

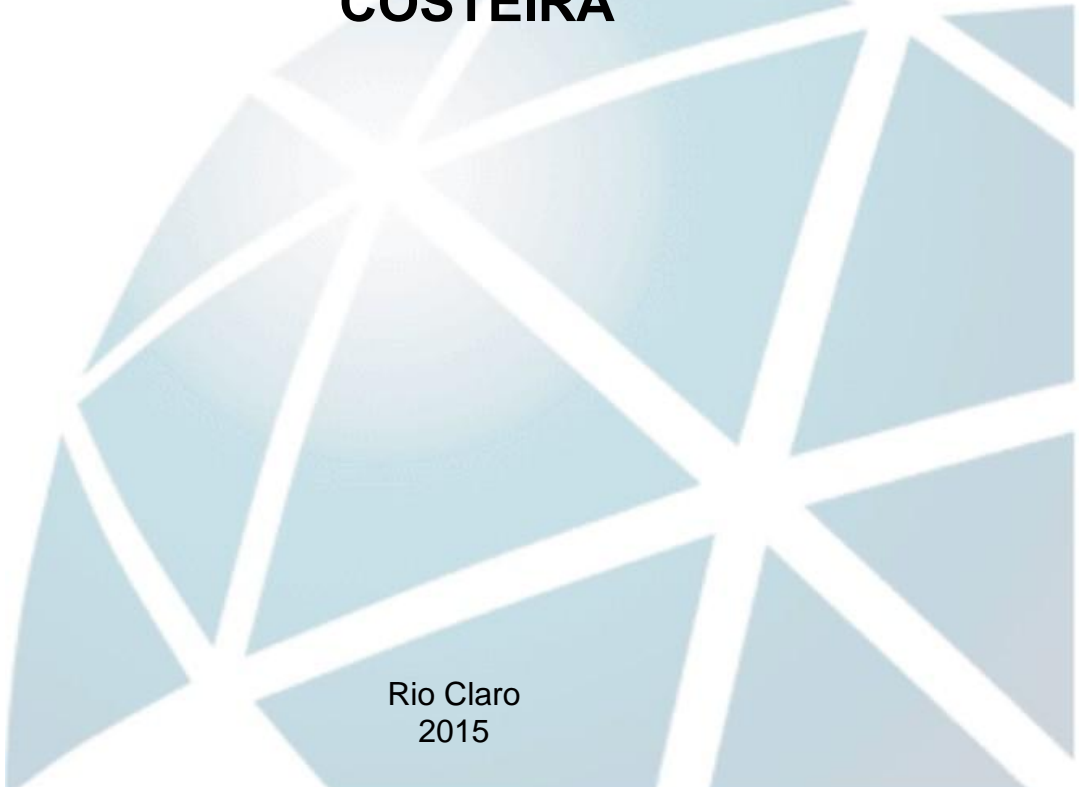
---

Ciências Biológicas

---

**CAROLINA CREPALDI**

**RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E  
FILOGEOGRÁFICAS DE POPULAÇÕES DE  
*Phalloceros reisi* LUCINDA, 2008  
(CYPRINODONTIFORMES, POECILIIDAE) DA  
BACIA DO ALTO RIO PARANÁ E BACIA  
COSTEIRA**



Rio Claro  
2015

CAROLINA CREPALDI

RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS DE POPULAÇÕES DE  
*Phalloceros reisi* LUCINDA, 2008 (CYPRINODONTIFORMES, POECILIIDAE) DA  
BACIA DO ALTO RIO PARANÁ E BACIA COSTEIRA

Orientadora: PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> PATRÍCIA PASQUALI PARISE-MALTEMPI

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

Rio Claro  
2015

597 Crepaldi, Carolina  
C917r Relações filogenéticas e filogeográficas de populações de  
Phalloceros reisi Lucinda, 2008 (Cyprinodontiformes,  
Poeciliidae) da bacia do Alto Rio Paraná e bacia costeira /  
Carolina Crepaldi. - Rio Claro, 2015  
52 f. : il., gráfs., tabs., quadros

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

Orientador: Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

1. Peixe. 2. Filogenia. 3. Poecilídeos. 4. DNA  
mitocondrial. 5. Filogeografia. I. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais e a toda a  
minha família, por todo o amor,  
incentivo e confiança.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Regina e Luiz, por todo o apoio e confiança que depositaram em mim desde sempre, durante toda a minha vida, na minha formação como pessoa e como bióloga, e a toda a minha família, estando ela perto ou longe, pelo apoio incondicional e amoroso que sempre recebi de vocês.

Ao Caio Zamuner, meu companheiro, namorado e melhor amigo, por toda a paciência, amor e dedicação, e por me ensinar muito sobre força e tenacidade durante todos esses anos.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Patrícia Pasquali Parise-Maltempi, pela orientação nesses anos de trabalho, pelo carinho, pela amizade, pelos ensinamentos e pela confiança que contribuíram tanto para a minha formação.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto, e à Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro, e seus professores, pela base para minha formação e pelas condições oferecidas para a realização deste trabalho.

A todos os amigos do CBI 2011 por esses anos de convívio, por todos os sorrisos e risadas passados juntos.

A todos os integrantes do Departamento de Biologia, pela convivência todas as semanas durante esses anos. Um agradecimento especial ao pessoal da Citogenética de Artrópodes, Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Diogo, Dioginho, Allison, Nahanna, Otávio, e especialmente aos meus colegas da Citogenética de Peixes, Mão, Keteryne e Flávia, por todo o apoio e ajuda dentro e fora do laboratório, pelas gargalhadas, risadas e pela amizade maravilhosa.

Um agradecimento especial aos meus queridos amigos Gaga, Fernando, Rapunzel, Bigo, Marin, Branca e Ébão, e às minhas lindas Mackenzie, Porteira, Inabilidade e Cobra, pela amizade maravilhosa que vamos levar para sempre. Obrigado a todos vocês pelas manhãs, tardes e noites juntos.

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram com a amizade, pensamentos, ideias, críticas, conselhos e boas energias, que foram todos de grande importância para meu crescimento e minha formação.

E por fim, mas não menos importante, agradeço a Deus pela vida maravilhosa que tive até agora, pelas oportunidades únicas, pela minha saúde e de minha família, e por ter me dado esse imenso amor à vida e ao conhecimento.

Obrigada!

## RESUMO

Os estudos envolvendo sequências de DNA, filogeografia e filogenia têm dado importantes contribuições para o entendimento da evolução de populações, espécies e comunidades de peixes em distintos ambientes neotropicais. Desta forma, no presente trabalho foram realizadas análises filogenéticas e filogeográficas de populações da espécie *Phalloceros reisi* a partir de sequências de DNA mitocondrial dos genes ATP Sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8) e Citocromo c Oxidase I (COI). Foram trabalhadas 104 sequências de peixes provenientes de rios que compõem a bacia do alto Rio Paraná e a bacia Costeira, editadas com o programa BioEdit, conferidas na ferramenta BLAST e alinhadas no programa MEGA 6.06. As análises filogenéticas foram conduzidas no programa MEGA 6.06 geradas através dos métodos de Neighbour-Joining e Máxima Parcimônia, com 1000 réplicas de *bootstrap* e modelo evolutivo *Kimura-2-parametros (K2P)*. Os genes ATPase 6/8 também foram analisados filogeograficamente no programa TCS, para geração das redes de haplótipos. Para ATPase, foi possível observar um agrupamento de amostras em cinco grupos distintos com valores altos de distâncias genéticas entre eles, e esta separação também está presente na rede de haplótipos gerada, sugerindo uma possível estruturação populacional a partir deste gene. Os genes de ATPase foram amplificados pela metade para a maioria das populações estudadas e este resultado pode indicar que, para esta espécie, estes genes sofreram alguma modificação em suas sequências, podendo tratar-se de pseudogenes, por exemplo, ou até compreender populações de diferentes sub-espécies. O lote proveniente do Córrego dos Fundos, sub-bacia Paranaíba, foi o único que apresentou o gene amplificado por inteiro e as sequências desta população foram incorporadas em um grupo particular nos resultados gerados. Para o gene COI, as amplificações tiveram tamanhos concordantes com o tamanho do gene descrito na literatura, sendo amplificado por inteiro nas amostras trabalhadas com este gene. Pelos resultados gerados na ferramenta BLAST obteve-se uma alta identidade das sequências com o gene COI para as espécies *Phalloceros harpagos* e *Phalloceros reisi*, confirmando sua taxonomia. Tais resultados permitem concluir a possível ocorrência de uma alteração no gene ATPase para a espécie de estudo, bem como uma estruturação populacional que levou à população de Córrego dos Fundos a possuir uma discrepância das demais quanto ao tamanho deste gene.

**Palavras-chave:** DNA mitocondrial, filogenia, Cyprinodontiformes, Alto Rio Paraná.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	7
1.1 Ictiofauna neotropical.....	7
1.2 Bacia do Alto Rio Paraná e Bacia Costeira... ..	8
1.3 Genes mitocondriais em estudos filogenéticos e filogeográficos e a filogeografia em peixes.....	8
1.4 Peixes poecilídeos.....	11
1.5 Gênero <i>Phalloceros</i> .....	12
<b>2 OBJETIVO</b> .....	13
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	14
3.1 Materiais.....	14
3.2 Métodos.....	18
3.2.1 Extração de DNA.....	18
3.2.2 Amplificação do DNA via PCR.....	19
3.2.3 Sequenciamento.....	20
3.2.4 Análise das sequências.....	20
3.2.5 Análises filogenéticas.....	20
3.2.6 Análises filogeográficas.....	21
<b>4 RESULTADOS</b> .....	22
4.1 Extração de DNA.....	22
4.2 Amplificação do DNA via PCR.....	22
4.3 Sequenciamento e alinhamento.....	26
4.4 Análises filogenéticas.....	31
4.5 Análise filogeográfica.....	42
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	44
5.1 Aspectos dos genes ATPase 6/8 nos indivíduos analisados.....	44
5.2 Características filogenéticas e filogeográficas das populações de <i>Phalloceros reisi</i> utilizando caracteres dos genes ATPase 6/8.....	45

5.3 Características filogenéticas das populações de <i>Phalloceros reisi</i> utilizando caracteres do gene COI.....	45
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Ictiofauna neotropical

A ictiofauna neotropical de água doce é uma das mais diversas do mundo (SCHAEFER, 1998), com estimativas de mais de 8000 espécies (WINEMILLER et al. 2008). Somente o Brasil possui mais de 2500 espécies de peixes dulcícolas (BUCKUP et al. 2007), sendo que aproximadamente 50% delas são de pequeno porte, geralmente com menos de 15 cm (CASTRO et al. 2003).

Quando comparado com outros grupos de vertebrados, muito pouco ainda se conhece sobre a sistemática, evolução, ecologia, fisiologia e genética de peixes. Possivelmente uma das principais razões para essa carência seja o elevado número de espécies (cerca de 24.600 (NELSON, 1994)), o que equivale, aproximadamente, ao número de espécies de todos os demais vertebrados. O habitat dos peixes também proporciona uma dificuldade a mais para o seu estudo (captura, observação e determinação dos parâmetros biológicos) quando comparado com a maioria dos outros vertebrados (BOHLKE et al., 1978).

Peixes de água doce tendem a exibir níveis maiores de diferenciação genética e subdivisões entre populações do que aqueles habitando estuários ou ambientes marinhos (GYLLESNTEN, 1958; WARD et al. 1994). As diferenças na distribuição de variabilidade genética entre peixes de água doce e peixes marinhos têm sido atribuídas aos diferentes tamanhos populacionais e às barreiras geográficas em localidades de água doce, que eventualmente ocasionam isolamento de populações. (GYLLENSTEN, 1985; WARD et al. 1994).

Assim, existe a necessidade de um maior aprofundamento em estudos moleculares, morfológicos, taxonômicos e citogenéticos com enfoque na ecologia, filogenia e filogeografia de pequenos peixes de riachos, como aqueles das bacias do Alto Rio Paraná e Costeira. Estudos desta natureza, como a presente proposta, são importantes ferramentas para identificação de novas espécies, levando a novas estimativas da ictiofauna neotropical e uma atualizada caracterização da diversidade dessas espécies.

## 1.2 Bacia do Alto Rio Paraná e Bacia Costeira

A bacia hidrográfica do Alto Rio Paraná pertence à região do Paraná, incluindo o sistema dos rios Prata, Uruguai, Paraná e Paraguai, representando o segundo maior ecossistema de drenagem da América do Sul, com 3,2 milhões de km<sup>2</sup> (LOWE-MCCONNELL, 1999), e abriga grandes tributários, como os rios Grande, Paranaíba, Tietê e Paranapanema (CASTRO et al., 2003). Sua drenagem possui aproximadamente 900.000km<sup>2</sup>, incluindo o norte do Estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul, maioria do Estado de São Paulo, sul de Minas Gerais, sul de Goiás e uma área pequena do Paraguai oriental, adjacente ao Mato Grosso do Sul. (AB'SABER, 1998).

O Alto Paraná é uma área considerada complexa, especialmente em respeito à sua biogeografia, devido às atividades tectônicas ocorridas na área no início do período Terciário. (AB'SABER, 1998). Associadas a um sistema de falhas, essas atividades podem ter ocasionado um cenário com eventos de capturas de cabeceiras, como ocorrido entre os rios Tietê e Paraíba do Sul (CASTRO et al. 2003), que foram responsáveis pela distribuição de algumas espécies em drenagens vizinhas, assim como, no caso, nos rios Paraíba do Sul, Ribeira do Iguape e também algumas drenagens litorâneas de menores tamanhos. (SERRA et al. 2007).

A região da Bacia Costeira do Atlântico Sudeste possui uma área de 229.972km<sup>2</sup> distribuída por terras dos estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Espírito Santo e Paraná. As principais bacias hidrográficas desta região são as dos rios Doce e Paraíba do Sul, estando também inseridas as sub-bacias dos rios São Mateus, Itapemirim, Itabapoana e Ribeira do Iguape. (KNOPPERS et al. 2002).

