ALVES-GOMES, J.A. Phylogeography of *Brachplatystoma 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**, Ribeirão Preto, v. 5, p. 723 – 740, 2006.

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**, Canadá, v.7, p.499–517, 1998.

BILLINGTON, N.; HEBERT, P. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, Canadá, v.48, p. 80-94, 1991.

BRITSKI, H. A. Peixes de água doce do estado de São Paulo. Peixes de água doce do Estado de São Paulo – Sistemática. *In: Poluição e Piscicultura*. São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, Instituto de Pesca, 1972. 216p.

BRITSKI, H. A. **Peixes do pantanal**: Manual de identificação. Brasília: Embrapa-SP, 1999. 184 p.

BROOK, B.W.; TONKYN, D.W.; O'GRADY, J.J.; FRANKHAM, R. Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. **Ecology and Society**, Santa Ana, v.6, p.1-16, 2002.

CALCAGNOTTO, D. Taxas de evolução e o relógio molecular. *In*: MATIOLI, S.R. (Ed.). **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2004. 202p.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DE SALLE, R. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v.36, p.135-153, 2005.

CAPELETI, A. R.; PETRERE JR, M. Migration of the curimatá *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Pisces, Prochilodontidae) at the waterfall "Cachoeira de Emas" of the Mogi-Guaçu river - São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v.66, n.2b, p. 651-659, 2006.

CASTAGNOLLI, N. **Piscicultura de água doce**. Jaboticabal: Funep, 1992. 189p.

CASTRO, R.M.C. Sistemática e distribuição geográfica da família Prochilodontidae (Ostariophysi, Characiformes). *In*: ENCONTRO BRASILEIRO DE ICTIOLOGIA, n.9, 1991, Maringá. **Resumos...** Maringá: SBI/Nupélia, 1991. 128 p.

CASTRO, R.M.C. *Prochilodus britskii*, a new species of Prochilodontide Fish (Ostariophysi, Characiformes) from the rio Apiacá, river Tapajós system, Mato Grosso, Brazil. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, Washington, v.106, p.57-62, 1993.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Canadá, v.9, p.1657-1659, 2000.

COCKERHAM, C.C. Analysis of gene frequencies. **Genetics**, Pittsburgh, v.74, p.679–700, 1973.

COCKERHAM, C.C.; WEIR, B.S. Estimation of gene flow from F-statistics. **Evolution**, U.S.A., v.47, p.855–863, 1993.

COSTA, W. J. E. M. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. **Zootaxa**, v.1213, p. 1–162, 2006.

CRANDALL, K.; BININDA-EMONDS, O.; MACE, G.; WAYNE, R.K. Considering evolutionary processes in conservation biology. **Trends in Ecology & Evolution**, London, v.15, p.290–295, 2000.

ESCHMEYER, W.N.; FRICKE, R.; FONG, J.D.; POLACK, D.A. Marine fish diversity: history of knowledge and discovery (Pisces). **Zootaxa**, New Zealand, v.2525, p.19-50, 2010.

FALK, T.M.; TEUGELS, G.G.; ABBAN, E.K.; VILLWOCK, W.; RENWRANTZ, L. Phylogeographic patterns in populations of the black-chinned tilapia complex (Teleostei, Cichlidae) from coastal areas in West Africa: support for the refuge zone theory. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 27, p. 81-92, 2003.

FAVERET FILHO, P.; SIQUEIRA, S.H.G. Panorama da Pesca Marítima no Mundo e no Brasil. **BNDES**, n.5, 1997.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. 220p.

GARCEZ, R., ALMEIDA-TOLEDO, L. F. O curimatá (*Prochilodus lineatus*, Prochilodontidae) e o manejo pesqueiro na sub bacia do Rio Grande: avaliação da

variabilidade genética utilizando a técnica de PCR-RFLP. *In*: CONGRESSO NACIONAL DE GENÉTICA, n.51, 2005, Águas de Lindóia. **CD-Rom** de resumos do 51º Congresso Nacional de Genética.

