

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

Análise da estrutura genética populacional de duas espécies de Characiformes (*Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior*) na região da bacia do Rio Madeira, Rondônia

JORGE MORI MARIN

Botucatu – SP
Fevereiro/2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(ZOOLOGIA)

JORGE MORI MARIN

**Análise da estrutura genética populacional de duas
espécies de Characiformes (*Pygocentrus nattereri* e
Potamorhina latior) na região da bacia do Rio Madeira,
Rondônia**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
(Zoologia), como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre.

ORIENTADOR: Prof. Dr. CLAUDIO DE OLIVEIRA

Botucatu – SP
Fevereiro/2013

Dedicatória

**A Deus Todo-Poderoso, por
muitas coisas nesta vida.
Aos meus pais, Jorge e
Rosa Isabel, e meus irmãos
Levis e Greace, que sempre
me apoiaram, incentivaram
e me acompanharam em
cada passo e em cada
escolha.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências de Botucatu e ao Laboratório de Biologia e Genética de Peixes por proporcionarem toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudo concedida e à Santo Antônio Energia S/A pelo financiamento do projeto.

À Dra. Carolina R. C. Doria, responsável pelo Laboratório de Ictiologia e Pesca da Universidade Federal de Rondônia, pela disponibilização das amostras analisadas no presente estudo.

Ao alguém muito especial, que me deu a oportunidade de continuar crescendo academicamente. Que confiou em mim e que eu considero muito mais do que meu orientador, meu amigo. Ao professor Dr. Claudio de Oliveira, que com sua amizade, experiência e dedicação conseguiram lograr a meta estabelecida, sempre enfatizando a concorrência para o sucesso de seu orientado. Muito Obrigado!

Ao meu grande amigo Bruno César Rossini, pela sua amizade, sua ajuda e conselhos quanto ao desenvolvimento dessa dissertação e na vida.

Ao meu grande amigo e também companheiro James Raúl García Ayala, pelos conselhos e momentos vividos.

Para as pessoas de bom coração que me ajudaram muito, meus amigos Zeca, Igor Paiva, Lidiane, Heleno Brandão, Raquel Siccha, Ricardo Britzke, Renato Devidé, Leila Momo, Patricia Scudeler, Cristiane Shimabukuro Dias e Cristian Araya.

Ao pessoal do Laboratório de Biología e Genética de Peixes, pela sua amizade e ajuda em cada momento, meus amigos Gleisy, Luciana, Milke, Bruno Melo, Marlon, Renato, Guilherme, Jefferson, Fabio, Yuldi, Fernando, Gabriel, Daniela, Érica, Priscila, Ricardo, Viviani e Maria Ligia.

Para aquelas pessoas especiais que me ofereceram sua amizade e apoio André Nobile, Felipe Lima, Diogo Souza, Mike Corazón e Cristiano.

À Dra. Carmen Rosa García Dávila, chefe do Laboratório de Biología y Genética Molecular do Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana no Peru. Pela sua amizade, apoio, confiança e exemplo de vida.

Aos amigos de sempre no Peru Roberson, Jose Luis, Jacques Romero, Fabiola Lozano, Werner Chota, Diana Castro, Rosa Elias, Claudia Biffi e Antonio.

Para uma pessoa que sempre encontra uma palavra de encorajamento ou conselhos, que me mostrou o que é a perseverança e que é o primeiro passo para conseguir muito nesta vida. Ela, minha melhor amiga, parceira no sentimento que une duas pessoas, com todo o meu amor, para você Karin Vanessa.

RESUMO

A ordem Characiformes reúne aproximadamente 1.670 espécies de água doce, das quais pelo menos 1.300 ocorrem no Brasil. Até o momento relativamente poucos estudos genéticos foram realizados com espécies desse grupo, particularmente na Amazônia. Uma questão importante para o momento atual é saber se há algum isolamento entre populações locais separadas por corredeiras ou rápidos na Amazônia, dado o potencial hidrelétrico estimado para esses ambientes. Nesse sentido, no presente estudo, conduzido no âmbito do Programa de Conservação da Ictiofauna da Santo Antônio Energia, foram avaliadas duas populações locais de duas espécies: *Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior*. Empregamos sequências da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial, pela maior taxa de mutação que esse gene apresenta em relação aos demais genes. As amostras foram tomadas a montante e a jusante da antiga cachoeira de Teotônio visando testar a hipótese de que essa cachoeira servia de barreira para essas espécies. Foram analisados 54 espécimes de *P. nattereri* (25 montante e 29 jusante) e 45 de *P. latior* (25 montante e 20 jusante). Os resultados mostraram que os espécimes da montante de *P. nattereri* apresentam maior variabilidade genética (haplótipos = 5, $Hd = 0,607$, $\pi = 0,00105$) que os da jusante (haplótipos = 2, $Hd = 0,379$, $\pi = 0,00046$). No caso de *P. latior*, esses valores foram similares tanto a montante (haplótipos = 23, $Hd = 0,993$, $\pi = 0,01232$) como a jusante (haplótipos = 17, $Hd = 0,984$, $\pi = 0,01865$). Ambas as espécies apresentaram haplótipos compartilhados nas duas localidades. A divergência genética entre as localidades de *P. nattereri* (0,1%) foi menor que em *P. latior* (1,9%). A análise de variância molecular revelou diferenças significativas entre as localidades de *P. nattereri* ($\Phi_{st} = 0,11448$, $P = 0,018$) e *P. latior* ($\Phi_{st} = 0,16408$, $P = 0,000$). Os resultados sugerem que entre as duas localidades amostradas existia uma possível estruturação populacional tanto pelas diferenças na variabilidade genética quanto na diferenciação alélica. Assim, a cachoeira Teotônio representava uma barreira, ainda que parcial, para a troca de material genético entre as populações locais das espécies investigadas, o que não foi observado em estudos similares realizados com espécies de grandes bagres.

ABSTRACT

The order Characiformes gathers approximately 1,670 freshwater species, of which at least 1,300 occur in Brazil. To date relatively few genetic studies have been conducted with species of this group, particularly in the Amazon. An important question for the moment is whether there is some isolation between local populations separated by rapids or fast in the Amazon, given the hydroelectric potential estimated for these environments. Accordingly, in this study, conducted under the Conservation Program Ichthyofauna of Santo Antônio Energia, were evaluated two local populations of two species: *Pygocentrus nattereri* and *Potamorhina latior*. We employ sequences of the control region (D-loop) of the mitochondrial DNA, the higher rate of this gene mutation present in relation to other genes. The samples were taken upstream and downstream of the old waterfall Teotônio to test the hypothesis that this waterfall served as a barrier for these species. Were examined 54 specimens of *P. nattereri* (25 upstream and 29 downstream) and 45 of *P. latior* (25 upstream and 20 downstream). The results showed that the amount of specimens of *P. nattereri* have greater genetic variability (Haplotypes = 5, Hd = 0.607, π = 0.00105) than the downstream (Haplotypes = 2, Hd = 0.0379, π = 0.00046). In the case of *P. latior*, these values were similar both upstream (Haplotypes = 23, Hd = 0.993, π = 0.01232) and downstream (Haplotypes = 17, Hd = 0.984, π = 0.01865). Both species have shared haplotypes in the two localities. The genetic divergence between the localities of *P. nattereri* (0.1%) was lower than in *P. latior* (1.9%). The analysis of molecular variance revealed significant differences between the localities of *P. nattereri* (Φ_{st} = 0.11448, P = 0.018) and *P. latior* (Φ_{st} = 0.16408, P = 0.000). The results suggest that a possible population structure existed between the two localities sampled both by differences in genetic variability as well as by allelic differentiation. Thus, the Teotônio waterfall represented a barrier, although partial, for genetic material exchange between local populations of the species investigated, which was not observed in similar studies with species of large catfish.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	7
2.1 OBJETIVO GERAL.....	7
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	7
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	8
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS, EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA.....	8
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO.....	8
3.3 AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CONTROLE DO DNA MITOCONDRIAL.....	9
3.4 LIMPEZA DO PCR DE SEQUENCIAMENTO.....	10
3.5 SEQUENCIAMENTO DAS AMOSTRAS.....	9
3.6 OBTENÇÃO DE SEQUÊNCIAS CONSENSO.....	11
3.7 ALINHAMENTO DAS SEQUÊNCIAS E ANÁLISE DOS DADOS..	11
4. RESULTADOS.....	13
4.1 POLIMORFISMO DE DNA.....	13
4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS.....	15
4.3 TESTE DE HOMOGENEIDADE GENÉTICA.....	19
4.4 DISTÂNCIA GENÉTICA.....	21
5. DISCUSSÃO.....	23
6. CONCLUSÕES	26
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia ocupa uma área de 6.112.000 Km² e inclui os países: Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana, Peru, Bolívia e Brasil; compreendendo cerca de um terço de toda a América do Sul, na qual abriga a maior bacia hidrográfica do mundo com a maior diversidade de espécies de peixes de água doce (Barthem & Goulding, 1997).