## 1.3 Genes mitocondriais em estudos filogenéticos e filogeográficos e a filogeografia em peixes

Os estudos envolvendo sequências de DNA se converteram em excelentes ferramentas para auxiliar o estudo dessas variações em diversas espécies. O DNA, além de responsável por mudanças evolutivas, carrega o registro de diversos eventos ocorridos no passado, como fragmentação geográfica, fenômenos de vicariância e processos de dispersão (KALINOWSKI, 2004). O estudo da variabilidade genética populacional tem sido possível

devido ao desenvolvimento de vários marcadores moleculares, principalmente daqueles baseados no polimorfismo do DNA (SUNNUCKS, 2000). Os marcadores genéticos ou moleculares são caracteres simples herdáveis, com múltiplos estados para cada caráter, e têm sido aplicados em muitos estudos biológicos, como mapeamento genético, genética de populações, reconstruções filogenéticas, testes de paternidade, aplicações forenses e, sobretudo, em estudos de manejo e conservação genética (SCHLOTTERER, 2004).

Entre os marcadores mais comumente utilizados nestes estudos estão os genes mitocondriais. O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados e até 570 kb em algumas espécies de plantas (LEWIN, 1994). Apresenta-se altamente conservado nos animais, variando de 14 a 26 kb (BILLINGTON e HEBERT, 1991), sendo representado por 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S do rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de mtDNA possui, também, uma região controle de cerca de 1kb, rica em sequências AT e desprovida de genes, que exerce um importante papel no início da replicação do mtDNA e da transcrição do RNA. Esta região controle é conhecida como “D-loop” (*displacement loop*).

Ponzetto (2010) utilizou marcadores moleculares no gênero *Simpsonichthys* 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), buscando assim contribuir com a conservação do gênero. Além destes, vários outros trabalhos 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 (FALK et al., 2003; 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).

A filogeografia e a filogenia têm dado importantes contribuições para o entendimento da evolução das populações, espécies e comunidades de peixes em distintos ambientes neotropicais (PIORSKI et al. 2008). A filogeografia é uma associação da genética populacional, biogeografia e filogenia molecular no estudo dos polimorfismos de genes, em

populações de uma espécie ou entre espécies próximas (AVISE et al., 1987; AVISE, 2000). Este campo de estudo leva em questão os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (AVISE, 2004), permitindo examinar questões como as origens das zonas híbridas (HEWITT, 2001) e os limites das espécies (MARTÍNEZ-ORTEGA et al. 2004). Em todas estas modalidades de estudo, o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado, mostrando resultados extremamente satisfatórios (LOVEJOY e DE ARAÚJO, 2000).

Baseado em aspectos da divergência de sequências do DNA mitocondrial, Avise (2000) propôs cinco categorias filogeográficas: na categoria I, estão incluídos os casos em que as linhagens são bastante divergentes (valores superiores a 1-2%), ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). A categoria II é composta por linhagens divergentes que ocorrem na mesma área geográfica (Simpatria). Na categoria III, ocorrem linhagens com baixos valores de divergência de sequências (menores que 1%), ocupando áreas geográficas distintas (Alopatria). Na categoria IV, estão as linhagens com divergência muito baixas, ou praticamente nulas, e que estão geograficamente distantes (Simpatria, com grande área de distribuição). Na categoria V são encontradas linhagens pouco divergentes, exibindo uma separação espacial parcial e sendo intermediária entre as categorias III e IV.

De maneira geral, a presença de clones de DNA mitocondrial filogeneticamente próximos reflete a ocorrência de fluxo gênico (ao menos por via materna) ou a presença de barreiras recentes, enquanto descontinuidades genéticas mais profundas podem evidenciar separações populacionais historicamente mais antigas (AVISE, 2000).

Com o desenvolvimento desse método de estudo, a filogeografia foi revelando a história natural da diversidade de peixes de água doce na região neotropical, relacionando-a aos eventos envolvidos no estabelecimento final dos rios da América do Sul entre 15 e 10 milhões de anos atrás (LUNDBERG et al. 1998). Segundo Avise (2000), cerca de 56% (27) das espécies de peixes de água doce já analisadas apresentam padrão filogeográfico de estruturação populacional da categoria I, enquanto 17 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria III a V e apenas 4 espécies apresentam o padrão filogeográfico da categoria II. As 48 espécies listadas por Avise (2000) estão distribuídas em sistemas hidrográficos de vários continentes, principalmente Europa e América do Norte. No entanto, estudos filogeográficos em peixes Neotropicais de água doce são ainda raros perto do elevado número de espécies deste grupo.

#### 1.4 Peixes poecilídeos

Segundo Léveque et al. (2008) a grande maioria dos peixes neotropicais pertencem a cinco grupos: Characiformes, Siluriformes, Gymnotiformes, Cyprinodontiformes e Perciformes. A ordem Cyprinodontiformes constitui uma das assembléias de peixes Teleostei de água doce com maior número de espécies, incluindo aproximadamente 850 em aproximadamente 110 gêneros, e dentre os Cyprinodontiformes destacam-se os peixes da família Poeciliidae (LÉVEQUE et al. 2008)

Os poecilídeos são peixes de pequeno porte, apresentando tamanhos entre 13,9mm a 20cm, e com variações de cores e na forma do corpo, desde extremamente alongado até lateralmente comprimido (LUCINDA, 2003). Outras características morfológicas de destaque estão a boca levemente voltada para cima e a forma e posição de suas nadadeiras, com a nadadeira pélvica deslocada para a parte anterior do corpo, e a nadadeira anal transformada em um órgão copulador (gonopódio). (BRITSKI et al. 2007, SANTOS et al. 2004).

Essa família contém espécies que ocorrem desde a América Central até o norte da Argentina, além de alguns sistemas fluviais da África (PARENTI, 1981), estando presentes tanto em água doce como em águas salobras (LUCINDA, 2003), com maior sucesso em ambiente lênticos (BRITSKI et al., 2007). De acordo com Eschmeyer e Fong (2012), peixes da família Poeciliidae estão incluídos em três subfamílias: Poeciliinae (272 espécies nominais), Procatopodinae (58 espécies nominais) e Aplocheilichthyinae (20 espécies).

A subfamília Poeciliinae é amplamente distribuída pelas Américas e é caracterizada pela presença de gonopódios, formados pela nadadeira anal modificada em machos, e por apresentarem fertilização interna e viviparidade. Nesta subfamília estão incluídos os peixes de aquários conhecidos com *guppies*, *mosquito fishes* e *guarus*, sendo muito familiares também no meio não científico (LUCINDA, 2003).

Com relação aos aspectos taxonômicos e relações filogenéticas dos poecilídeos, muito pouco têm se feito desde que os primeiros trabalhos com a família tiveram início. Revisões taxonômicas têm sido propostas e hipóteses sobre a organização das espécies da família têm fornecido ideias sobre as suas relações. Esses trabalhos têm tentado organizar as espécies em tribos e supertribos; contudo, nenhum deles tem se demonstrado convincente, havendo, ainda, muitas lacunas no conhecimento sobre o status dos gêneros de Poeciliidae.

### 1.5 Gênero *Phalloceros*

O gênero *Phalloceros* Eigenmann, 1907, possui ampla distribuição e, da mesma forma que os demais integrantes da família, por muito tempo teve seus aspectos sistemáticos e filogenéticos imprecisos. Até o ano de 2008, *Phalloceros caudimaculatus* era a única espécie formalmente descrita. Em uma revisão feita por Lucinda (2008), foram descritas 21 novas espécies provenientes de diversas regiões onde o padrão de cor, bem como caracteres merísticos e morfométricos, auxiliaram neste reconhecimento de novas espécies. Contudo, segundo este mesmo autor, tanto a real diversidade de espécies, quanto as relações interespecíficas do grupo, continuam desconhecidas até o momento. Dessa forma, considerando o modo de vida das espécies deste gênero, bem como o histórico de desconhecimento sobre a organização taxonômica, exames detalhados de sequências de DNA mitocondrial podem revelar características interessantes das espécies bem como auxiliar seu posicionamento dentro do gênero.

A espécie *Phalloceros reisi*, conhecida popularmente como *guaru*, é encontrada facilmente em pequenos rios que compõem a bacia do Alto Rio Paraná. Suas características citogenéticas ainda são desconhecidas, assim como os caracteres do seu genoma mitocondrial. (LUCINDA, 2008).

## 2 OBJETIVO

O presente trabalho visou abordar questões acerca das relações filogenéticas e filogeográficas de populações de *Phalloceros reisi* (Cyprinodontiformes, Poeciliidae) utilizando genes do genoma mitocondrial como marcadores moleculares.

O principal objetivo do trabalho foi testar a hipótese de que as populações isoladas de *P. reisi* analisadas apresentam compartilhamento de haplótipos entre as populações, além de obter dados que auxiliem a determinar o status taxonômico de *P. reisi* dos diferentes locais estudados.

### 3 METODOLOGIA

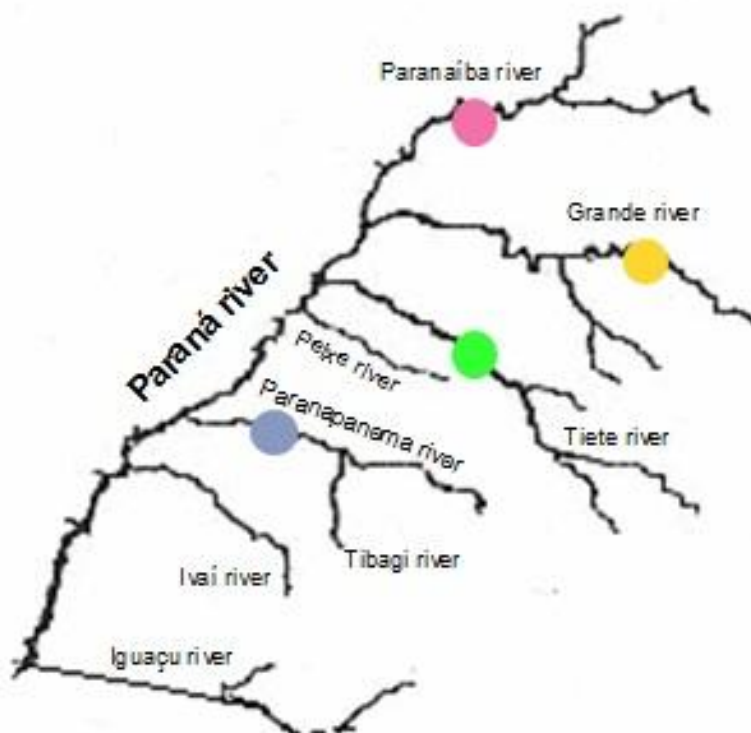
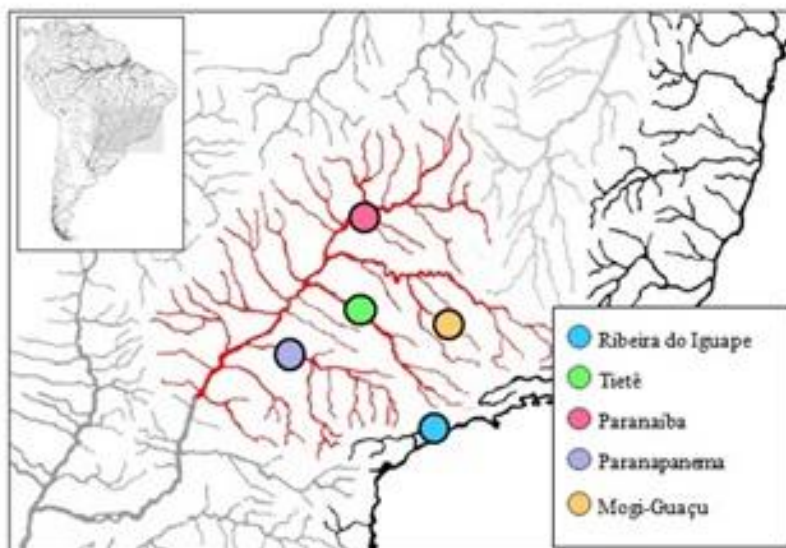
#### 3.1 Materiais

O material utilizado faz parte da coleção de tecidos e preparações citogenéticas já existentes no Laboratório de Citogenética da UNESP, campus de Rio Claro.

Foram utilizados exemplares da espécie *Phalloceros reisi* provenientes de quatro sub-bacias do sistema Alto Rio Paraná, Paranapanema, Tietê, Mogi-Guaçu e Paranaíba, e uma da Bacia Costeira, Ribeira do Iguape (Figura 1).

A amostragem completa dos 49 exemplares encontra-se no Quadro 1, totalizando 9 populações: três do rio Paranapanema, uma do rio Tietê, uma do rio Mogi-Guaçu, três da Ribeira do Iguape e uma do rio Paranaíba.

**Figura 1** - Rede hidrográfica das bacias do Alto Rio Paraná e Costeira, evidenciando as sub-bacias do Alto Paraná e os rios de procedência das amostras analisadas.