GODOY, M. P. **Peixes do Brasil**: Subordem Characoidei, Bacia do Rio Mogi Guaçu. Piracicaba: Franciscana, v. 2, 1975. 847 pp.

GOULDING, M. **Man and fisheries on an Amazon frontier**. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1981. 137 p.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**. Oxford, v.41, p.95-98, 2001.

HILLIS, D.M.; MABLE, B.K.; MORITZ, C. Applications of Molecular Systematics. *In*: HILLIS, D.M.; MORITZ, C.; MABLE, B.K. (Ed.) **Molecular systematics**. Sunderland: Sinauer Associates, 1996. 655p.

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J.F. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, Canadá, v. 16, p. 2115-2136, 2007.

KOBERSTEIN, T.C.R.D.; DURIGAN, J. G. Produção de larvas de curimatá (*Prochilodus scrofa*) submetidas a diferentes densidades de estocagem e níveis de proteína bruta nas dietas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 31, n. 1, p.123-127, 2001.

KOTLIK, P.; BERREBI, P. Genetic subdivision and biogeography of the Danubian rheophilic barb *Barbus petenyi* inferred from phylogenetic analysis of mitochondrial DNA variation. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 24, p.10-18, 2002.

KUSMA, C.M.; FERREIRA, F.W. Mecanismo de transposição de peixes de pequena central hidrelétrica. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.1, p.89-94, 2010.

LI, W.H. **Molecular Evolution**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. 432p.

LOWE-MCCONELL, R. **Fish communities in tropical freshwaters**. New York: Longman, 1975. 337 p.

LUNDBERG, J. G. African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. *In*: GOLDBLATT, P. (Ed). **Biological Relationships Between Africa and South America**. New Haven: Yale University Press, p. 156–199, 1993.

MACHADO, M.R.F. **Características morfométricas e corporais de curimatá *Prochilodus lineatus* (Characiforme: Prochilodontidae) dos estoques migradores e residentes do rio Mogi-Guaçu**. 2007. 70f. Dissertação (Mestrado em Aquicultura) – Centro de Aquicultura, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2007.

MADDISON, D.R.; MADDISON, W. **MacClade v.4**: Analysis of phylogeny and character evolution. Sunderland: Sinauer Associates, 2005.

METZGER, J.P.; CASATTI, L. Do diagnóstico à conservação da biodiversidade: o estado da arte do programa BIOTA/FAPESP. **Biota Neotropica**, Campinas, v.6, n.2, p.1-23, 2006.

MONTEIRO, D.A.; ALMEIDA, J.A.; RANTIN, F.T.; KALININ, A.L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Oxford, v.143, n 2, p.141–149, 2006.

MORITA, K.; YAMAMOTO, S.; MORITA, S.H. Effects of habitat fragmentation by damming on salmonid fishes: lessons from white-spotted charr in Japan. **Ecological Research**, Japan, v.24, n.4, p.711-722, 2009.

MORITZ, C. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic Biology**, Oxford, v.51, p.238–254, 2002.

MOYER, G.R.; WINEMILLER, K.O.; MCPHEE, M.V.; TURNER, T.F. Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes in *Prochilodus* species of northern south America. **Evolution**, U.S.A., v.59, n.3, p. 599–610, 2005.

NELSON, J.S. **Fishes of the world**. 3 ed. New York: John Wiley & Sons, 1994. 600p.

NIELSEN, D.T.B. **Simpsonichthys e Nematolebias**. São Paulo: Editora Cabral, p. 235, 2008.

OVENDEN, J.R.; KASHIWAGI, T.; BRODERICK, D.; GILES, J.; SALINI, J. The extent of population genetic subdivision differs among four co-distributed shark species in the Indo-Australian archipelago. **BMC Evolutionary Biology**, United Kingdom, v.9, n.40, p.1-15, 2009.