Neste vasto território, os recursos hídricos em especial os peixes são de grande importância. Tanto para fornecer alimento como fonte de proteína, quanto renda para os moradores. Sustentando uma captura anual de milhares de toneladas de pescado para a alimentação, além de muitas espécies de peixes ornamentais que são comercializadas nos mercados da Ásia, Europa e América do Norte (Renno *et al.*, 2005).

O mau uso dos recursos hídricos tem produzido um grande impacto sobre as comunidades de peixes, devido à sobrepesca, o uso inadequado do solo na agricultura, o descarte de esgoto sem tratamento prévio nos rios, a construção de hidrovias, a introdução de espécies exóticas e a construção de barragens. Neste último caso, o Brasil apresentou um forte crescimento populacional, sendo necessário criar novas alternativas para suprir a demanda energética (Arelovich *et al.*, 2008).

Uma represa, em um curso de água ocasiona normalmente a formação de um reservatório, gerando um grande problema para a vida aquática pela transformação de um ambiente lótico em lântico. Trazendo como consequências alterações físicas e químicas da água, variação térmica, perda de nutrientes no rio abaixo, afetando diretamente a rota migratória dos peixes, podendo levar a fragmentação das populações (Muller, 1995). Esses eventos podem levar a perda da diversidade genética nas espécies, reduzindo sua capacidade de adaptação às mudanças ambientais, o potencial evolutivo e o sucesso reprodutivo (Carvalho, 1993; Kalinowski, 2004; Frankham *et al.*, 2008).

Mas, não só as barragens são um grande problema para as espécies de peixes, principalmente migratórias. O grau de conectividade na distribuição das espécies de peixes, também é influenciado pelas barreiras naturais como cascatas e cachoeiras (Rahel, 2007). A maioria dos grandes rios da bacia amazônica não apresentam grandes obstáculos físicos que impedem a circulação de animais aquáticos. Uma exceção importante é a presença de uma série de 16 cachoeiras (ou rápidos) ao longo de um trecho de 360 km entre Porto Velho, Guajará Mirim e Riberalta no rio Madeira, separando a sub-bacia boliviana que abrange a parte superior de drenagem com a bacia principal do rio Amazonas (Goulding *et al.*, 2003). A área de influência (1,4 milhões de

km²) representa pouco mais de 20% da bacia do rio Amazonas. O rio Madeira é responsável por 50% do sedimento total transportado pelo Amazonas, e 15-16% da vazão total anual, por isso é definitivamente o mais importante afluente do Amazonas (Farias *et al.*, 2010). Compreender o papel que desempenham as cachoeiras no Rio Madeira, na conectividade genética entre os organismos aquáticos das bacias bolivianas e do Amazonas, é essencial para a compreensão da sua dinâmica evolutiva e que moldam os padrões de distribuição da diversidade genética nas grandes bacias do rio Amazonas.

Estas cachoeiras são conhecidas por formar uma barreira para a distribuição de certas espécies de peixes e vertebrados aquáticos (Goulding, 1979). Como *Potamorrhaphis eigenmanni* (Lovejoy e Collette, 2001), a tartaruga *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.*, 2006). Também diferenças significativas na composição de espécies de peixes da montante e jusante da cachoeira Teotônio (Torrente-Vilara *et al.*, 2011) e em populações de *Colossoma macropomum* (Farias *et al.*, 2010). No entanto, para algumas espécies de bagre do gênero *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma*, e caracídeos como do gênero *Prochilodus*, estas cachoeiras, aparentemente não representam uma barreira para as migrações reprodutivas (Goulding, 1979).

Dentro de todo este vasto território da Amazônia e essa ampla variedade de espécies de peixes. A ordem Characiformes é grande e diversificada com muitos gêneros e espécies de muita importância econômica e ecológica, sendo encontrados somente na América Central, América do Sul e África. Eles pertencem a superordem Ostariophysi, grupo principalmente distinguido pela presença do aparelho de Weber (que transmite as ondas sonoras recebidas pela bexiga natatória ao ouvido interno, onde são convertidos em impulsos elétricos enviados para o cérebro). As diferenças mais notáveis são a presença de uma nadadeira adiposa entre a nadadeira dorsal e caudal, e a presença de dentes na boca, embora haja exceções para ambas às peculiaridades. Os bigodes estão ausentes e o corpo é coberto de escamas bem definidas (Menezes *et al.*, 2007). Dentro das espécies de Characiformes existem muitos com padrões de migração, tanto para alimentação como para reprodução. Entre estes podemos citar duas espécies (*Potamorhina latior* e *Pygocentrus nattereri*) com padrões de migração reprodutiva e de grande importância econômica, presentes tanto na sub-bacia boliviana como na bacia principal do Amazonas.

Potamorhina latior (Figura 1), tem porte médio, até 30 cm; corpo relativamente alongado; região pré-pélvica com uma quilha mediana que se estende até a porção pós-pélvica, porém sem serras; linha lateral com 90 a 120 escamas; coloração uniformemente cinza, ligeiramente mais escura no dorso e clara no ventre. Esta espécie é detritívora, consome matéria orgânica floculada, algas, detritos e microorganismos associados. Empreende migrações reprodutivas e desova no início da enchente, ocorrendo comumente em lagos de água branca. É a segunda espécie mais importante entre as branquinhas, sendo importante na alimentação e renda (Galvis *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).



Figura 1. *Potamorhina latior* (Characiformes, Curimatidae).

Pygocentrus nattereri (Figura 2), tem porte médio, até 25 cm; corpo romboidal e largo. Olho pequeno, contido cerca de 6 vezes no comprimento da cabeça; fontanela estreita e longa, alcançando o nível médio do olho; um espinho na base anterior das nadadeiras dorsal e anal; ausência de dentes no palato; coloração cinza-arroxeadado e iridescente; queixo e ventre normalmente alaranjados; dorso cinza-azulado; nadadeira caudal curta e acinzentada. Consome peixes, dos quais são arrancados pedaços; desova parcelada, no início da enchente; tamanho médio da primeira maturação sexual em torno de 13 cm nos machos e 15 cm nas fêmeas; ovos aderentes, depositados sobre plantas submersas e cuidados por um ou ambos os pais; ocorre apenas em rios de água branca e é típica de ambientes lânticos. De grande importância também na alimentação e renda nos mercados populares (Galvis *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006).



Figura 2. *Pygocentrus nattereri* (Characiformes, Serrasalminidae).

É necessária a conscientização sobre a necessidade de conservação da diversidade biológica, porque o futuro das populações selvagens depende grandemente da variação genética das populações naturais (Ryman, 1991; Avise & Hamrick, 1996). O estudo dessa variação é fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável, gerando benefícios para as espécies e os povos que vivem da pesca.

Além disso, as pesquisas em genética de populações podem elucidar várias questões relativas à estruturação de populações selvagens ou cultivadas de diversas espécies, tais como origem, sucesso reprodutivo, taxas de divergências genéticas, migração, tamanhos da população, seleção natural e eventos históricos (Sunnucks, 2000). Com a interrupção da livre migração de peixes através das barragens ou barreiras naturais, a diversidade genética e as frequências alélicas de populações migratórias podem sofrer alterações (Hatanaka & Galetti Jr., 2003).

Os mecanismos para o isolamento das populações incluem separação geográfica, capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e comportamento de *homing* ou filopatria (tendência de retornar ao local de nascimento para reprodução). Entender o padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações que é referido como “estrutura genética populacional” de uma espécie (Laikre *et al.*, 2005) é necessário para seu manejo e conservação (Spruell *et al.*, 2003). A identificação desta estrutura e outros parâmetros são possíveis mediante a utilização de técnicas morfológicas (Esguícero e Arcifa, in press) e moleculares (Thuesen *et al.*, 2008). O manejo genético tende a ordenar a exploração, evitando a erosão do *pool* gênico e

garantindo a produção de alimento em face do crescimento populacional humano (Foresti *et al.*, 1992).