**Quadro 1** - Lista de indivíduos amostrados de acordo com a localidade.

<b>Lote</b>	<b>Nº</b>	<b>Procedência</b>	<b>Sub-bacia</b>
123	1	Rio Véu da Noiva	Paranapanema
123	2	Rio Véu da Noiva	Paranapanema
123	3	Rio Véu da Noiva	Paranapanema
124	1	Córrego Cascatinha	Tietê
124	2	Córrego Cascatinha	Tietê
124	3	Córrego Cascatinha	Tietê
124	4	Córrego Cascatinha	Tietê
124	5	Córrego Cascatinha	Tietê
125	1	Descalvado-Pirassununga	Mogi-Guaçu
125	2	Descalvado-Pirassununga	Mogi-Guaçu
125	3	Descalvado-Pirassununga	Mogi-Guaçu
125	4	Descalvado-Pirassununga	Mogi-Guaçu
125	5	Descalvado-Pirassununga	Mogi-Guaçu
127	1	Ribeirão do Turvo	Paranapanema
127	2	Ribeirão do Turvo	Paranapanema
127	3	Ribeirão do Turvo	Paranapanema
127	4	Ribeirão do Turvo	Paranapanema
127	5	Ribeirão do Turvo	Paranapanema
128	1	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape
128	2	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape
128	3	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape
128	4	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape
128	5	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape
128	6	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape

128	7	Rio Jacupiranguinha (Bunge)	Ribeira do Iguape
129	1	Rio Betari	Ribeira do Iguape
129	2	Rio Betari	Ribeira do Iguape
129	3	Rio Betari	Ribeira do Iguape
129	4	Rio Betari	Ribeira do Iguape
129	5	Rio Betari	Ribeira do Iguape
129	6	Rio Betari	Ribeira do Iguape
129	7	Rio Betari	Ribeira do Iguape
132	1	Rio Betari (SP250)	Ribeira do Iguape
132	2	Rio Betari (SP250)	Ribeira do Iguape
132	5	Rio Betari (SP250)	Ribeira do Iguape
132	6	Rio Betari (SP250)	Ribeira do Iguape
132	7	Rio Betari (SP250)	Ribeira do Iguape
133	1	Paranapanema	Paranapanema
133	2	Paranapanema	Paranapanema
133	3	Paranapanema	Paranapanema
133	4	Paranapanema	Paranapanema
133	5	Paranapanema	Paranapanema
134	1	Córrego dos Fundos	Paranaíba
134	2	Córrego dos Fundos	Paranaíba
134	3	Córrego dos Fundos	Paranaíba
134	4	Córrego dos Fundos	Paranaíba
134	5	Córrego dos Fundos	Paranaíba
134	6	Córrego dos Fundos	Paranaíba
134	7	Córrego dos Fundos	Paranaíba

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA de amostras de fígado e/ou nadadeiras foi realizada utilizando a técnica de Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico, de acordo com o protocolo que segue (SAMBROOK, 2001).

As amostras de tecidos foram colocadas em tubos eppendorf juntamente com a solução de lise (composta por 300  $\mu$ L de TNE 1X; 30  $\mu$ L de Tris-HCL 1M pH=8,0; 20  $\mu$ L de SDS 10% e 25  $\mu$ L de proteinase K/20mg/mL) recém preparada. Os tubos foram submetidos à brusca agitação (vórtex) por 15 segundos cada.

Após este procedimento, os tubos foram mantidos em estufa a 37°C overnight. Em seguida, receberam 8  $\mu$ L de solução aquosa de RNase na concentração 10mg/mL e permaneceram em estufa na mesma temperatura por mais 1 hora, sendo agitados a cada 30 minutos. Transcorrido esse tempo, foram adicionados aos tubos, com os tecidos completamente digeridos, 400  $\mu$ L de uma mistura de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25: 24: 1), utilizando-se a capela.

Mais uma vez o material foi submetido a uma brusca agitação por 30 segundos e, em seguida, centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos. Os tubos foram retirados da centrífuga com cuidado para não misturar as fases e o sobrenadante (fase alcoólica contendo DNA) foi transferido para um novo tubo devidamente identificado. Então, 60  $\mu$ L de acetato de sódio 3M (pH= 5,3) foram adicionados e o tubo foi invertido lentamente para a completa mistura do sal com a solução.

Posteriormente, mais 600  $\mu$ L de etanol absoluto gelado foram adicionados aos tubos, os quais foram invertidos como no passo anterior. Os tubos permaneceram mantidos no freezer por 30 minutos e centrifugados a 14.000 rpm por 30 minutos para a completa retirada da mistura etanol e acetato de sódio. Em seguida, o sobrenadante (fase líquida) foi descartado, certificando-se que o precipitado de DNA continuou aderido à parede do tubo.

Os tubos receberam, então, 150  $\mu$ L de solução de etanol 70% a temperatura ambiente e foram novamente levados a centrífuga a 14.000 rpm por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado como na etapa anterior, para que o precipitado de DNA continuasse aderido à parede do tubo. Esse passo foi repetido mais uma vez para garantir a retirada de todo o sal adicionado ao DNA.

A partir daí, os tubos foram colocados abertos sobre folhas de papel absorventes em estufa a 37°C por 30 minutos para secagem do DNA. Após esse período, o DNA foi suspenso novamente com 100 µL de água ultrapura autoclavada, por meio de agitação delicada do tubo para desprendimento total do DNA aderido à parede. O material foi levado para a estufa a 37°C por 30 minutos e, posteriormente, transferido para a geladeira (4°C) overnight.

O armazenamento do mesmo foi feito em freezer (-20°C) para conservação por longo prazo.

As amostras foram aplicadas em gel de agarose 1% corados com 2µL de SYBER Safe (10.000X) (Invitrogen®) para análise. A quantificação e avaliação da qualidade das amostras foram realizadas através da visualização das bandas em um transiluminador de luz ultravioleta.

### 3.2.2. Amplificação do DNA via PCR

A reação de amplificação por PCR dos genes mitocondriais ATP sintetase 6 e 8 (ATPase 6/8) e Citocromo c Oxidase Subunidade I (COI) foi obtida através do kit Mix PCR (Quiagen), seguindo as determinações do fabricante, e a reação foi realizada em um termociclador (EPPENDORF™).

A porção dos genes ATPase 6/8 amplificada corresponde àquela flanqueada pelos *primers* L8331 (5' - AA GCR TYR GCC TTT TAA GC - 3') - H9236 (5' - GTT AGT GGT CAK GGG CTT GGR TC - 3') e o programa de PCR para este gene consiste de um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 40s, seguido de 35 ciclos a 94°C por 30s, 55°C por 40s para anelamento dos *primers*, 68°C por 2 minutos, estendendo a cadeia, e uma extensão final de 72°C por 5 minutos.

Para a o gene COI, a porção amplificada foi feita a partir dos *primers* Fish F2 (5' - TCG ACT AAT CAT AAA GAT ATC GGC AC - 3') e Fish R2 (3' - ACT TCA GGG TGA CCG AAG AAT CAG AA - 5') e os parâmetros utilizados no programa de PCR para a amplificação consistem em desnaturação a 94°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de anelamento dos *primers*, a 94°C por 30s e 50°C também por 30s, e extensão da cadeia a 60°C, por 4 minutos, com a extensão final a 72°C por 5 minutos.

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% corados com 2µL de SYBER Safe (10.000X) (Invitrogen®). As bandas puderam

ser visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta e a determinação do tamanho das sequências foi realizada através do marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

### 3.2.3. Sequenciamento

Para o sequenciamento dos produtos de PCR, as amostras foram purificadas através do tratamento com a enzima EXOSAP utilizando-se 10 µL de produto de PCR, 2 µL EXOSAP e 2 µL H<sub>2</sub>O. A reação ocorreu em um ciclo de 60 minutos a 37°C seguido por um ciclo de 15 minutos a 80°C.

Após a purificação, as amostras foram enviadas à empresa Macrogen Inc. (Seoul, Coréia) para o sequenciamento.

### 3.2.4. Análise das sequências

A edição das sequências foi feita utilizando o programa BioEdit, através do qual foram retiradas as extremidades de baixa qualidade e substituídas as bases “N”, que não haviam sido identificadas pelo sequenciador, através da comparação de bases entre o sequenciamento *forward* e *reverse*. As sequências foram alinhadas através da ferramenta ClustalW.

A ferramenta BLAST – Basic Local Alignment Search Tool, do National Center for Biotechnology Information (NCBI), website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) foi utilizada para comparação das sequências obtidas com sequências já depositadas no banco de dados.

### 3.2.5. Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram conduzidas para os genes mitocondriais ATPase 6/8 e COI, através do programa MEGA 6.06 (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*) (TAMURA et al., 2007), para determinação das composições nucleotídicas das sequências obtidas, das distâncias genéticas e das árvores filogenéticas. Em relação às árvores filogenéticas, estas foram elaboradas a partir dos métodos de *Neighbor-Joining* (NJ) e

*Maximum Parsimony* (MP) - para suporte aos clados que foram obtidos nas árvores filogenéticas foi empregado o teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985), utilizando-se 1000 réplicas para cada método citado. Para os métodos NJ e ME, foi utilizado o modelo evolutivo *Kimura 2-parametros* (K2P) (KIMURA, 1980). Ainda no programa MEGA 6.06, foi calculada a distância genética para as sequências de ambos os genes, novamente com o modelo evolutivo *Kimura 2-parametros* (KIMURA, 1980), tornando possível o cálculo da divergência entre as mesmas.

### 3.2.6. Análises filogeográficas

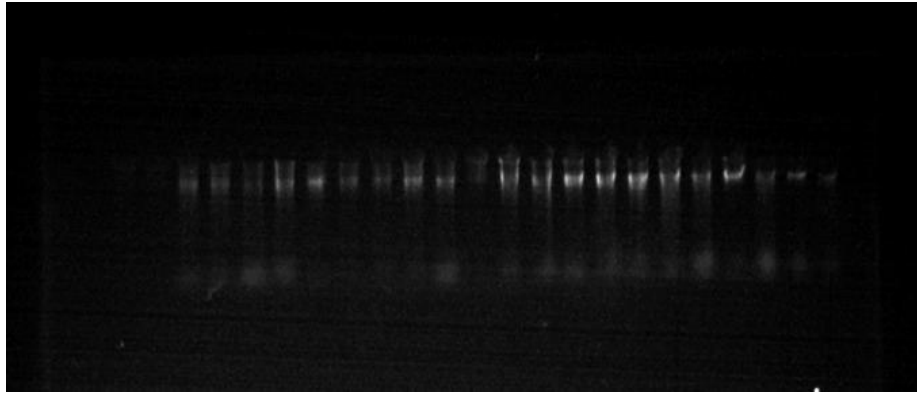
A identificação da rede de haplótipos para avaliar a associação entre haplótipos e sua distribuição geográfica para os genes ATPase 6/8 foi inferida a partir do programa TCS Package v. 1.21 (CLEMENT et al., 2000), que emprega o método de gerar redes de haplótipos utilizando parcimônia estatística (TEMPLETON et al., 1992).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Extração de DNA

A partir da análise do gel de agarose 1%, é possível observar que o DNA de *Phalloceros reisi* foi extraído com sucesso. Pelo menos 2 indivíduos de cada localidade foram selecionados para a extração. (Figura 2).

**Figura 2** - Gel de agarose para observação da extração do DNA de exemplares da espécie *Phalloceros reisi* de diferentes sub-bacias.

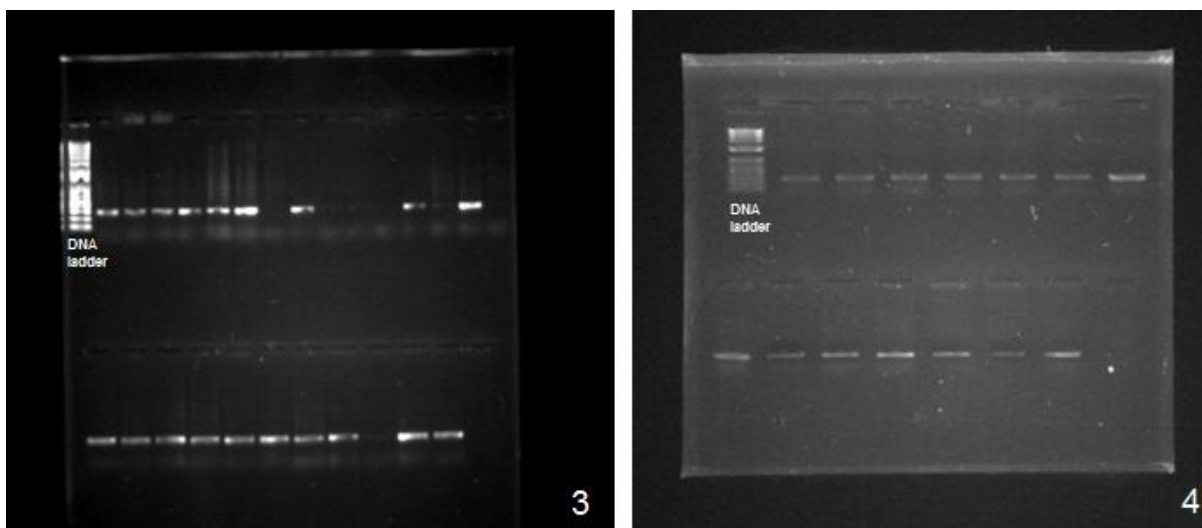


### 4.2 Amplificação do DNA via PCR

#### 4.2.1. Gene mitocondrial ATP Sintetase 6/8

É possível observar que os fragmentos de DNA das amostras da espécie estudada foram amplificados e apresentam sequências de tamanhos semelhantes (Figuras 3 e 4).

**Figuras 3 e 4** - Géis de agarose para observação da reação de PCR (amplificação de ATPase) feita em amostras de *P. reisi*, de diferentes sub-bacias. No primeiro poço de cada gel foi acrescentado o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder para comparação da altura das bandas.