PANCHAL, M. The automation of Nested Clade Phylogeography Analysis. **Bioinformatics Applications Note**, v.23, n.4, p.509-510, 2007.

PATERNELLO, T.; MARCATO, S.; ZANE, L.; VAROTTO, V.; BARGELLONI, L. Phylogeography of the *Chionodraco* genus (Perciformes, Channichthyidae) in the Southern Ocean. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 28, p. 420-429, 2003.

PELLEGRINO, K.C.M.; RODRIGUES, M.T.; WAITE, A.N.; MORANDO, M.; YASSUDA, Y.Y.; SITES JR, J.W. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of Linnean Society**, Southampton, v.85, p.13 – 26, 2005.

PERDICES, A.; DOADRIO, I. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 19, n. 3, p. 468-478, 2001.

PERDICES, A.; BERMINGHAM, E.; MONTILLA, A.; DOADRIO, I. Evolutionary history of the genus *Rhamdia* (Teleostei: Pimelodidae) in Central America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v.25, p.172-189, 2002.

PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M.M. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (=Yangtze) drainage inferred from cytochrome b sequence. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 31, p. 192-203, 2004.

PERDICES, A.; SAYANDA, D.; COELHO, M. M. Mitochondrial diversity of *Opsariichthys bidens* (Teleostei, Cyprinidae) in three Chinese drainages. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v.37, n.3, p.920-927, 2005.

PETRERE JR, M. **Migraciones de peces de agua dulce en America Latina: Algunos comentarios**. FAO COPESCAL Documento ocasional, 1, 1985. 17 p.

PETRERE JR, M. River fisheries in Brazil: A review. **Regulated Rivers: Research & Management**, London, v.4, p.1-16, 1989.

PEREIRA, R.A.C.; RESENDE, E.K. de. **Peixes detritívoros da planície inundável do rio Miranda, Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brasil**. Corumbá: EMBRAPA-CPAP, 1998. 50p.

PEREIRA, B.L.; CINTRA, B.; FONSECA, V.E.; LUNA, H.S. Índice gonadosomático como indicador do período reprodutivo de *Prochilodus Lineatus* (Pisces, Characidae) nos rios Aquidauana e Miranda, MS. *In: Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do Pantanal*, n.4, 2004, Corumbá. **Resumos...** Corumbá: Embrapa, CPAP.

PONZETTO, J. M. **Relações filogenéticas, filogeografia molecular e conservação das espécies de peixes anuais do gênero *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae)**. Projeto de pesquisa de mestrado (submetido), 2010.

POSADA, D.; CRANDALL, K.A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, Oxford, v.14, p.817-818, 1998.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A.; TEMPLETON, A. R. GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. **Molecular Ecology**, Canadá, v.9, n.4, p.487-488, 2000.

POVH, J.A. **Avaliação da diversidade genética e do manejo reprodutivo do pacu, *Piaractus mesopotamicus***. 2007. 75f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2007.

POVH, J.A.; LOPERA-BARRERO, N.M.; RIBEIRO, R.P.; LUPCHINSKI JR, E.; GOMES, P.C.; LOPES, T.S. Importancia del monitoreo genético de programas de repoblamiento de peces mediante marcadores moleculares. **Ciencia e Investigación Agraria**, Santiago, v.35, n.1, p.25-35, 2008.

POZZOBON, A.P.B. **Filogeografia e estrutura populacional de *Astyanax paranae* (PISCES: CHARACIDAE) na Bacia do Rio Paranapanema**. 2009. 49f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado e Licenciatura em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2009.

QUIRÓS, R. **Estructuras para assistir a los peces no salmoídeos en sus migraciones: America Latina**. FAO COPESCAL Documento ocasional, 5, 1988. 50p.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M.F.P.S. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. **Brazilian Journal of Genetics**, Ribeirão Preto, v. 20, n. 3, 1997.

RODRIGUES, R. M. **Estudos cromossômicos e moleculares em Loricariinae com ênfase em espécies de *Rineloricaria* (Siluriformes, Loricariidae): uma perspectiva evolutiva**. 2010. 241f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 2344p.