As técnicas moleculares utilizam marcadores que podem ser proteínas ou DNA (Picca *et al.*, 2004). Os marcadores de DNA são sequências que atuam como indicadores, sendo teoricamente possível observar e explorar a variação genética das espécies através do DNA ribossomal (DNAr), minissatélites (Avise, 2004; Liu & Cordes, 2004) e as mais utilizadas recentemente, são o sequenciamento de segmentos do DNA mitocondrial (Thuesen *et al.*, 2008) e a técnica de microsatélites (Keeney *et al.*, 2005).

A alta taxa de mutação do DNA mitocondrial (DNAm) (Figura 1), permite que o mesmo seja utilizado para inferir na evolução e relações filogeográficas entre populações ou espécies com tempos de divergência relativamente recentes (Brown *et al.*, 1979; Avise, *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1995; Freeland, 2005).

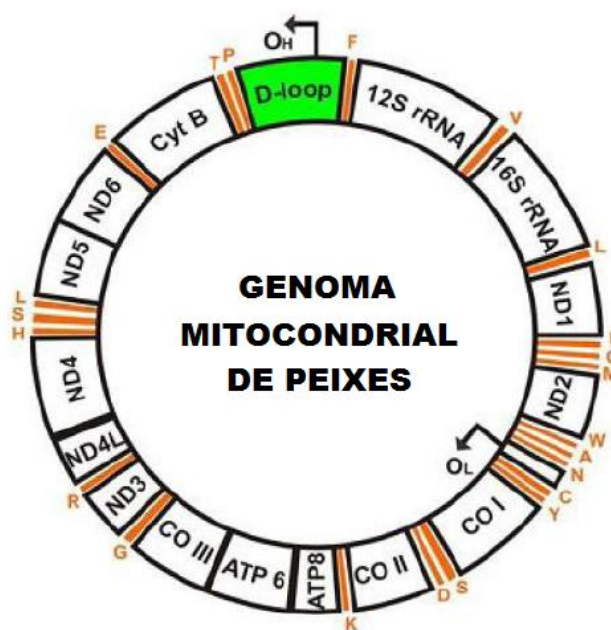


Figura 3. DNA mitocondrial de peixe, com a localização da região controle ou D-Loop (Brown, 2008).

A região controle (*D-loop*) (Figura 3), a região não codificadora do DNAm, encontra-se localizada entre as regiões codificadoras de dois RNAs transportadores. Possui uma maior taxa de substituição de bases em relação às outras regiões do DNAm e do DNA nuclear (Meyer, 1993). Essa região varia muito em comprimento, sendo a principal responsável pela variação do genoma mitocondrial dos vertebrados. Esta extrema variabilidade tem sido amplamente utilizada em estudos populacionais

(Aquadro & Greenberg, 1983; Harrison *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1993), incluindo peixes (Thuesen *et al.*, 2008). Os estudos genéticos em Characiformes são ainda escassos, principalmente na Amazônia.

Entre as pesquisas de espécies neotropicais, Sivasundar *et al.* (2001) estudaram *Prochilodus lineatus* na bacia do Paraná, utilizando a região D-loop do DNAmt, encontraram alta homogeneidade genética entre as populações, ocorrendo haplótipos similares distantes a 2.600 km. Sugerindo um alto fluxo gênico pelo hábito migratório dessa espécie.

Martins *et al.* (2003) estudaram *Leporinus elongatus* na bacia do rio Paraná, através de sequências de D-loop em seis localidades. Identificaram altos níveis de variabilidade intra-populacional e a ocorrência de haplótipos exclusivos, sugerindo diferenciação genética parcial entre as localidades.

Nesse sentido, os estudos de peixes amazônicos são úteis não só para avaliar se as barragens construídas, em construção ou ainda na fase de projetos, causarão problemas de variabilidade e de fluxo genético. Também permitirão um melhor esclarecimento dos padrões de estruturação populacional dos peixes. Estas informações serão úteis no sentido de direcionar estratégias de manejo e conservação para as populações naturais das espécies estudadas, bem como fornecer subsídios para manejo de populações artificiais visando aquicultura com fins de conservação (repovoamento).

2. OBJETIVOS

2.1 Geral: Caracterizar geneticamente (através do sequenciamento da região controle ou D-loop do DNA mitocondrial) duas populações locais de *Potamorhina latior* (branquinha) e *Pygocentrus nattereri* (piranha), visando testar a hipótese de existência de estruturação populacional em função da cachoeira de Teotônio.

2.2 Específicos:

- 1 Coletar amostras pelo menos duas populações locais (entre 20 e 30 exemplares de cada população) de *Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior* no rio Madeira, em pontos acima (montante) e abaixo (jusante) da cachoeira de Teotônio.
- 2 Estimar as frequências de haplótipos das populações locais, pela análise de sequências da região controle do DNA mitocondrial (D-loop).
- 3 Comparar geneticamente as populações locais de cada espécie estudada para checar a existência de estruturação populacional.
- 4 Propor atividades que possam manter a variabilidade genética e o tamanho das populações locais estáveis a despeito de atividades antrópicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

As análises genéticas do presente estudo foram desenvolvidas no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), campus de Botucatu.

3.1 Coleta das amostras, extração e quantificação do DNA

Foram coletadas amostras de tecido muscular das espécies *Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior*. Foram analisados 54 espécimes de *P. nattereri* (25 montante e 29 jusante) e 45 de *P. latior* (25 montante e 20 jusante).

As amostras foram coletadas por pesquisadores ou obtidas diretamente de pescadores artesanais. O tecido muscular foi preservado em etanol 96% e mantido refrigerado até a chegada ao laboratório onde foi mantido em freezer comum. Pelo menos um exemplar de cada população foi depositado na coleção de peixes do Laboratório de Biologia e Genética de Peixes, Instituto de Biociências, UNESP, campus de Botucatu, como testemunho dos tecidos analisados.

3.2 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi extraído utilizando o kit comercial *DNA-Easy extraction kit* (Qiagen Inc.), a partir de amostras de tecido muscular preservados em etanol 96%. Logo o DNA total foi preservado em água ultrapura autoclavada e quantificado por espectrofotometria para ajuste de concentração. O protocolo foi o seguinte:

1. Coloque a amostra em um tubo 1,5 ml e transfira o mesmo a um “banho seco”;
2. Mantenha o material aquecido à 55°C por cerca de 25 minutos até a secagem completa de todo o álcool presente na amostra; com o auxílio de um pequeno bastão plástico (pistão) macere toda a amostra.
3. Adicione 200 µl de Tampão de Extração (Tris HCl pH8.0 10mM + EDTA pH8.0 10mM + NaCl 50mM + SDS 0,5%) à amostra.
4. Macere novamente o tecido com o bastão;
5. Adicione 25 µl de Proteinase K (20 mg/ml) e passe o tubo no vórtex ligeiramente.
6. Coloque o tubo num bloco aquecido a 55°C e deixe por uma noite para a digestão completa do tecido.
7. Após a digestão retire o tubo do bloco e centrifugue a 6.000 rpm por 5 segundos (spin).

8. Adicione 220 µl de Tampão BL e passe no vórtex ligeiramente.
9. Transfira o tubo para um bloco programado a 70°C e deixe por 10 minutos.
10. Centrifugue a 6.000 rpm por 5 segundos (spin).
11. Adicione 220 µl de EtOH 100% e passe no vórtex.
12. Centrifugue a 6.000 rpm por 5 segundos (spin);
13. Transfira o conteúdo do tubo (digestão) para uma coluna acoplada a um tubo coletor, ambos devidamente identificados.
14. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm.
15. Transfira a coluna para um novo tubo coletor e descarte o anterior.
16. Adicione 600 µl de *Wash Buffer* (preparado com EtOH) na coluna.
17. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarte o líquido do tubo coletor e o acople novamente à coluna.
18. Adicione novamente 600 µl de *Wash Buffer* (preparado com EtOH) na coluna.
19. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm. Descarte o líquido do tubo coletor e o acople novamente à coluna.
20. Prepare o *Elution Buffer* aquecendo-o à 70°C.
21. Centrifugue a coluna (vazia) acoplada ao mesmo tubo coletor por 2 minutos a 13.000 rpm, para a secagem completa da coluna.
22. Transfira a coluna para um novo tubo 1,5 ml e descarte o tubo coletor.
23. Adicione à coluna 200 µl de *Elution Buffer* pré-aquecido.
24. Coloque o tubo 1,5 ml com a coluna num bloco a 70°C por 3 minutos.
25. Centrifugue por 1 minuto a 10.000 rpm.
26. Aliquotar o DNA e guardar cerca de 150 µl no freezer (-20°C) para solução estoque e o restante na geladeira (4°C) para a solução de trabalho.