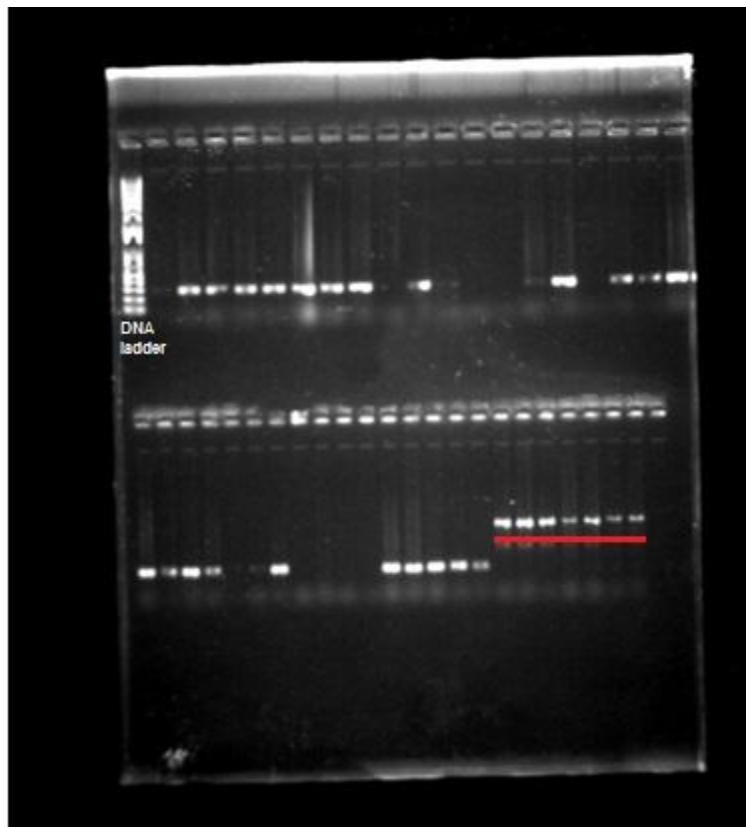


Como pode ser visto nas figuras 3 e 4, os tamanhos das amplificações para as diferentes amostras mostram-se diferentes daquele normalmente encontradas para os genes 6/8, que é de aproximadamente 850 pares de base.

A maioria das amostras teve produtos de PCR em torno de 350 a 550 pares de base, o que foi confirmado na posterior análise das sequências utilizando a ferramenta BLAST apenas.

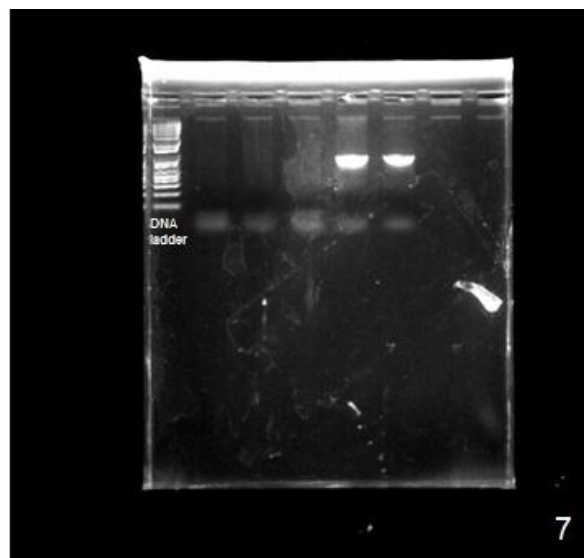
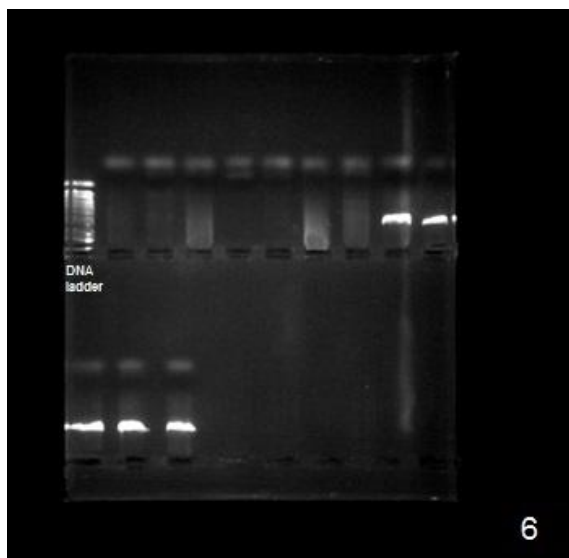
Um lote, de código 134, proveniente do Rio Córrego dos Fundos da Sub-bacia Paranaíba, teve o gene ATPase amplificado por completo. Este foi o único lote que apresentou uma altura de banda correspondente com o tamanho do gene segundo a literatura e o mesmo resultado foi obtido para todas as amostras analisadas do lote e em todas as amplificações feitas, utilizando sempre o mesmo *primer* para todos os lotes. Esta discrepância entre este lote e o restante das amostras é bem evidente, como pode ser visto na figura 5.

**Figura 5** - Gel de agarose para observação da reação de PCR feita em diferentes amostras de *P. reisi*, de diferentes sub-bacias. As últimas sete bandas, evidenciadas em vermelho, correspondem aos produtos de PCR de amostras do lote 134. É possível aproximar a quantidade de pares de base destes produtos ao tamanho comumente descrito para ambos os genes de ATPase (850pb) pela observação com o DNA Ladder 1 Kb Plus no primeiro poço do gel.



Partindo desta diferença, foi desenhado um *primer* a partir de uma sequência deste lote 134 para novas investigações acerca das ampliações discrepantes. A porção amplificada corresponde àquela flanqueada pelos *primers* ATPaseCF (5' - TTT ACC GCC ATT GTT CTT CC - 3') e ATPaseCR (5' - GGT ATG CAT GTG CTT GAT GG- 3'). Curiosamente, apenas as amostras deste lote foram amplificadas em todas as reações de amplificação para o gene em questão, como mostra as figuras 6 e 7. Nenhuma outra amostra, de nenhum dos lotes restantes, teve esta sequência amplificada durante as diversas reações com este *primer* específico.

**Figuras 6 e 7** - Géis de agarose para observação da reação de PCR com amplificação feita com o *primer* desenhado a partir do lote 134. No primeiro poço de cada gel foi acrescentado o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder, para comparação da altura das bandas, e nota-se que as únicas amostras amplificadas apresentam tamanho aproximado do gene em questão (850pb), sendo estas justamente aquelas correspondentes aos indivíduos deste lote. As amostras não amplificadas, no restante dos poços, correspondem a indivíduos de outras localidades.

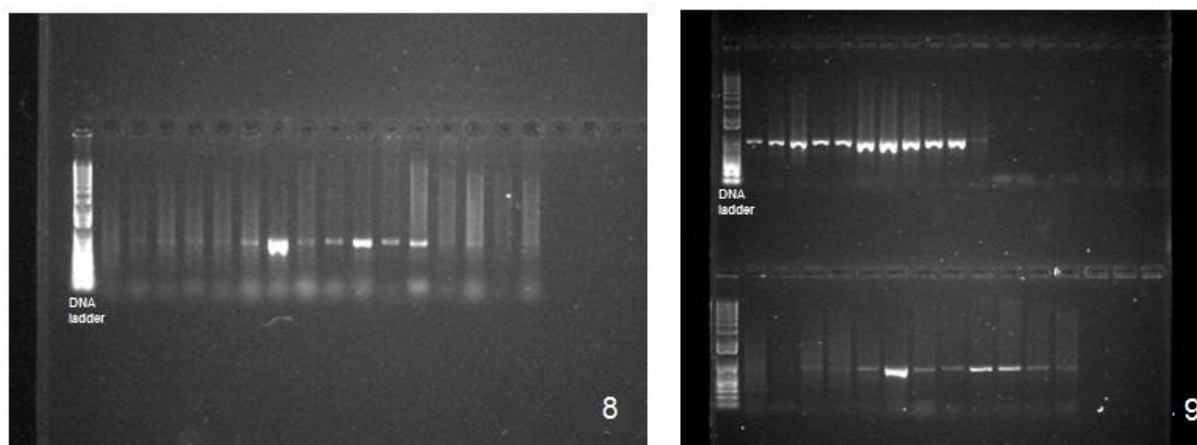


#### 4.2.2. Gene mitocondrial Citocromo c Oxidase I

Para este gene, as reações obtiveram produtos de PCR bem amplificados, e passíveis de serem sequenciados e gerarem boas sequências para posteriores análises. A reação foi repetida diversas vezes para alcançar a melhor qualidade para os produtos de PCR que não ficavam bem amplificados durante as primeiras vezes. Assim, ao final das diversas ampliações, a grande maioria das amostras ficou bem amplificada.

A partir dos géis de agarose (Figuras 8 e 9), vê-se que os fragmentos de DNA foram amplificados e apresentam sequências de tamanhos semelhantes.

**Figuras 8 e 9** - Géis de agarose para observação da reação de PCR (amplificação de COI) feita em amostras de *P. reisi*, de diferentes sub-bacias. No primeiro poço de cada gel foi acrescentado DNA Ladder 1 Kb Plus.



Diferentemente do ATPase, todas as amostras, de todas as localidades, apresentaram bandas de altura idêntica, inclusive para o lote proveniente do Córrego dos Fundos que, para o outro gene, tinha uma quantidade de pares de base discrepante do restante. O tamanho das bandas observado confere com o tamanho dos fragmentos normalmente descrito para o gene na literatura, que é de 655 pb (WARD et al., 2005; HEBERT et al., 2003).

#### 4.3 Sequenciamento e alinhamento

Foram escolhidos 48 produtos de PCR dos genes ATPase 6/8, de 9 populações diferentes (Betari, Cascatinha, Betari-SP250, Paranapanema, Véu da Noiva, Córrego dos Fundos, Descalvado-Pirassununga, Jacupiranguinha, Ribeirão do Turvo) e 21 produtos do gene COI, de 6 populações (Véu da Noiva, Cascatinha, Ribeirão do Turvo, Paranapanema, Descalvado-Pirassununga, Jacupiranguinha), para serem purificados e enviados para sequenciamento na empresa MacroGen. As sequências editadas e alinhadas no programa BioEdit. Essas sequências foram analisadas na ferramenta BLAST para verificar o tamanho de cada uma delas e as similaridades existentes com outras sequências disponíveis nos bancos de dados.

### 4.3.1 ATPase 6/8

Quarenta e oito amostras para ATPase 6/8 apresentaram sequências boas para serem editadas. Estas sequências apresentaram diferentes tamanhos, variando de 335pb a 444pb. Foi possível verificar que praticamente todas as sequências apresentaram similaridade de 95,3% com um gene mitocondrial da espécie de peixe *Oryzias dancena* (Beloniformes, Adrianichthyidae), embora sem a especificação de qual gene do DNA mitocondrial seria esse. Apesar disso foi evidenciada similaridade de 82,4% com os genes ATPase 6/8 da espécie de réptil *Brachymeles gracilis* (Squamata, Scincidae), o que, apesar de tratar-se de um grupo vertebrado diferente, é suficiente para inferir que o gene em questão trata-se mesmo do gene desejado. Na figura 10 abaixo consta o *print screen* da página da ferramenta BLAST onde é possível ver a tabela gerada pelo programa para a maioria das amostras analisadas.

**Figura 10** - *Print screen* da página contendo as 13 primeiras similaridades na lista de resultado da ferramenta BLAST. A mesma página foi gerada para a maioria das sequências obtidas. É possível observar que na 12ª posição, para *Brachymeles gracilis*, os genes ATPase 6/8 está evidenciado.

Sequences producing significant alignments:							
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected:0							
Alignments <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Oryzias dancena mitochondrial DNA, complete genome</a>	95.3	95.3	15%	4e-16	95%	<a href="#">AB498069.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Oryzias melastigma mitochondrial, complete genome</a>	93.5	93.5	15%	1e-15	95%	<a href="#">JQ713914.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Heterotis niloticus mitochondrial DNA, complete genome</a>	93.5	93.5	15%	1e-15	95%	<a href="#">AP009498.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Oryzias dancena isolate Indonesia mitochondrial, complete genome</a>	93.5	93.5	15%	1e-15	95%	<a href="#">GU013789.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Chlorophthalmus aqassizi mitochondrial DNA, complete genome, except for D-loop</a>	91.6	91.6	14%	5e-15	95%	<a href="#">AP002918.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Amphiprion bicinctus isolate RSRCmb2010 mitochondrial, complete genome</a>	89.8	89.8	15%	2e-14	93%	<a href="#">JQ030887.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Heterotis niloticus mitochondrial, partial genome</a>	87.9	87.9	15%	6e-14	93%	<a href="#">FJ890318.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Polymixia lowei mitochondrial DNA, complete genome</a>	87.9	87.9	14%	6e-14	95%	<a href="#">AP002927.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Tridentiger barbatus mitochondrial, complete genome</a>	86.1	86.1	14%	2e-13	95%	<a href="#">JX536694.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Petrocephalus soudanensis mitochondrial DNA, complete genome</a>	86.1	86.1	14%	2e-13	93%	<a href="#">AP009502.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Oryzias melastigma cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial</a>	84.2	84.2	14%	8e-13	93%	<a href="#">JF437720.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Brachymeles gracilis gracilis voucher KU 326099 cytochrome c oxidase subunit II gene, partial cds; IRNA-Lys gene, complete sequence; ATPase 8 (ATP8) and</a>	82.4	82.4	15%	3e-12	92%	<a href="#">HQ907197.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Brachymeles gracilis gracilis voucher KU 326098 cytochrome c oxidase subunit II gene, partial cds; IRNA-Lys gene, complete sequence; ATPase 8 (ATP8) and</a>	82.4	82.4	15%	3e-12	92%	<a href="#">HQ907198.1</a>

Algumas poucas sequências não tiveram similaridade com os genes ATPase 6/8 da espécie *Brachymeles gracilis*, constando apenas que se tratava de similaridade com o DNA mitocondrial de *Oryzias dancena* (Figura 11). A quantidade de resultados para similaridades também foi consideravelmente menor. Ainda assim, as sequências foram consideradas nas análises posteriores.