SCHAEFER, S.A. Conflict and resolution: Impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical cascudinhos (Siluriformes: Loricariidae). *In*: MALABARBA, L.R.; REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, C.A.S.; LUCENA, Z.M.S. (Ed.) **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 375-400.

SILFVERGRIP, A.M.C. **A systematic revision of the neotropical catfish genus *Rhamdia* (Teleostei, Pimelodidae)**. Stockholm: Swedish Museum of Natural History, 1996. 173p.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, Canadá, v.10, p.407–417, 2001.

STRECKER, U.; FAÚNDEZ, V.H.; WILKENS, H. Phylogeography of surface and cave *Astyanax* (Teleostei) from Central and North America based on cytochrome b sequence data. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 33, p. 469-481, 2004.

STREIT JR, D.P.; MORAES, G.V.; RIBEIRO, R.P.; SAKAGUTI, E.S.; SOUZA, E.D. de; POVH, J.A.; CAÇADOR, W. Comparação do sêmen de Curimbá (*Prochilodus lineatus*) induzido por extrato de hipófise de frango, coelho ou carpa. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, p.147-153, 2004.

SWOFFORD, D. L. **PAUP\***: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford (Submetido), 2011.

TEMPLETON, A. R.; BOERWINKLE, E. E.; SING C. F. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping: I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. **Genetics**, Pittsburgh, v.117, p.343–351, 1987.

TEMPLETON, A.R. The 'Eve' hypothesis: a genetic critique and reanalysis. **American Anthropologist**, Arlington, v.95, p.51–72, 1993.

TEMPLETON, A. R.; ROUTMAN, E.; PHILLIPS C. A. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the Tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. **Genetics**, Pittsburgh, v.140, p.767-782, 1995.

TEMPLETON, A.R. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, Canadá, v.7, p.381-397, 1998.

TEMPLETON, A. Using haplotypes trees for phylogeographic and species inferences in fish populations. **Environmental Biology of Fishes**, Corvallis, v.69, p.7-20, 2004.

TOLEDO-FILHO, S.A. Distribuição espacial do curimatá, *Prochilodus scrofa* (Steindachner, 1881), do rio Mogi-Guaçu. **Ciência e Cultura**, Campinas, v.35, p.1112-1114, 1983.

TURNER, T.F.; MCPHEE, M.V.; CAMPBELL, P.; WINEMILLER, K.O. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, Scotland, v.64, p.186–201, 2004.

VARI, R.P. Phylogenetic relationships of the families Curimatidae, Prochilodontidae, Anostomidae and Chilodontidae (Pisces, Characiformes). *Smithsonian Contributions to Zoology*. **Smithsonian Contributions to Zoology**, Washington, v.378, p.1-60, 1983.

VIDOTTI, E.C.; ROLLEMBERG, M. do C.E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.1, p. 139-145, 2004.

WANG, J.; LIN, H.; HUANG, S.; PAN, C.; CHEN, X.; CHIANG, T. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymas. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 31, p. 1143 – 1156, 2004.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, U.S.A., v.38, p.1358–1370, 1984.

WELCOMME, R.L. **Fisheries Ecology of Floodplain Rivers**. New York: Longman, 1979. 317p.

WILLIS, S.; NUNES, M.S.; MONTANA, C.; FARIAS, I.P.; LOVEJOY, N. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Detroit, v. 44, p. 291-307, 2007.

WRIGHT, S. Isolation by distance. **Genetics**, Pittsburgh, v.28, p.114, 1943.

WRIGHT, S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, U.S.A., v.19, p.395–420, 1965.

Rio Claro, 12 de Dezembro de 2011

---

Patricia Pasquali Parise Maltempi  
Orientadora

---

Edson Lourenço da Silva  
Co-orientador

---

Ricardo Luiz Dalia  
Aluno