3.3 Amplificação da região controle do DNA mitocondrial

A amplificação do DNA mitocondrial foi feita por reação de PCR com um volume total de 10 µl com 10-100ng de DNA total, 1,5mM MgCl₂, 1X tampão Taq, 200µM dNTPs, 0,5µM de cada *primer* e 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase. Os *primers* que foram utilizados são as seguintes: F-TTF: 5'-GCC TAA GAG CAT CGG TCT TGT AA-3' e F-12R: 5'-GTC AGG ACC ATG CCT TTG TG-3' (Sivasundar *et al.*, 2001). Estes *primers* já foram testados com diversos grupos, incluindo os grandes bagres (Batista e Alves-Gomes, 2006) e outros Characiformes (Farias *et al.*, 2010).

Sendo as condições de temperatura para a amplificação os seguintes é mostrada na figura 4:

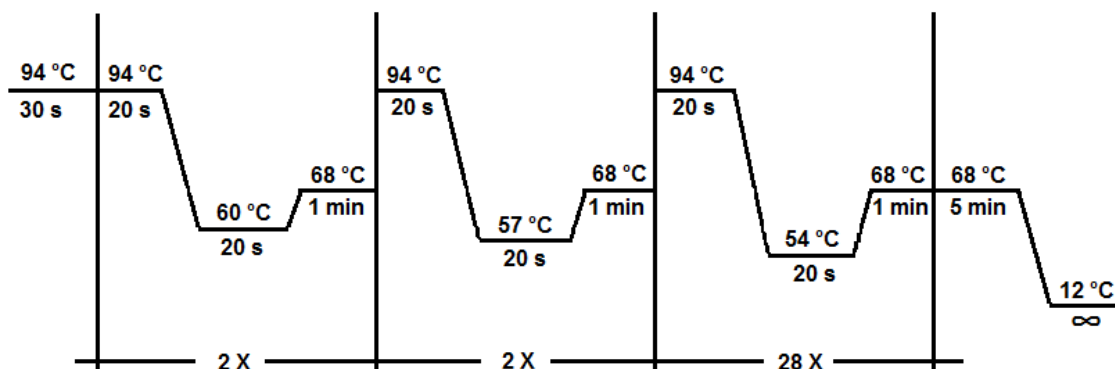


Figura 4. Temperaturas na PCR para amplificar a região controle do DNAm.

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%.

3.4 Limpeza do PCR de Sequenciamento

1. Adiciona-se em cada tubo com os produtos de PCR: 0,7 µl de EDTA (125mM).
2. Adiciona-se em cada tubo: 0,7 µl de Acetato de Sódio (3 M).
3. Homogeneizar e passar no spin brevemente.
4. Adicionar 17,5 µl de Etanol 100%.
5. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Centrifuga-se por 15 min a 13000 rpm à 25°C.
7. Descartar o Etanol em papel toalha.
8. Adiciona-se 24,5 µl de Etanol 70% Gelado.
9. Centrifuga-se por 10':15'' a 13000 rpm à 20°C.
10. Descartar o Etanol em papel toalha.
11. Repetir passo 8 a 10 (lavagem com etanol 70%).
12. Secar em termociclador por 2 minutos a 96°C sem tampa e com o termociclador aberto.
13. Guarda-se os tubos, já secos, no freezer à 4°C envolto em papel alumínio, até o momento do sequenciamento.

3.5 Sequenciamento das amostras

O DNA purificado foi sequenciado com o Kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Standart Version 3.1* (Applied Biosystems) e visualizado em um sequenciador automático ABI PRISMTM 377 DNA Sequencer (Perking-Elmer), no Laboratório de Biologia e Genética de Peixes do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, Campus de Botucatu.

3.6 Obtenção de sequências consenso

Após o sequenciamento, as sequências de DNA obtidas da região controle ou D-loop foram analisadas no programa ATGC (Genetix Inc.), onde as sequências podem ser analisadas com a visualização simultânea do eletroferograma originário do processo de sequenciamento automático. Esse fato possibilita que as sequências consenso do gene sejam obtidas com um grau de precisão maior. Após essa etapa, as sequências consenso de cada indivíduo foram passadas para um editor de texto, nomeadas separadamente e salvas em um único arquivo em formato de texto (extensão txt).

3.7 Alinhamento das sequências e Análise dos dados

As sequências foram alinhadas com o algoritmo MUSCLE, disponível no link “<http://www.ebi.ac.uk/Tools/muscle/index.html>”. Após esse alinhamento o arquivo originado foi salvo em formato *Fasta* para que pudesse ser analisado no editor de sequências BioEdit v.7.0.9 (Hall, 1999), efetuando as correções manuais do alinhamento. É importante ressaltar que as correções feitas foram às menores possíveis, garantindo assim a repetibilidade da hipótese de homologia originária do processo de alinhamento. Tanto as árvores que foram obtidas pelo método de máxima verossimilhança, usando o modelo T92 + G + I (Tamura, 1992) e 1000 pseudoréplicas pelo método de *bootstrap*; como os valores das distâncias genéticas entre as regiões Montantes e Jusantes para as duas espécies, foram obtidas com o programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2007), que também foi usado para gerar os dendrogramas de relação.

Os índices de diversidade molecular, utilizados para inferir as estimativas de polimorfismo de DNA, foi calculado com o auxílio do programa computacional DnaSP v.5.00 (Rozas & Rozas, 1999). Um resumo dos índices que foram obtidos está apresentado na Tabela 1. A frequência dos haplótipos foi calculados também com ajuda

do programa DnaSP v.5.00 (Rozas & Rozas, 1999) e rede dos haplótipos com o programa Network v.4.6.00 (www.fluxus-engineering.com/network_terms.htm).

Foi realizado o teste de homogeneidade genética entre as duas localidades amostradas (montante e jusante) através de uma análise de variância molecular (AMOVA), usando o programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 1992). Também, com a finalidade de provar a hipótese de que as mutações observadas são seletivamente neutras, foram realizados os testes estatísticos F_s (Fu, 1997) e D (Tajima, 1989), usando o programa Arlequin v.3.5 (Excoffier *et al.*, 1992).

Tabela 1. Parâmetros e índices genéticos utilizados para estimar a variabilidade genética das espécies analisadas.

Índices e parâmetros genéticos	Símbolo	Definição
Tamanho amostral	N	Número de indivíduos coletados de cada espécie.
Número de haplótipos	H	Número de indivíduos com sequências de DNA diferentes entre eles. Uma mutação (mudança de uma base nucleotídica) caracteriza um haplótipo.
Diversidade haplotípica	Hd	Probabilidade de cada duas sequências serem diferentes em uma população.
Número de sítios polimórficos	S	Posições da sequência de DNA onde ocorrem mutações.
Número total de mutações	ETA	Número de bases nucleotídicas diferentes (mutação) que ocorrem na sequência de DNA de vários indivíduos.
Diversidade nucleotídicas	π	Indica o número médio de diferenças nucleotídicas por sítio entre as sequências
Média das diferenças nucleotídicas par a par	K	Para cada par de indivíduos é calculado o número de mutações que ocorre entre suas sequências de DNA. O K representa a média de todas essas as mutações.

4. RESULTADOS

4.1 Polimorfismos de DNA

Os resultados obtidos na análise de polimorfismo da região controle do DNAm para as duas espécies estudadas (Tabela 2). Mostram que *Pygocentrus nattereri* mesmo tendo um maior número de espécimes analisados (54 sequências) apresenta valores menores dos parâmetros genéticos em comparação a *Potamorhina latior* (45 sequências). Em *P. nattereri* com 829pb, os parâmetros genéticos da montante ($H = 5$, $Hd = 0,607 \pm 0,093$, $\pi = 0,00105 \pm 0,00025$) foram maiores do que a jusante ($H = 2$, $Hd = 0,379 \pm 0,084$, $\pi = 0,00046 \pm 0,00010$). No caso de *P. latior* com 874pb, aconteceu o mesmo, os parâmetros genéticos da montante ($H = 23$, $Hd = 0,993 \pm 0,013$, $\pi = 0,01232 \pm 0,00084$) foram maiores do que a jusante ($H = 16$, $Hd = 0,982 \pm 0,022$, $\pi = 0,01411 \pm 0,00124$).