**Figura 11** - *Print screen* da página contendo todos os resultados de similaridades da ferramenta BLAST para as sequências que não obtiveram ATPase 6/8 específicos como genes resultante, mas que obtiveram similaridade com o DNA mitocondrial da espécie *Oryzias dancena*, com 95% de identidade.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Oryzias dancena mitochondrial DNA, complete genome</a>	93.5	93.5	13%	2e-15	95%	<a href="#">AB498069.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Oryzias melastigma mitochondrion, complete genome</a>	91.6	91.6	13%	6e-15	95%	<a href="#">JQ713914.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Oryzias dancena isolate Indonesia mitochondrion, complete genome</a>	91.6	91.6	13%	6e-15	95%	<a href="#">GU013789.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xiphophorus hellerii mitochondrion, complete genome</a>	91.6	91.6	12%	6e-15	96%	<a href="#">FJ226476.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xiphophorus maculatus mitochondrial DNA, complete genome</a>	91.6	91.6	11%	6e-15	98%	<a href="#">AP005982.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Xiphophorus hellerii strain RR-B mitochondrion, complete genome</a>	87.9	87.9	12%	7e-14	95%	<a href="#">FJ234985.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Petrocephalus soudanensis mitochondrial DNA, complete genome</a>	86.1	86.1	13%	3e-13	93%	<a href="#">AP009502.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Oryzias melastigma cytochrome oxidase subunit III mRNA, complete cds; mitochondrial</a>	82.4	82.4	12%	3e-12	93%	<a href="#">JF437720.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Iso hawaiiensis mitochondrial DNA, complete genome</a>	82.4	82.4	11%	3e-12	96%	<a href="#">AB373006.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Pogonocherus volitans mitochondrial DNA, complete genome</a>	82.4	82.4	11%	3e-12	96%	<a href="#">AP005984.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Doederleinia beryoides mitochondrial genomic DNA, complete genome</a>	82.4	82.4	11%	3e-12	96%	<a href="#">AP009181.1</a>

No caso daquele grupo de sete indivíduos que apresentou amplificação de uma sequência maior do gene (lote 134), o resultado no programa BLAST também foi diferente dos demais. Para as sete amostras analisadas, todas apresentaram maior similaridade com a espécie *Poecilia reticulata*, de nome comum “Guppy”, um importante representante da mesma família de *Phalloceros reisi*, Poeciliidae, bem como para os próprios genes ATPase 6/8, como é possível ver no *print screen* da página de resultado (Figura 12).

**Figura 12** - *Print screen* da página contendo as primeiras similaridades na lista de resultado da ferramenta BLAST. A mesma página foi gerada para as 7 sequências do lote 134. É possível observar a alta similaridade com a espécie *P. reticulata*, com 97% de identidade, e a identificação do gene em questão.

Sequences producing significant alignments:

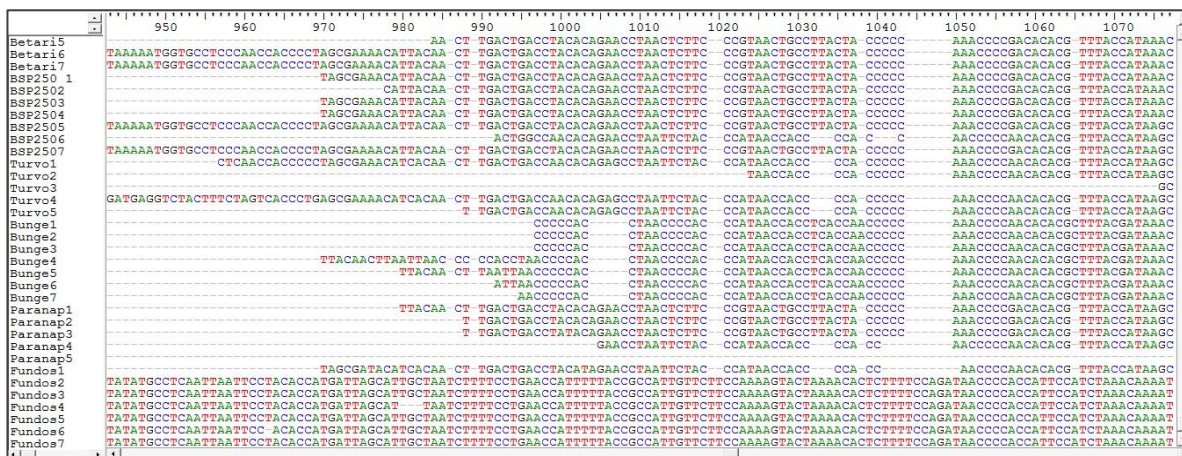
Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

Alignments [Download](#) [GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#)

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata voucher stri4289 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	1349	2679	96%	0.0	97%	<a href="#">JX968649.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata voucher stri4290 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	1338	2657	96%	0.0	97%	<a href="#">JX968650.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata voucher RD122 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	1288	2563	96%	0.0	96%	<a href="#">JX968648.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata voucher RD121 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	1282	2552	96%	0.0	95%	<a href="#">JX968647.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia reticulata mitochondrial DNA, complete genome &gt;tblk013505.1 Poecilia reticulata mitochondrion, complete genome</a>	1279	2552	99%	0.0	94%	<a href="#">AB898687.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia orn voucher stri8747 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	876	1749	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968605.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia orn voucher stri8706 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	876	1749	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968606.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia hondurensis voucher stri8520 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	870	1732	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968602.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia cf. sphenops 2 FA-2013 voucher stri1736 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	867	1732	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968637.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia hondurensis voucher stri8568 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	865	1721	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968601.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia cf. sphenops 2 FA-2013 voucher stri4162 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	861	1721	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968638.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Poecilia mexicana voucher SA116 ATP synthase 8 and ATP synthase 6 genes, complete cds; mitochondrial</a>	856	1704	96%	0.0	86%	<a href="#">JX968688.1</a>

Após as análises na ferramenta BLAST, as sequências foram alinhadas também no programa BioEdit (Figura 13).

**Figura 13** - Alinhamento das sequências de ATPase pelo programa BioEdit.



#### 4.3.2 Citocromo Oxidase I

Vinte e uma sequências favoráveis do gene COI quando analisadas na ferramenta BLAST, apresentaram tamanhos entre 530 a 671pb, valores estes aproximados do gene descrito na literatura. Foi possível verificar que praticamente todas as sequências apresentaram similaridade com o gene COI da espécie *Phalloceros harpagos*, tendo o valor de identidade variando de 94% a 100% (Figura 14).

**Figura 14** - *Print screen* da página contendo as primeiras similaridades na lista de resultado da ferramenta BLAST, resultado obtido em praticamente todas as sequências analisadas. É possível observar a espécie do mesmo gênero de *Phalloceros reisi*, *Phalloceros harpagos*, está em primeiro na lista de resultados, com 99% de identidade, bem como a espécie *P. uai*. Similaridade com *P. reisi* também aparece no resultado, em quarto lugar na lista, também com 99% de identidade.

Sequences producing significant alignments:							
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected:0							
Alignments <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-37500 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1190	1190	98%	0.0	99%	<a href="#">GU701585.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-37497 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1190	1190	98%	0.0	99%	<a href="#">GU701581.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-37498 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1186	1186	98%	0.0	99%	<a href="#">GU701580.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros reisi voucher LBP-9182 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1179	1179	98%	0.0	99%	<a href="#">HM065013.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBPV-44760 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1162	1162	96%	0.0	99%	<a href="#">JN989117.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBPV-44759 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1149	1149	95%	0.0	99%	<a href="#">JN989118.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBPV-44523 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1146	1146	95%	0.0	99%	<a href="#">JN989120.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-29983 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1140	1140	98%	0.0	98%	<a href="#">GU701583.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-29984 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1140	1140	98%	0.0	98%	<a href="#">GU701582.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-29755 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1129	1129	98%	0.0	98%	<a href="#">GU701579.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros reisi voucher LBP-9180 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	1120	1120	93%	0.0	99%	<a href="#">GU702168.1</a>

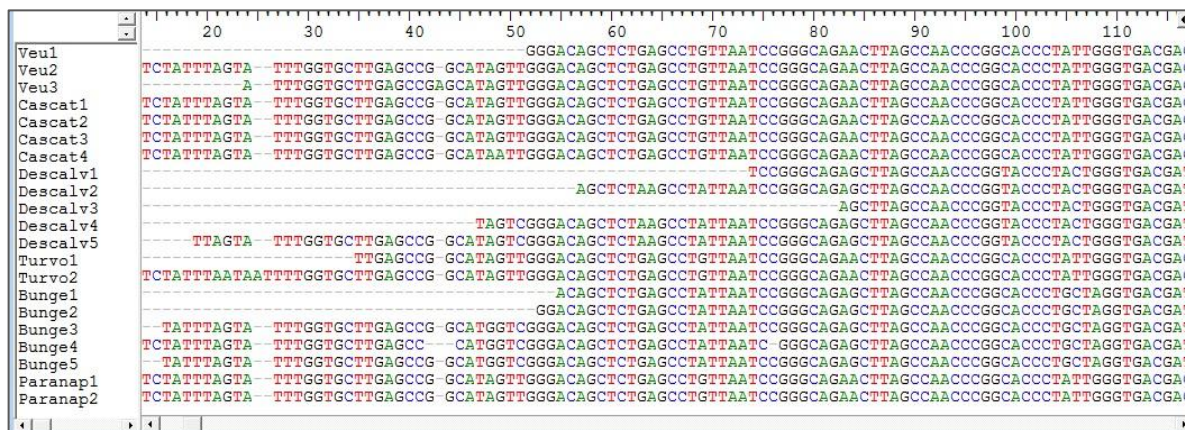
Um lote em especial, de código 128 e de procedência do rio Jacupiranguinha, Ribeira do Iguape, apresentou, para as cinco amostras analisadas, identidade de 95% com o gene COI da espécie *Phalloceros reisi*, como é possível ver na Figura 15.

**Figura 15** - *Print screen* da página contendo as 11 primeiras similaridades na lista de resultado da ferramenta BLAST para amostra do lote procedente do rio Jacupiranguinha. É possível observar a espécie de estudo, *Phalloceros reisi*, como primeiro resultado, com 95% de identidade.

Sequences producing significant alignments:							
Select: <a href="#">All</a> <a href="#">None</a> Selected:0							
Alignments <a href="#">Download</a> <a href="#">GenBank</a> <a href="#">Graphics</a> <a href="#">Distance tree of results</a>							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros reisi voucher LBP-40245 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	953	953	99%	0.0	95%	<a href="#">GU701910.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-29755 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	939	939	100%	0.0	94%	<a href="#">GU701579.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros uai voucher DCC01181 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	935	935	99%	0.0	94%	<a href="#">HM405181.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros uai voucher DCC01180 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	935	935	99%	0.0	94%	<a href="#">HM405180.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros uai voucher DCC31589 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	935	935	99%	0.0	94%	<a href="#">HM404944.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros uai voucher DCC31588 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	935	935	99%	0.0	94%	<a href="#">HM404943.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros uai voucher DCC31643 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	935	935	99%	0.0	94%	<a href="#">HM404912.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-29983 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	928	928	100%	0.0	94%	<a href="#">GU701583.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-29984 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	928	928	100%	0.0	94%	<a href="#">GU701582.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-37500 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	920	920	99%	0.0	94%	<a href="#">GU701585.1</a>
<input type="checkbox"/>	<a href="#">Phalloceros harpagos voucher LBP-37497 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds: mitochondrial</a>	920	920	99%	0.0	94%	<a href="#">GU701581.1</a>

Assim como para o ATPase, após as análises na ferramenta BLAST as seqüências foram alinhadas no programa BioEdit (Figura 16).

**Figura 16** - Alinhamento das seqüências de COI pelo programa BioEdit.



#### 4.4 Análises filogenéticas

As análises filogenéticas foram realizadas através do programa MEGA 6.06 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). Foram consideradas seqüências de produtos amplificados com os genes ATPase 6/8 e Citocromo c Oxidase I (COI).

##### 4.4.1 ATPase 6/8

No programa MEGA 6.06 foram analisados os pares de base conservados, pares de base variáveis e sítios informativos de análise de máxima parcimônia (Tabela 1), bem como as composições nucleotídicas (Tabela 2).

**Tabela 1** - Quantidade de pares de base conservados, variáveis e de máxima parcimônia das 48 sequências de ATPase 6/8 a partir dos resultados gerados pelo programa MEGA 6.06.

Pares de base conservados	1365/2054
Pares de base variáveis	475/2054
Sítios informativos de análise de máxima parcimônia	288/2054

**Tabela 2** - Valores de composição nucleotídica média das sequências de ATPase analisadas.

Nucleotídeos	Quantidade (%)
T (U)	24,7
C	30,9
A	32,8
G	11,5

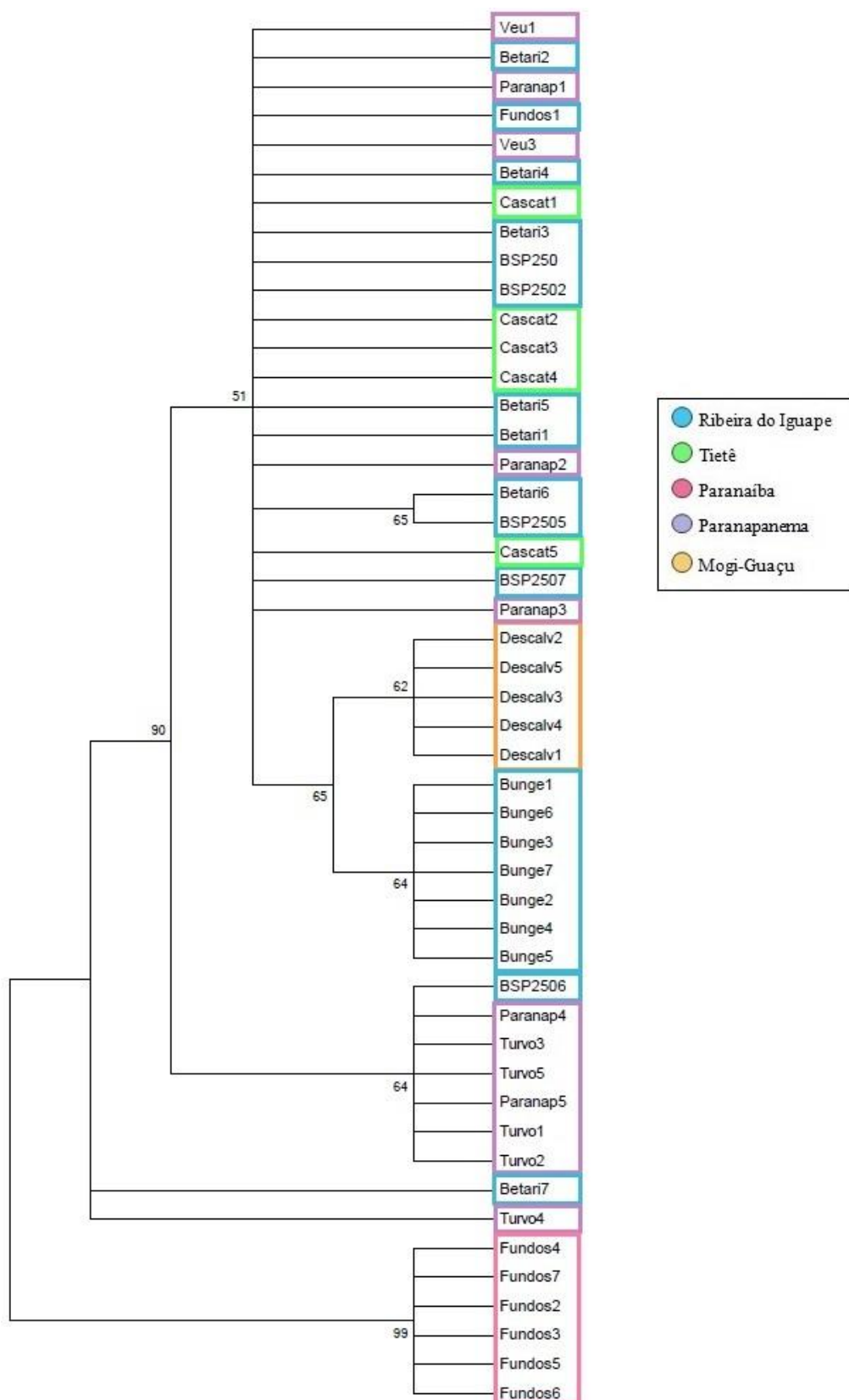
Também foram geradas no programa MEGA árvores filogenéticas de Neighbour-Joining (Figura 17) e Máxima Parcimônia (Figura 18), nas quais fica evidenciada a divisão em 5 grupos distintos:

- **Grupo A:** 6 de Betari, 5 de Córrego Cascatinha, 4 de Betari-SP250, 3 de Paranapanema, 2 de Véu da Noiva, 1 de Córrego dos Fundos;
- **Grupo B:** 5 amostras de Descalvado-Pirassununga;
- **Grupo C:** 7 amostras de Jacupiranguinha (Bunge);
- **Grupo D:** 4 amostras de Ribeirão do Turvo, 2 de Paranapanema e 1 de Betari-SP250;
- **Grupo E:** 6 amostras do Córrego dos Fundos.

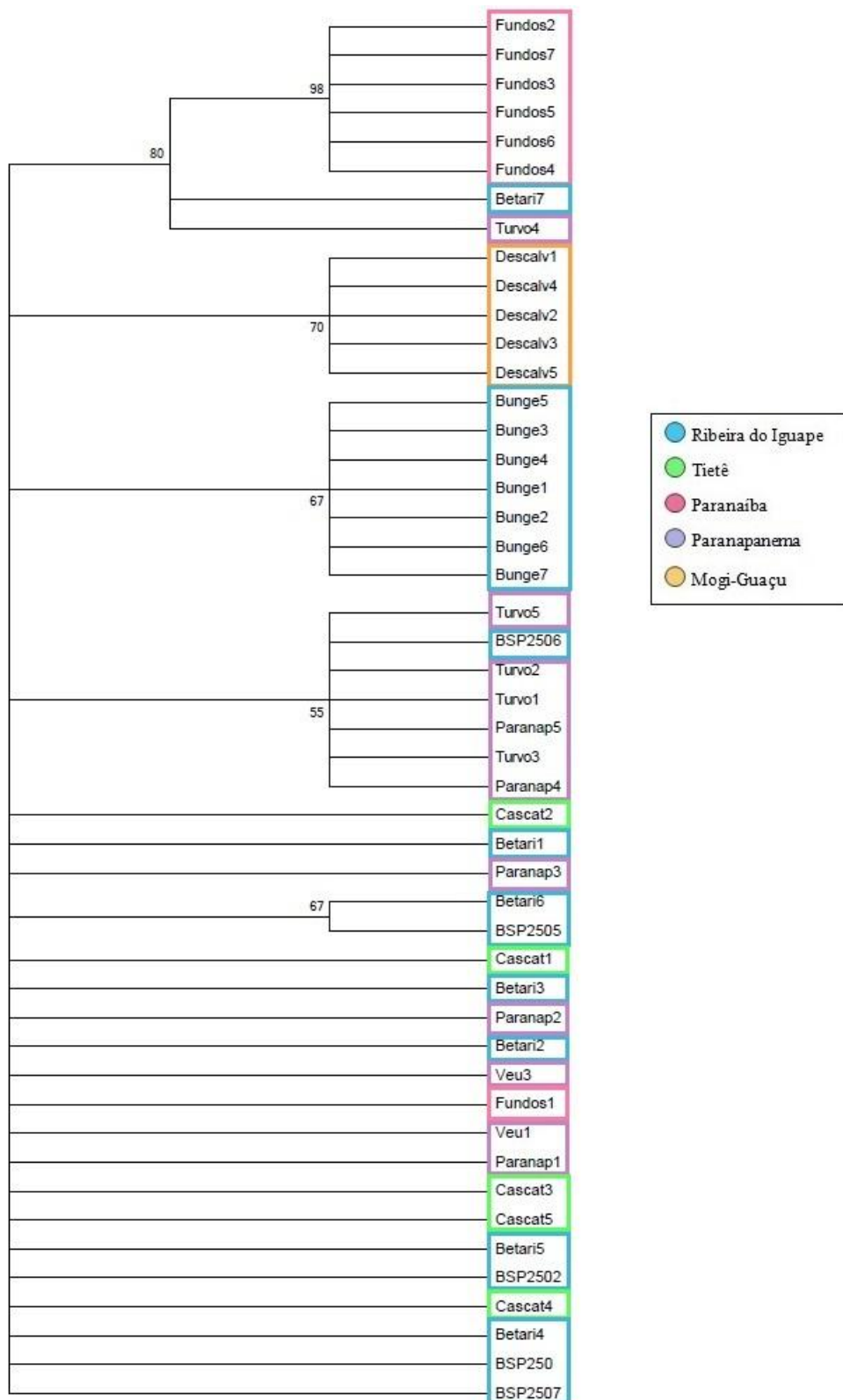
As sequências Betari7 e Turvo4, não ficaram incluídas em nenhum grupo específico, estando inclusive separadas do restante das sequências de igual procedência. Por estarem isoladas, não foram incluídas nas análises de Distâncias Genéticas.

O grupo A, com a maior quantidade de sequências, apresentou-se como uma politomia em ambas as árvores filogenéticas. Na árvore de Máxima Parcimônia os grupos foram organizados em uma ordem diferente, estando o grupo A, por exemplo, representado por último. Mas é fácil observar que os grupos permaneceram divididos de maneira igual.

**Figura 17** - Árvore filogenética de Neighbour-Joining, gerada pelo programa MEGA 6.06, para os genes ATPase 6/8. Cada sequência foi renomeada a partir de seu rio de procedência, com destaque em cor para as respectivas sub-bacias.



**Figura 18** - Árvore filogenética de Maximum-Parcimony, gerada pelo programa MEGA 6.06, para os genes ATPase 6/8. Assim como para a árvore de Neighbour-Joining, cada sequência foi renomeada a partir de seu rio de procedência, com destaque em cor para as respectivas sub-bacias.



As distâncias genéticas médias dentro de cada um dos grupos e entre os sete grupos também geradas pelo programa MEGA podem ser visualizadas nas tabelas 3 e 4 abaixo.

**Tabela 3** - Valores de distância média (%) dentro de cada um dos grupos.

	<b>d</b> <b>(%)</b>
<b>Grupo A</b>	1.7
<b>Grupo B</b>	0.0
<b>Grupo C</b>	0.0
<b>Grupo D</b>	4.9
<b>Grupo E</b>	5.6

**Tabela 4** - Valores de distância média (%) entre os cinco grupos (Distance Between Groups).

	<b>1.</b>	<b>2.</b>	<b>3.</b>	<b>4.</b>	<b>5.</b>
<b>1. Grupo A</b>	-	-	-	-	-
<b>2. Grupo B</b>	4.1	-	-	-	-
<b>3. Grupo C</b>	4.1	3.3	-	-	-
<b>4. Grupo D</b>	4.6	7.0	7.0	-	-
<b>5. Grupo E</b>	1.7	1.7	1.7	1.7	-

Para quesito comparativo em relação ao lote 134, que apresentou amplificação com bandas mais altas do que o restante e resultados de BLAST diferenciados, foi feita uma análise de Distância Média entre Grupos, utilizando um grupo A, com todas as sequências do Córrego dos Fundos, correspondente ao lote 134, e um grupo B, com o restante das sequências (Tabela 5). O alto valor de distância genética entre o grupo com as amostras do

Córrego dos Fundos e grupo com o restante das populações analisadas confirma a discrepância do tamanho do gene ATPase para os indivíduos desta localidade.

**Tabela 5** - Valores de distância média (%) entre os grupos A, com as sete sequências provenientes do Córrego dos Fundos, lote 134, e B, com o restante, para análise de distância entre as sequências provenientes do lote diferenciado.

	1	2
<b>1. Grupo A</b>	-	-
<b>2. Grupo B</b>	7,9	-

#### 4.4.2. COI

No programa MEGA 6.06 foram analisados os pares de base conservados, variáveis, sítios informativos de análise de máxima parcimônia (Tabela 6) e as composições nucleotídicas (Tabela 7).

**Tabela 6** - Quantidade de pares de base conservados, variáveis e de máxima parcimônia de 21 sequências de Citocromo Oxidase I a partir dos resultados gerados pelo programa MEGA 6.06.

Pares de base conservados	602/683
Pares de base variáveis	73/683
Sítios informativos de análise de máxima parcimônia	57/683

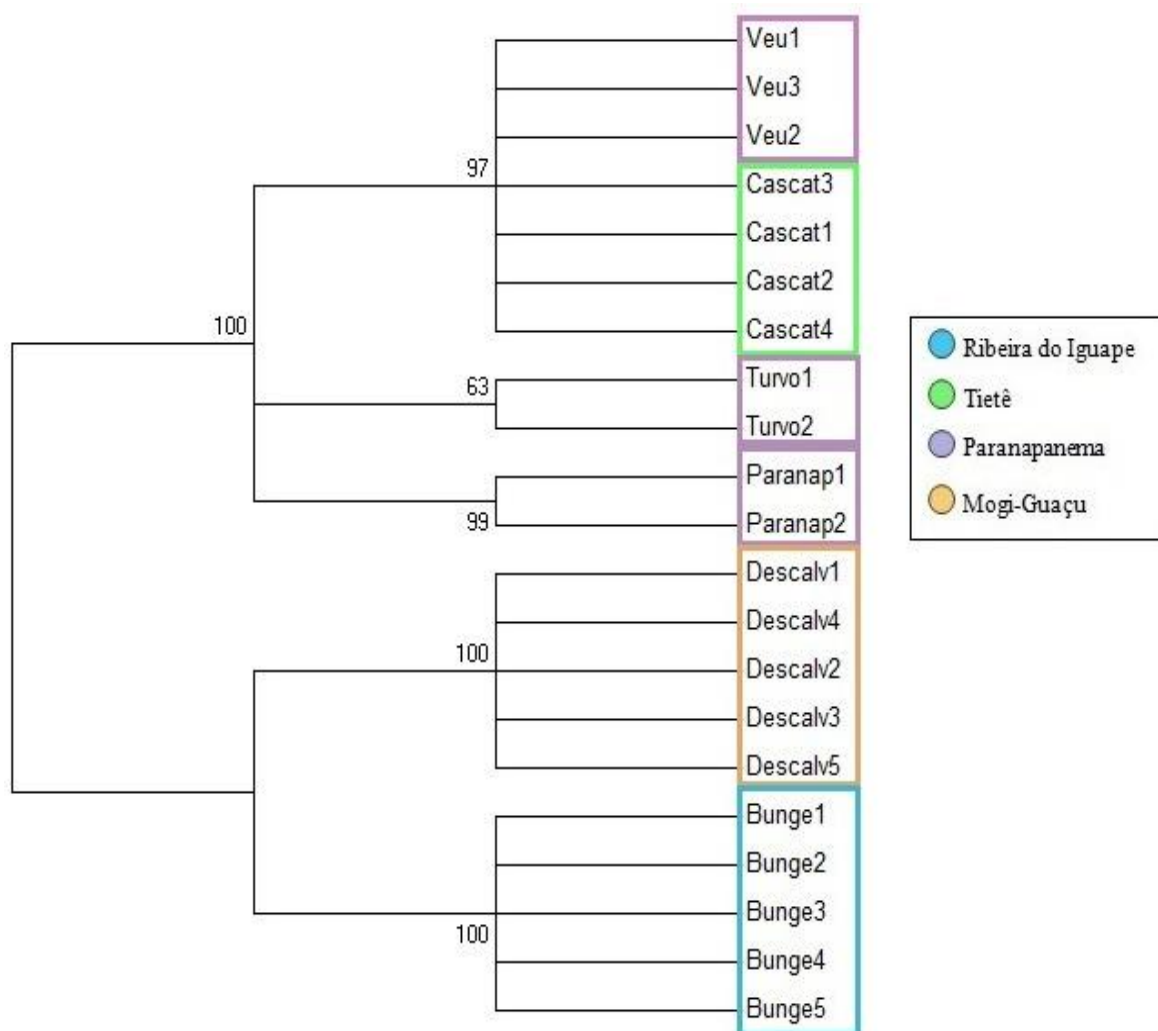
**Tabela 7** - Valores de composição nucleotídica média das sequências de COI analisadas.