Tabela 2. Parâmetros genéticos da região controle do DNA mitocondrial para espécimes coletadas na montante e jusante da cachoeira de Santo Antônio.

Parâmetros Genéticos	<i>Pygocentrus nattereri</i>		<i>Potamorhina latior</i>	
	Montante	Jusante	Montante	Jusante
Número de sítios	829		874	
Tamanho amostral (<i>N</i>)	54		44	
	25	29	25	19
Número de haplótipos (<i>H</i>)	5		38	
	5	2	23	16
Diversidade haplotípica (<i>Hd</i>)	0,495 ± 0,070		0,993 ± 0,007	
	0,607 ± 0,093	0,379 ± 0,084	0,993 ± 0,013	0,982 ± 0,022
Diversidade nucleotídicas (<i>π</i>)	0,00078 ± 0,00016		0,01452 ± 0,00055	
	0,00105 ± 0,00025	0,00046 ± 0,00010	0,01232 ± 0,00084	0,01411 ± 0,00124
Número total de mutações (<i>ETA</i>)	4		56	
	4	1	44	43
Número de sítios polimórficos (<i>S</i>)	4		54	
	4	1	44	41
Médias das diferenças nucleotídicas par a par (<i>K</i>)	0,647		12,649	
	0,873	0,379	10,747	12,292

4.2 Distribuição dos haplótipos

Foram analisadas inicialmente as duas espécies sem considerar as zonas de Montante e Jusante. Observa-se que *Pygocentrus nattereri* apresenta o menor número de haplótipos (5 no total). Os haplótipos com maior número de espécimes foram Hap_1, Hap_3 e Hap_4 (se repetiram 37, 5 e 10 vezes, respectivamente), a montante apresenta 3 haplótipos (Hap_3, Hap_4 e Hap_5) não presentes a jusante (Tabela 3 e Figura 5). *Potamorhina latior* apresentou o maior número de haplótipos (38 no total), com 33 haplótipos únicos e 5 haplótipos que se repetiram (Hap_3, Hap_12, Hap_30 e Hap_33 se repetiram 2 vezes e Hap_17 se repetiu 3 vezes). Podem-se observar três clados, dois dos quais representados por espécimes da jusante (Tabela 4 e Figura 6). Tanto *P. nattereri* como *P. latior*, apresentam haplótipos compartilhados entre Montante e Jusante (Figuras 7 e 8).

Tabela 3. Haplótipos de *Pygocentrus nattereri*.

Haplótipo	Espécimes	
	Montante	Jusante
H_1	MPN12, MPN13, MPN14, MPN31, MPN38, MPN632, MPN633, MPN2185, MPN2235, MPN2280, MPN2281, MPN2282, MPN3296, MPN3610, MPN6112	JPN5839, JPN5840, JPN5841, JPN5842, JPN5846, JPN5848, JPN5851, JPN5852, JPN5853, JPN5854, JPN5855, JPN5856, JPN5857, JPN5858, JPN5859, JPN5860, JPN5862, JPN5863, JPN5865, JPN5866, JPN5888, JPN5890
H_2	MPN30	
H_3	MPN35, MPN407, MPN2167, MPN3159, MPN6111	
H_4	MPN630, MPN631, MPN634	JPN5849, JPN5850, JPN5861, JPN5889, JPN5891, JPN6012, JPN6793
H_5	MPN2319	

Tabela 4. Haplótipos de *Potamorhina latior*.

Haplótipo	Espécimes	
	Montante	Jusante
H_1	MPL10	
H_2	MPL22	
H_3	MPL51, MPL5742	
H_4	MPL448	
H_5	MPL1713	
H_6	MPL1714	
H_7	MPL2140	
H_8	MPL2144	
H_9	MPL2307	
H_10	MPL2308	
H_11	MPL2309	
H_12	MPL2310, MPL3594	
H_13	MPL2582	
H_14	MPL3498	
H_15	MPL3499	
H_16	MPL3592	
H_17	MPL3593	JPL1893, JPL1894
H_18	MPL5741	
H_19	MPL5766	
H_20	MPL5774	
H_21	MPL5780	
H_22	MPL5798	
H_23	MPL6209	
H_24		JPL987
H_25		JPL1851
H_26		JPL2530
H_27		JPL2531
H_28		JPL2603
H_29		JPL2611
H_30		JPL3316, JPL3317
H_31		JPL 3393
H_32		JPL3412
H_33		JPL4949, JPL4951
H_34		JPL4955
H_35		JPL5952
H_36		JPL6013
H_37		JPL6017
H_38		JPL6927

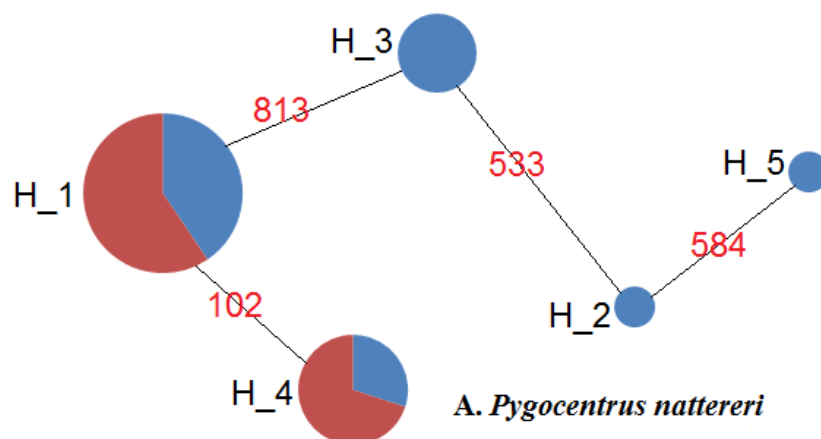


Figura 5. Relação entre os haplótipos em *Pygocentrus nattereri*. Em azul os haplótipos encontrados à montante de Santo Antônio e em vermelho os haplótipos encontrados a jusante.

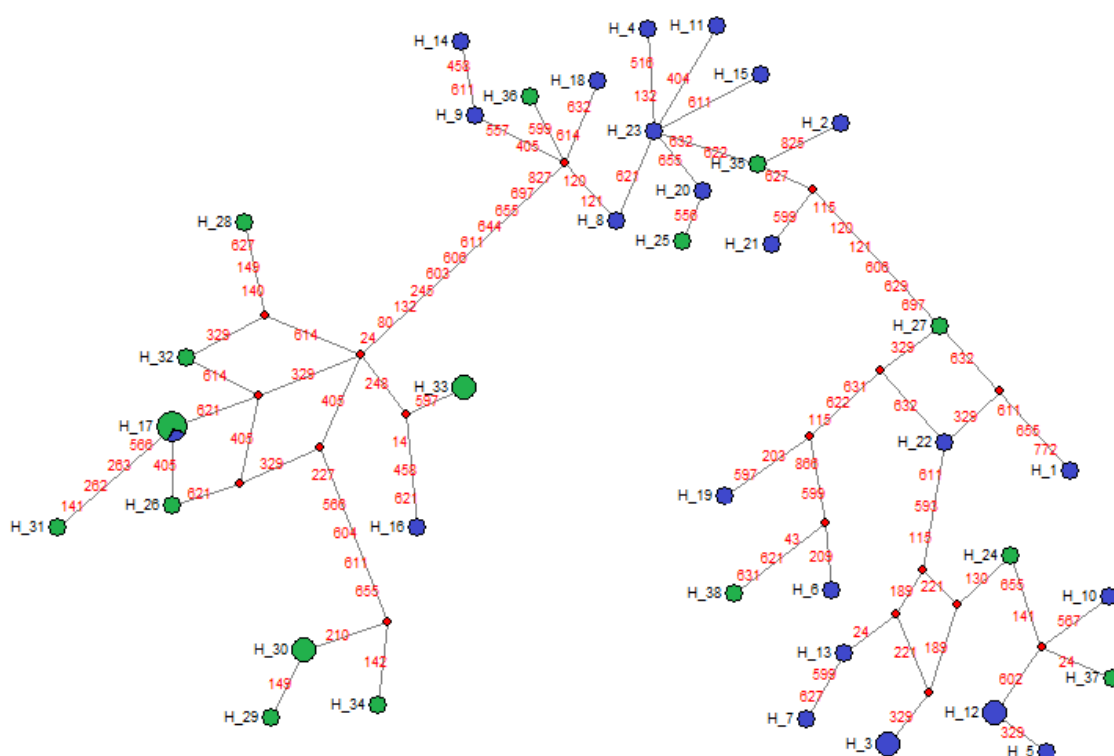


Figura 6. Relação entre os haplótipos em *Potamorhina latior*. Em azul os haplótipos encontrados à montante de Santo Antônio e em verde os haplótipos encontrados a jusante.