<b>Nucleotídeos</b>	<b>Quantidade (%)</b>
T (U)	28,0
C	30,7
A	23,8
G	17,4

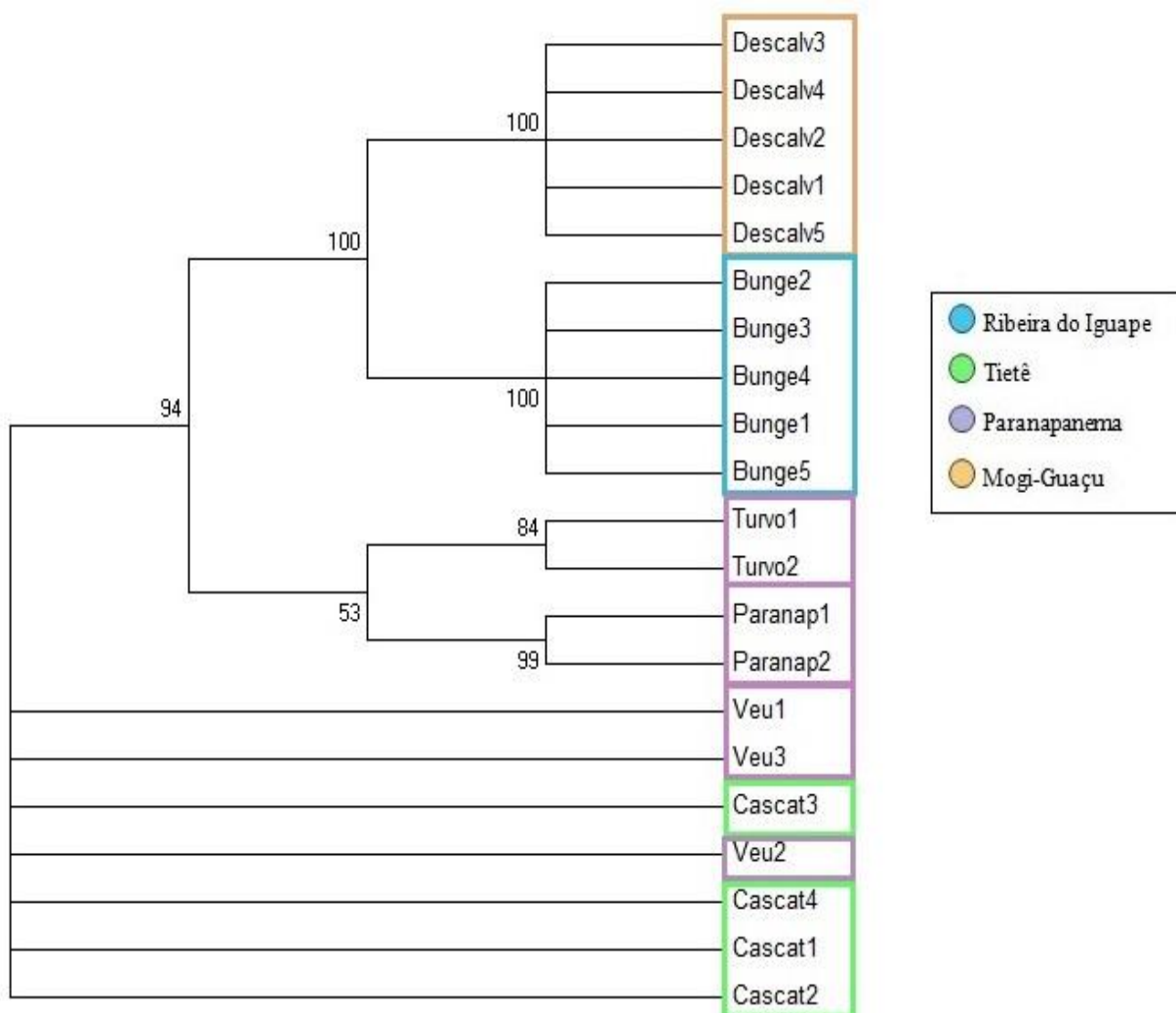
Foram também geradas árvores filogenéticas de Neighbour-Joining (Figura 19) e Máxima Parcimônia (Figura 20) nas quais fica evidenciada a divisão em 4 grupos distintos:

- **Grupo A'**: 3 amostras de Véu da Noiva e 4 do Córrego Cascatinha;
- **Grupo B'**: 2 amostras de Ribeirão do Turvo e 2 de Paranapanema;
- **Grupo C'**: 5 amostras de Descalvado-Pirassununga;
- **Grupo D'**: 5 amostras de Jacupiranguinha (Bunge).

**Figura 19** - Árvore filogenética de Neighbour-Joining, gerada pelo programa MEGA 6.06, para o gene COI. Cada sequência foi renomeada a partir de seu rio de procedência, com destaque em cor para as respectivas sub-bacias.



**Figura 20** - Árvore filogenética de Maximum-Parcimony, gerada pelo programa MEGA 6.06, para o gene COI. Assim como para a árvore de Neighbour-Joining, cada sequência foi renomeada a partir de seu rio de procedência, com destaque em cor para as respectivas sub-bacias.



As distâncias genéticas médias dentro de cada um dos grupos e entre os sete grupos também geradas pelo programa MEGA 6.06 podem ser visualizadas nas tabelas 8 e 9.

**Tabela 8** - Valores de distância média (%) dentro de cada um dos grupos divididos para o gene COI. “d” = distância.

	d (%)
<b>Grupo A'</b>	0.0
<b>Grupo B'</b>	0.0
<b>Grupo C'</b>	0.9
<b>Grupo D'</b>	0.0

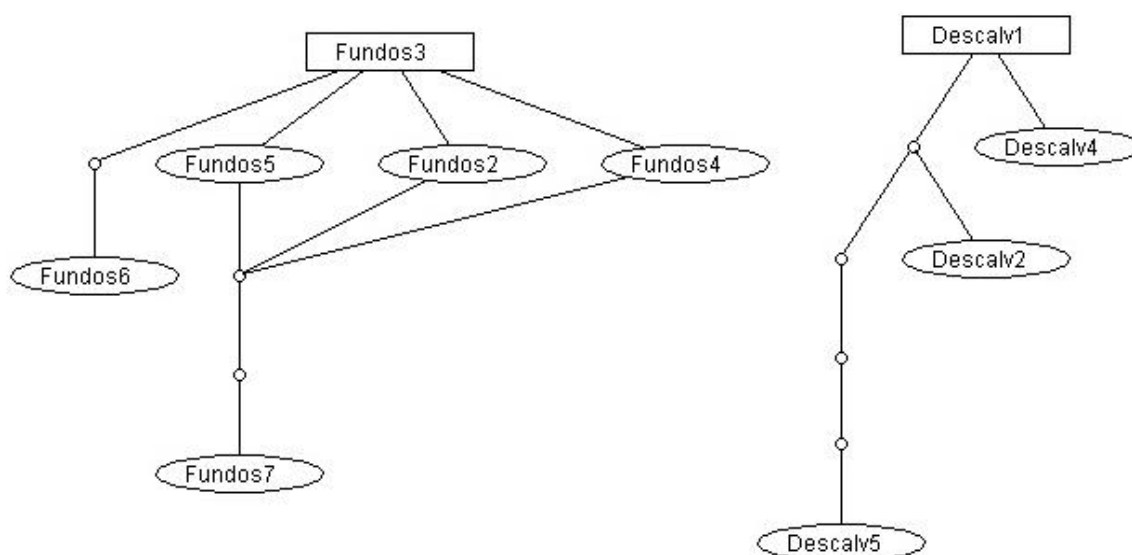
**Tabela 9** - Valores de distância média (%) entre os sete grupos (Distance Between Groups).

	1.	2.	3.	4.
<b>1. Grupo A'</b>	-	-	-	-
<b>2. Grupo B'</b>	1.2	-	-	-
<b>3. Grupo C'</b>	6.4	6.6	-	-
<b>4. Grupo D'</b>	6.6	3.8	6.5	-

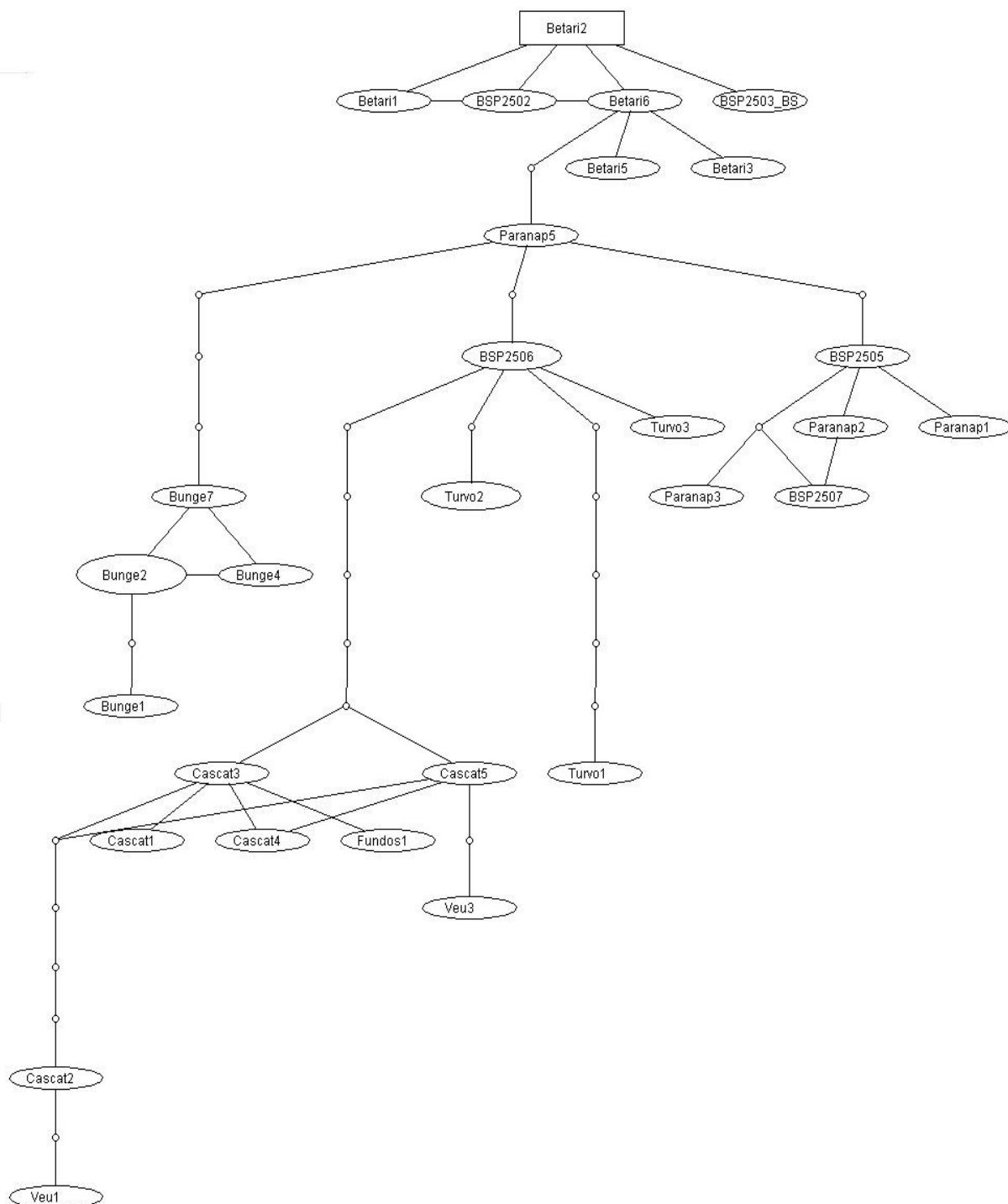
#### 4.5 Análise filogeográfica

A identificação da rede de haplótipos, para avaliar a associação entre haplótipos e a distribuição geográfica, foi feita a partir do software TCS Package v. 1.21 para os genes mitocondriais ATPase 6/8. Foi possível observar a distribuição em três grupos distintos, cada qual agrupando suas respectivas sub-bacias. Algumas sequências ficaram separadas do restante, não estando agrupadas, como Descalvado3, Turvo4 e Betari7. O restante dos indivíduos das mesmas localidades destas sequências foi devidamente agrupado. Porém, pela rede de haplótipos (Figuras 21a e 21b) é possível ver a divisão nos grupos distintos, um agrupando as sequências de procedência Córrego dos Fundos (lote 134, que apresentou os genes ATPase 6/8 amplificado por inteiro); um segundo grupo com as sequências de Descalvado-Pirassununga; e o último grupo juntando todas as sequências restantes.

**Figura 21a** - Rede de haplótipos gerada pela ferramenta TCS Package v. 1.21 para os genes ATPase 6/8, na qual é possível observar dois dos três grupos distintos.



**Figura 21b** - Rede de haplótipos gerada pela ferramenta TCS Package v. 1.21 para os genes ATPase 6/8, na qual é possível observar o terceiro e último grupo.