4.3 Testes de homogeneidade genética e neutralidade

A análise de variância molecular revelou diferenças significativas entre as localidades para *P. nattereri* ($\Phi_{st} = 0,11448$, $P = 0,018$) e para *P. latior* ($\Phi_{st} = 0,18389$, $P = 0,000$) (Tabela 5). Os resultados mostram que entre as duas localidades existem uma possível estruturação populacional tanto pelas diferenças na variabilidade genética quanto na diferenciação alélica. A realização das provas estatísticas F de Fu e D de Tajima, com a finalidade de testar a hipótese de que as mutações observadas no fragmento sequenciado da região controle do DNA mitocondrial foram seletivamente neutras, mostraram que ambas as espécies representam valores não significativos para ambas as provas estatísticas [*P. nattereri* (Tajima's D = 0.14862, $P = 0.56350$; Fu's $F_s = -0.04213$, $P = 0.36350$) e *P. latior* (Tajima's D = -0.05217, $P = 0.52850$; Fu's $F_s = -7.46959$, $P = 0.03300$)]. Também é observado a não significância dentro as duas localidades de *P. nattereri*. Mas, no caso da montante de *P. latior*, a prova estatística Fu's F_s (-11.37137, $P = 0.00000$) foi significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Testes de homogeneidade genética e neutralidade da região controle do DNA mitocondrial para espécimes coletadas na montante e jusante da cachoeira de Santo Antônio.

Teste	<i>Pygocentrus nattereri</i>		<i>Potamorhina latior</i>	
	Montante	Jusante	Montante	Jusante
Homogeneidade genética (Φ_{st})	0,11448, $P = 0,000$		0,18389, $P = 0,000$	
Teste de neutralidade D de Tajima	0.14862, $P = 0.56350$		-0.05217, $P = 0.52850$	
	-0.47445, $P = 0.27800$	0.77169, $P = 0.84900$	-0.29752, $P = 0.41400$	0.19317, $P = 0.64300$
Teste de neutralidade F_s de Fu	-0.04213, $P = 0.36350$		-7.46959, $P = 0.03300$	
	-1.18955, $P = 0.15000$	1.10529, $P = 0.57700$	-11.37137, $P = 0.00000$	-3.56780, $P = 0.06600$

4.4 Distância genética

Os valores de distância genética foram obtidos dentro de cada espécie, considerando as amostras de montante e jusante (Tabelas 6 e 7). Entre as duas localidades de *P. nattereri*, se observa uma distancia genética de 0,1%. Sendo menor em comparação a *P. latior* (1,6%). Com o objetivo de apresentar melhor a visualização dos resultados da distancia genética, foi computada uma árvore consenso de haplótipos para cada espécie. As árvores foram obtidas pelo método de máxima verossimilhança, usando o modelo de evolução T92 + G + I (Tamura, 1992) e 1000 pseudoréplicas pelo método de *bootstrap* (Figuras 7 e 8).

Tabela 6. Distância genética intraespecífica de *Pygocentrus nattereri*.

<i>Pygocentrus nattereri</i>	Montante	Jusante
Montante	0,001 ± 0,000	
Jusante	0,001 ± 0,000	0,000 ± 0,000

Tabela 7. Distância genética intraespecífica de *Potamorhina latior*.

<i>Potamorhina latior</i>	Montante	Jusante
Montante	0,013 ± 0,002	
Jusante	0,016 ± 0,003	0,014 ± 0,002

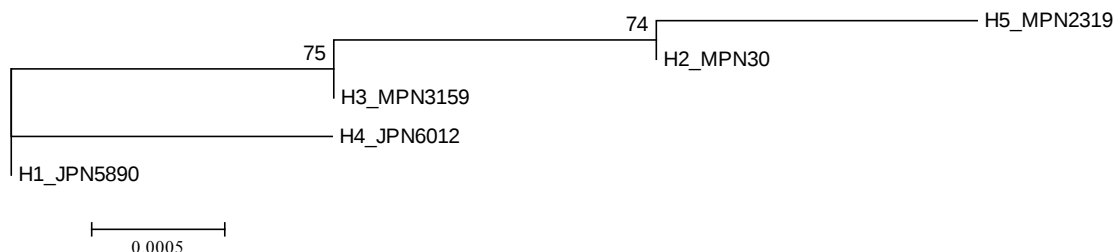


Figura 7. Dendrograma dos cinco haplótipos obtido por Máxima Verossimilhança com os indivíduos de *P. nattereri*. Os números representam valores obtidos em 1000 pseudoréplicas pelo método de *bootstrap*.

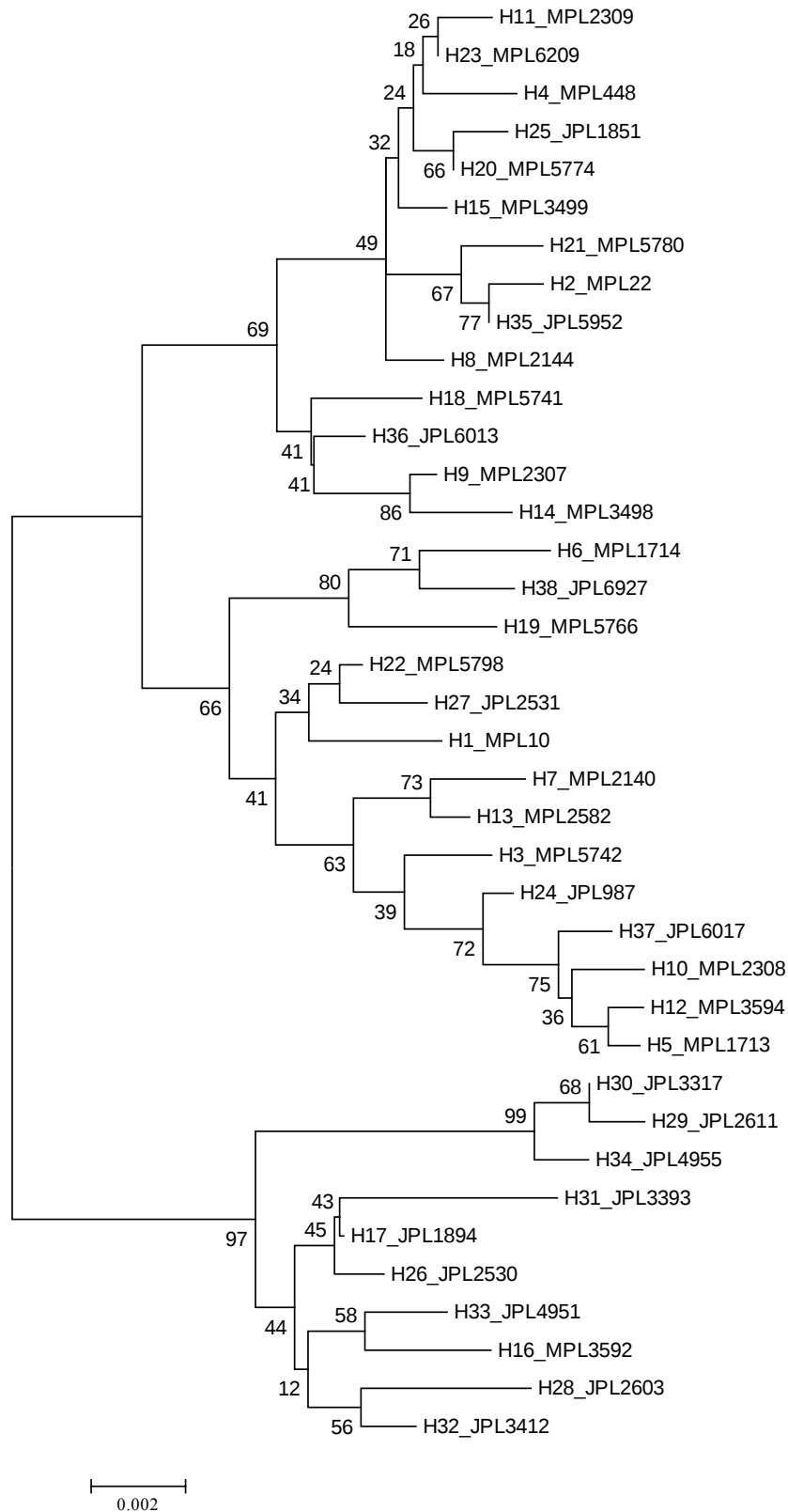


Figura 8. Dendrograma dos haplótipos obtido por Máxima Verossimilhança com os indivíduos de *Potamorhina latior*. Os números representam valores obtidos em 1000 pseudoréplicas pelo método de *bootstrap*.

5. DISCUSSÃO

A bacia do rio Madeira é o maior sub-bacia e o afluente mais importante do rio Amazonas. As duas bacias são divididas por uma série de cachoeiras, que começam imediatamente a montante da cidade brasileira de Porto Velho até a cidade de Riberalta na Bolívia. A sub-bacia boliviana (a montante das cachoeiras) compreende cerca de 60% da área total irrigada pelo rio Madeira (Lundberg *et al.*, 1998). Isto acontece porque no início do Plioceno (há 4-3 milhões de anos), houve um aumento do Arco Fitzcarrald que gradualmente foi isolando e elevando a bacia boliviana. Essa mudança gerou grandes alterações no padrão de drenagem, de modo que todos os principais rios da bacia no norte da Bolívia começaram a drenar através da região das cachoeiras do Alto Madeira (Campbell *et al.*, 2001; Hoorn *et al.*, 1995; Räsänen *et al.*, 1987).

O papel das barreiras biogeográficas na conectividade e diferenciação de populações (Rahel, 2007), papel similar das cachoeiras do rio Madeira. Já foram propostos para espécies de peixe como *Potamorhaphis eigenmanni* (Lovejoy e Collette, 2001) que se originou da transição de espécies de ambiente marinho do gênero *Strongylura*, até um ambiente de água doce como resultado de uma estruturação populacional seguido do processo de especiação. No golfinho-de-rosa *Inia geoffrensis* (Banguera-Hines *et al.*, 2002), encontraram diferenças significativas entre as populações da bacia principal do rio Amazonas com a sub-bacia boliviana, utilizaram como marcadores moleculares a região controle [rio Amazonas ($Hd = 14,9\%$, $\pi = 0,228\%$); bacia boliviana ($Hd = 76,1\%$; $\pi = 0,160\%$)] e o citocromo b [rio Amazonas ($Hd = 42,5\%$; $\pi = 0,46\%$); bacia boliviana ($Hd = 20\%$; $\pi = 0,03\%$)] do DNA mitocondrial. Para a tartaruga *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.*, 2006), entre todas as amostras coletadas, as de Peru, Brasil (bacia principal do rio Amazonas) e a Bolívia (sub-bacia) mostraram diferença significativa e as suas mutações sendo consistentes com a neutralidade para os dados do DNAm. E para *Colossoma macropomum* (Farias *et al.*, 2010), também se observou uma diferença significativa entre as populações da montante e jusante às cachoeiras no rio Madeira. No entanto, espécies do gênero *Brachyplatystoma* e *Pseudoplatystoma* atravessam sem dificuldade as cachoeiras, assim como também *Prochilodus nigricans* (Goulding, 1979).

Considerando a grande diversidade biológica registrada na região amazônica e a importância dos recursos ícticos nesta área do rio Madeira, têm ocorrido um incremento nos estudos da variabilidade genética de diversas espécies de peixes amazônicos,

principalmente aquelas que constituem unidades de exploração comercial. As espécies de Characiformes, especificamente *Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior* são um importante recurso pesqueiro por gerar renda pela sua ampla distribuição no sistema Amazonas-Solimões (Barthem e Goulding, 1997) e também pelo seu consumo na pesca de subsistência. Sendo de grande importância o conhecimento da variabilidade genética destas espécies para o desenvolvimento de medidas de manejo e conservação.

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que *Pygocentrus nattereri* apresenta valores baixos de polimorfismo de DNA [número de haplótipos ($H = 5$), diversidade haplotípica ($Hd = 0,495 \pm 0,070$) e diversidade nucleotídica ($\pi = 0,00078 \pm 0,00016$)] em comparação a *Potamorhina latior*. Em ambas as espécies, tanto a diversidade haplotípica como a diversidade nucleotídica da montante são maiores que a jusante (Tabela 2). A variabilidade genética é uma combinação da taxa de mutação e a probabilidade de fixação (McMillan & Palumbi, 1997), sendo essa última diretamente relacionada com a reprodução, o que permite uma avaliação da característica genética a partir de uma geração para a seguinte (Alberts *et al.* 1996).

Os parâmetros genéticos de diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) da região controle do DNAm podem ser úteis para saber o estado atual da população de uma determinada espécie. Isto é demonstrado pelos estudos de variação genética em Siluriformes feitas com o DNAm em *Brachyplatystoma filamentosum* e *B. capapretum* (Huergo, 2009), que têm elevados valores de diversidade de haplótipos ($Hd = 0,9871$ e $0,9509$, respectivamente), mas diferentes valores de diversidade de nucleotídeos (maior em *B. filamentosum* do que *B. capapretum*, $0,0118$ e $0,0041$, respectivamente). O autor sugeriu que esta diferença poderia ser devido à pesca intensa sobre *B. capapretum*, exigindo a adoção de medidas de gestão da pesca. Outro estudo em *B. vaillantii* (Rodriguez, 2009), realizado em quatro locais da Amazônia brasileira, a diversidade de haplótipos observada foi alta (superior a 99%) e baixa diversidade nucleotídica. Ele sugeriu que esta espécie passa por um crescimento populacional recente, por isso esta espécie tende a acumular mutações novas.

Considerando-se a relação entre os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica do DNA mitocondrial proposto por Grant & Bowen (1998). Classificamos *P. nattereri* por apresentar valores baixos de diversidade haplotípica e nucleotídica como aquela que tem ou teve um efeito de gargalo recente. Este efeito gargalo (Bignotto *et al.*, 2009, Cui *et al.*, 2009), de acordo com as interpretações sugeridas para espécies

de baixa variabilidade genética, são aqueles que estão em perigo de extinção e assim a sua adaptabilidade a mudanças e adversidades ambientais temperatura são baixas (Bernatchez *et al.*, 1989). *P. latior* por apresentar altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, foi classificada como uma espécie com populações estáveis, com grandes tamanhos efetivos, fluxo gênico e distribuição geográfica ampla. Para ambas as espécies no teste de neutralidade tanto D quanto F_s , não apresentam diferenças significativas. Assim, é possível que as espécies, nos últimos anos não apresentaram modificações nas suas estruturas populacionais. Mas, considerando somente o teste F_s para a montante de *P. latior* com valor significativo, esta população apresentaria uma expansão (Fu, 1997) que poderia estar acontecendo na sub-bacia boliviana, sendo a cachoeira de Teotônio uma barreira que não permite que o mesmo aconteça a jusante (bacia principal do rio Amazonas).