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Aspectos dos genes ATPase 6/8 nos indivíduos analisados

Foram obtidas sequências dos genes ATPase 6/8 de tamanho variando entre 350 a 550pb, o que difere do encontrado na literatura para a maioria das espécies já estudadas, que é de 850pb. Porém, para um lote em especial, de procedência do Córrego dos Fundos (Sub-bacia Paranaíba), o tamanho das bandas obtidas de ATPase é visivelmente diferente quando comparada à do restante dos lotes e de tamanho semelhante ao descrito para o gene. O resultado da análise pela ferramenta BLAST para as amostras deste lote diferenciado demonstrou alta similaridade com a espécie *Poecilia reticulata* (Figura 12), da mesma família de *Phalloceros reisi*. Para o restante das populações houve similaridade com os genes de ATPase de outras espécies confirmando de que se tratava do gene em questão, apesar de não ter ocorrido alta similaridade com espécies próximas como no caso da população de Córrego dos Fundos.

Partindo desta diferença, foi feita uma análise de distância genética (Tabela 5) entre um grupo apenas com as sequências do Córrego dos Fundos e outro grupo englobando todo o restante. O resultado, de 7,9% de distância entre esses dois grupos, evidencia esta diferença dessa população em especial.

As reações de PCR feitas com o *primer* desenhado a partir de uma sequência do Córrego dos Fundos demonstram amplificação exclusiva das amostras provenientes dessa procedência (Figuras 6 e 7), outra evidência do tamanho discrepante dos genes ATPase 6/8 em relação às demais populações.

Esta característica aparente no restante das populações estudadas, com o gene apresentando uma quantidade de pares de base menor do que a esperada, pode ter sido resultado de uma quebra ou inserção de novas bases no gene, fato que impediu a amplificação completa dessa sequência nesta espécie. Seria necessário uma análise do genoma mitocondrial de *Phalloceros reisi* para inferirmos esta condição do ATPase com maior convicção. O fato das amostras de Córrego dos Fundos apresentarem o gene no tamanho esperado é um indício que esta população pode compreender um grupo com sequências do gene diferenciadas do restante das amostras analisadas para a espécie, podendo, inclusive, tratar-se de uma possível nova sub-espécie.

## 5.2 Características filogenéticas e filogeográficas das populações de *Phalloceros reisi* utilizando caracteres dos genes ATPase 6/8

As sequências foram agrupadas em 5 grupos diferentes, evidenciados pelas árvores de Neighbour-Joining e Máxima-Parcimônia: Grupo A, compreendendo 6 amostras de Betari, 5 de Cascatinha, 4 de Betari-SP250, 3 de Paranapanema, 2 de Véu da Noiva, 1 de Córrego dos Fundos; Grupo B com 5 amostras de Descalvado-Pirassununga; Grupo C com 7 amostras de Jacupiranguinha (Bunge); Grupo D com 4 amostras de Ribeirão do Turvo, 2 de Paranapanema e 1 de Betari-SP250; e Grupo E com 6 amostras do Córrego dos Fundos. (Figuras 17, 18, 19 e 20).

As distâncias genéticas entre os grupos apresentaram valores altos, variando de 1,7% até 7,0% (Tabela 4), com alguns indivíduos partilhando de apenas 93% do material genético com o restante, o que seria uma outra evidência de uma possível diferenciação a nível de espécie, e não apenas populacional.

A rede de haplótipos gerada também demonstra uma curiosa separação entre a maioria das sequências, agrupadas na rede maior (Figura 25b), de dois grupos distintos (Figura 25a), estes apresentando indivíduos do Córrego dos Fundos, o lote que obteve ATPase amplificado por completo, e indivíduos provenientes de Descalvado-Pirassununga.

Estas análises demonstram a necessidade de mais estudos taxonômicos e moleculares referentes às populações de *Phalloceros reisi*, uma vez que um importante gene mitocondrial levantou diversas diferenças entre os vários indivíduos analisados. Assim, pode-se tratar de uma alteração na sequência do gene para esta espécie, resultando possivelmente em um pseudogene ou podendo até estar compreendendo mais de uma espécie em questão.

## 5.3 Características filogenéticas das populações de *Phalloceros reisi* utilizando caracteres do gene COI

Para o gene mitocondrial COI, as árvores filogenéticas geradas (Figuras 21, 22, 23 e 24) demonstram a divisão em quatro grupos distintos: Grupo A1, compreendendo 3 amostras de Véu da Noiva e 4 de Córrego Cascatinha; Grupo B1, com 2 de Ribeirão Turvo e 2 de Paranapanema; Grupo C', com 5 de Descalvado-Pirassununga; e Grupo D', com 5 amostras de Jacupiranguinha.

As distâncias genéticas entre os grupos apresentaram valores altos, de 1,2% até 6,6% (Tabela 9), evidenciando, também para este gene, diferenças entre as sequências analisadas.

O gene COI é considerado uma importante ferramenta de discriminação molecular, inclusive um dos principais genes utilizados no método de DNA barcoding (Hebert et. al, 2003). Tendo sido utilizado nas análises de populações de *P. reisi*, e com os resultados obtidos dos grupos discrepantes, o gene permite inferir que se trata de espécies ou sub-espécies diferentes.

## 6 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que há a possibilidade de estruturação genética para as populações estudadas de *Phalloceros reisi*, bem como compartilhamento de haplótipos. Pelo fato das outras espécies do gênero *Phalloceros* serem muito semelhantes morfológicamente entre si, não é descartada a possibilidade de se tratar de espécies ou sub-espécies diferentes.

No caso do tamanho dos genes ATPase 6/8 para quase todas as populações estudadas, este tendo aproximadamente 450 pares de base quando o tamanho descrito do gene é quase o dobro, pode-se tratar de uma característica da espécie. A aparição de um lote em especial com o gene amplificado por inteiro, no entanto, tornou este um apontamento ainda mais curioso. A análise do genoma mitocondrial por inteiro dessa espécie deve trazer mais respostas sobre essa situação.

Com as análises do gene COI, também ocorreu a separação das sequências em grupos distintos e com distâncias genéticas de valores altos, resultados condizentes com aqueles gerados nas análises com ambos os genes de ATPase, 6 e 8, e reforçando a probabilidade das populações estudadas possuírem indivíduos pertencentes a outra espécie.

Como resultado do presente trabalho, é possível observar que a utilização de técnicas moleculares e aplicação de análises de genes mitocondriais podem ser ferramentas muito úteis para estudos de populações, e fornecer dados importantes para a caracterização e compreensão da estrutura populacional da espécie e das localidades em estudo.

## REFERÊNCIAS

- AB'SÁBER, A. N.. Megageomorfologia do território brasileiro. **Geomorfologia do Brasil (SB Cunha & AJT Guerra, eds.)**. Bertand Brasil, Rio de Janeiro, p. 71-106, 1998.
- 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.
- AVISE, J.C. **Phylogeography: the history and formation of species**. Harvard University Press, London, 2000.
- 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**. 2 ed. Massachusetts: Sinauer Associates, p. 541, 2004.
- 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.
- BILLINGTON, N.; HEBERT, P. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v.1, p. 80-94, 1991.
- BOHLKE, J. E. ; WEITZMAN, S. H. & MENEZES, N. A. ( 1978). Estado atual da sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. **Acta Amazônica** 8 (4): 657-677.
- BORBA, R. S. de et al. Phylogeography of *Hypostomus strigaticeps* (Siluriformes: Loricariidae) inferred by mitochondrial DNA reveals its distribution in the upper Paraná River basin. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 1, p. 111-116, 2013.
- BRITSKI, H. A.; SILIMON, K. Z. S.; LOPES, B. S. Peixes do Pantanal: Manual de identificação. 2º Ed., **EMBRAPA Informação Tecnológica, Brasília, DF**, 2007.
- 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.
- 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.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F.; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINE, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; MELO, A.L.A.; ABREU, T.X.; BOCKMANN, F.A.,

CARVALHO, M.; GIBRAN, F.Z. e LIMA, F.C.T.. Estrutura e composição da ictiofauna de riachos do Rio Paranapanema, sudeste e sul do Brasil. **Biota Neotropica**, v.3, n.1, 2003.

CHOW, S.; USHIAMA, H. Global population structure of albacore (*Thunnus alalunga*) inferred by RFLP analysis of the mitochondrial ATPase gene. **Marine Biology**, v. 123, n. 1, p. 39-45, 1995.

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.

ESCHMEYER, W. N. & FONG, J. D. **Species by Family/Subfamily**. (<http://research.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Versão eletrônica acessada em 16 de Março de 2013.

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 Phylogenetic and Evolution**, v. 27, p. 81-92, 2003.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

GYLLENSTEN, U. The genetic structure of fish: differences in the intraspecific distribution of biochemical genetic variation between marine, anadromous, and freshwater species. **Journal of Fish Biology**, v. 26, n. 6, p. 691-699, 1985.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological identifications through DNA barcodes. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HEBERT, P. D. N.; RATNASINGHAM, S.; DE WAARD, J. R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. Suppl 1, p. S96-S99, 2003.

HEWITT, G.M. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 3, p. 537-549, 2001.

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**, v. 16, p. 2115-2136, 2007.

KALINOWSKI, S.T. Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. **Conservation Genetics**, in press, 2004.

KNOPPERS, B. et al. Zona costeira e plataforma continental do Brasil. **Biologia Marinha. Rio de Janeiro: Editora Interciência**, p. 353-361, 2002.

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

LEVÊQUE, C. et al. Global diversity of fish (Pisces) in freshwater. In: **Freshwater Animal Diversity Assessment**. Springer Netherlands, 2008. p. 545-567.

LEWIN, B. **Genes V**. Oxford University Press Inc., New York, p. 1272, 1994.

LOVEJOY, N. R. e De-ARAÚJO, M.L.G. Molecular systematic, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 3, p. 259-268, 2000.

LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais**. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, p.534, 1999.

LUCINDA, P. H. F. **Family Poeciliidae**. Pp. 555-581. In: Reis, R. E., S. O. Kullander & C. J. Ferraris Jr. (Eds.). *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Edipucrs, 729p. 2003.

LUCINDA, P. H. F. **Systematics and biogeography of the genus *Phalloceros* Eigenmann, 1907 (Cyprinodontiformes: Poeciliidae: Poeciliinae)**, with the description of twenty-one new species. *Neotropical Ichthyology*, 6: 113-158. 2003.

LUNDBERG, J. G.; MARSHALL, L. G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, MCSL. e WESSELINGH, F. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. In MALABARBA, L.R., REIS, R.E.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S. e LUCENA, C.A.S. (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: EDIPUCRS, 1998.

MARTÍNEZ-ORTEGA, M. M.; LUIS, D.; ALBACH, D. C.; ELENA-ROSSELLO, J. A. e RICO, E. Species boundaries and phylogeographic patterns in cryptic taxa inferred from AFLP markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the Western Mediterranean. **Systematic Botanic**, v. 29, n. 4, p. 965-986, 2004.

NELSON, J. S. **Fishes of the world**. 3rd edition, John Wiley & Sons., Inc., New York, USA, 1994.

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

PARENTI, L. R. **A phylogenetic and biogeographic analysis of cyprinodontiform fishes (Teleostei, Atherinomorpha)**. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. 1981.

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

PAXTON, J. R.; ESCHMEYER, W. N. **Encyclopedia of fishes**. Academic Press, San Diego, 1995.

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.

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.

PIORSKI, N. M.; SANCHES, A.; CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; CARRILLO-AVILA, M.; FREITAS, P.D. e GALETTI JR., P.M. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**. v. 68, n. 4, p. 1039-1050, 2008.

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.

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.

REGAN, C. T. Descriptions of new loricariid fishes from South America. **Proceedings of the Zoological Society of London**, v.4, p. 795-800, p. 47-49, 1908.

REIS, R. E.; KULLANDER, S. O. e FERRARIS, C. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America** (CLOFFSCA), Porto Alegre, EDIPUCRS, p. 729, 2003.

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.

SANTOS, G. M.; MÉRONA, B.; JURAS, A. A.; JÉGU, M. Peixes do baixo rio Tocantins: 20 anos depois da usina hidrelétrica Tucuruí. *Eletronorte*, Brasília, 2004, 216p

SERRA, J. P.; CARVALHO, F. R.; LANGEANI, F. Ichthyofauna of the rio Itatinga in the Parque das Neblinas, Bertioga, São Paulo State: composition and biogeography. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 0-0, 2007.

SCHAEFER, S. A. Conflict and resolution impact of new taxa on phylogenetic studies of Neotropical cascudinhos (Siluriformes: Loricariidae). **Phylogeny and classification of Neotropical fishes**. Edited by Malabarba LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZMS, Lucena CAS. Porto Alegre, Brasil: Edipucrs; 1998.

SCHLOTTERER, C. The evolution of molecular markers – just a matter of fashion? **Nature Reviews Genetics**, v. 5, p. 63-69, 2004.

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 Phylogenetic and Evolution**, v. 33, p. 469-481, 2004.

SULLIVAN, J. P.; LUNDBERG, J. G.; HARDMAN, M. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 41, n. 3, p. 636-662, 2006.

SUNNUCKS, P. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 15, p. 199-203, 2000.

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**, v.117, p. 343-351, 1987.

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.

WARD, R. D.; WOODWARK, M.; SKIBINSKI, D. O. F. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 44, n. 2, p. 213-232, 1994.

WARD, R. D. et al. N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. **Phil. Trans. R. Soc. B**, v. 360, n. 1, p. 847-1, 1847.

WEBER, C. Subfamily Hipostominae (Armored catfishes). In: **Check list of the freshwater fishes of South America**, eds.: REIS, R.E.; KULLANDER, S.O. e FERRARIS JR., C.J. Porto Alegre: Edipucrs, p. 351-372, 2003.

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.

WINEMILLER, Kirk O.; AGOSTINHO, Angelo A.; CARAMASCHI, Érica Pellegrini. Fish ecology in tropical streams. **Tropical stream ecology**, p. 107-146, 2008.