Padrões similares na distribuição da variabilidade genética usando a região controle foram determinados para algumas espécies de peixes não-migradores como *Nannostomus eques* (Terêncio, 2009), *Hypopygus lepturus* (Schmitt, 2005), e para algumas espécies migradoras de prochilodontídeos como *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009) e *Semaprochilodus insignis* (Batalha, 2009). O número de haplótipos que apresenta uma espécie ou população, também pode ser usado para determinar o estado atual de variabilidade genética. Concorde com observações feitas por Higuchi & Kato (2002) ao analisar 20 espécimes de *Sebastes thompsoni* (20 haplótipos) e 18 de *S. inermis* (15 haplótipos) apontam para uma elevada diversidade haplotípica. Do mesmo jeito, Santos *et al.* (2007) encontraram alta variabilidade haplotípica em *C. macropomum* ao pesquisar 48 espécimes (47 haplótipos) em diferentes localidades na Amazônia brasileira. Também em outras espécies de peixes de água doce, como *Carnegiella strigata* (Schneider, 2007), *Cichla monoculus* (Renno *et al.*, 2006) e peixes marinhos *Siganus spinus* e *S. guttatus* (Iwamoto *et al.*, 2009) e salmão (Weiss *et al.*, 2000, Weiss *et al.*, 2001) essa alta diversidade tem sido relatada. Mas no caso de ambas as espécies por apresentar poucos haplótipos compartilhados sugerem que o equilíbrio genético entre as duas localidades pode estar sendo alterado por fatores como redução ou ausência de migração (Frankham *et al.*, 2008).

Além da diversidade haplotípica e nucleotídica a análise de homogeneidade genética, revelou diferenças significativas entre as duas localidades para *P. nattereri* ($\Phi_{st} = 0,11448$, $P = 0,018$) e para *P. latior* ($\Phi_{st} = 0,16408$, $P = 0,000$). Os resultados

sugerem que entre as duas localidades amostras existem uma possível leve estruturação populacional. Mas, ambas as localidades apresentam haplótipos compartilhados (Figuras 5 a 6), caracterizando assim a existência de fluxo gênico. A estruturação é mais notória em *P. latior* do que em *P. nattereri*, observado também pela distância genética (Tabelas 6 e 7). Resultado similar foi encontrado por Farias *et al.* (2010) ao estudarem amostras de *C. macropomum* da sub-bacia boliviana (montante) e bacia principal do Amazonas (jusante) no rio Madeira, onde encontraram diferença significativa entre as duas bacias ($\Phi_{st} = 0,0755$, $P < 0,001$), mas não dentro das bacias.

Nossos resultados indicam que a cachoeira Teotônio no rio Madeira não é uma barreira absoluta, nem mesmo muito forte, ao intercâmbio genético para as populações locais (montante e jusante) de *P. nattereri* e *P. latior*, mas tem papel importante na diferenciação local de populações dessas espécies, o que não foi observado em estudos similares realizados com espécies de grandes bagres.

De acordo com esta informação sugere-se que uma avaliação profunda do estado da população destas espécies ao longo da bacia do rio Madeira seja realizada, assim como da efetividade do sistema de transposição de peixes construído pelas empresas responsáveis do funcionamento das barragens agora construídas nesse rio, para garantir a subsistência das populações do rio Madeira, além de dirigir esforços na conservação das áreas de alimentação na calha principal do rio Amazonas, devido a que esta constitui o hábitat preferencial não só da espécie de estudo, mas, provavelmente, de incontáveis espécies de peixes.

6. CONCLUSÕES

As corredeiras do rio Madeira não são uma forte barreira à troca genética entre os espécimes da montante e jusante para *P. nattereri* e *P. latior*, mas exercem sim papel no isolamento parcial de populações dessas espécies. Existe um fluxo de genes, sendo a mais notável em *P. nattereri* do que em *P. latior*. Pode ser que, com a destruição deste habitat, as populações desta espécie sejam muito afetadas, causando uma modificação deletéria na estrutura das populações e redução na variabilidade genética das espécies. Por outro lado, as soluções em execução, como a construção de 'escadas de peixes', podem alterar o fluxo gênico original entre as populações levando a uma indiferenciação das mesmas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. and Watson, J. D. 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega. S. A. 1385pp.
- Aquadro, C.F.; Greenberg, B.D. 1983. Human mitochondrial DNA variation and evolution: Analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*, 103:287-312.
- Arelovich, S.; Bertinat, P.; Salerno, J.; Sánchez, M. A. 2008. Escenarios energéticos en América del Sur. Energía, integración, modelo productivo: aportes para un debate necesario. Oxfam – Fundación Heinrich Böll. 233pp.
- Awise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., and Saunders, N. C., 1987. INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 1987. 18: 489 – 522.
- Awise, J.C., Hamrick, J.L. 1996. Conservation genetics. Case histories from nature. Chapman & Hall, New York, 512 p.
- Awise, J. C. 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution. Second Edition. 541pp.
- Banguera-Hinestroza, E., Cárdenas, H., Ruiz-García, M., Marmontel, M., Gaitán, E., Vázquez, R., García-Vallejo, F., 2002. Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon River dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *J. Hered.* 93, 312–322
- Barthem, R. & Goulding, M. 1997. Os Bagres Balizadotes: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazonicos. Sociedade Civil Mamirauá/TCA/GEP/PNUD. Brasília. 140 pp.
- Batalha, K.P. 2009. Genética populacional do jaraqui de escama grossa (*Semaprochilodus insignis* Prochilodontidae, Characiformes). Dissertação de Mestrado, UFAM, Manaus, 57 pp.
- Batista, J.S., Alves-Gomes, J. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research* 5 (4): 723-740.

- Bernatchez, L.; Guyomard, R. and Bonhomme, F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology* 1: 161–173
- Bignotto, T. S.; Prioli, A. J.; Prioli, S. M. A. P.; Maniglia, T. C.; Boni, T. A.; Lucio, L. C.; Gomes, V. N.; Prioli, R. A.; Oliveira, A. V.; Júlio-Junior, H. F. and Prioli, L. M. 2009. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Braz. J. Biol.* 69: 681 – 689
- Brown, H. K. 2008. Fish mitochondrial genomics: sequence, inheritance and functional variation. *Journal of Fish Biology* (2008) 72, 355–374
- Brown, J.R.; Andrew, T.B.; Smith, M.J. 1993. Intraspecific DNA sequence variation of the mitochondrial control region of white sturgeon (*Acipenser transmontanus*). *Mol. Biol. Evol.*, 10 (2):326-341.
- Brown, W.M.; George, M.Jr.; Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76: 1967-1971.
- Campbell Jr., K.E., Heizler, M., Frailey, C.D., Romero Pittman, L., Prothero, D.R., 2001. Upper cenozoic chronostratigraphy of the southwestern Amazon Basin. *Geology* 29, 595–598.
- Carvalho, G.R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish Biol.* 43, 53-73.
- Cui, Z.; Liu, Y.; Li, C. P.; You, F. and Chu, K. H. 2009. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene* 432: 33–43
- Esguícero, L.H., Arcifa, M. S. (in press). Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. *Hydrobiologia*. DOI 10.1007/s10750-009-0008-2.
- Excoffier, L.; Smouse, P.; Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial Dna restriction data. *Genetics*, 131:479-491.
- Farias, I. R.; Torrico, J. P.; García-Dávila, C.; Santos, M. C. F.; Hrbek, T.; Renno, J. F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A

- demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 1129-1135.
- Frankham, R.; Ballou, J. D. and Briscoe, D. A. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação. Sociedade Brasileira de Genética. 280pp.
- Freeland, J. R. 2005. Molecular Ecology. John Wiley & Sons Ltd. The Atrium. England. 402 pp.
- Foresti, F.; Toledo-Filho, S. A.; Almeida-Toledo, L.F. 1992. Manejo de recursos genéticos em populações naturais. In: Agostinho, A. A. & Benedito-Cecílio, E. (Ed). Situação atual e perspectivas da Ictiologia no Brasil. Maringá: Editora da Universidade Estadual de Maringá, p. 58 – 67.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- Galvis, G.; Mojica, J. I.; Duque, S.; Castellanos, C.; Sánchez, P.; Arce, M.; Gutiérrez, A.; Jiménez, L.; Santos M.; Vejarano, S.; Arbeláez, F.; Prieto, E.; Leiva, M. 2006. Peces del medio Amazonas, Región de Leticia – Conservación Internacional, Colombia. 546 pp.
- Goulding, M., 1979. Ecologia de Pesca do Rio Madeira. INPA, Manaus, Brazil.
- Goulding, M., Barthem, R.B., Ferreira, E.J.G., 2003. The Smithsonian Atlas of the Amazon. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Grant, W. S. & Bowen, B. W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *The American Genetic Association* 89: 415–426.
- Hall, T. A. 1999. Bio Edit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Res. Ser., 41: 95-98.
- Harrison, R.G.; Rand, D.M.; Wheeler, W.C. 1985. Mitochondrial DNA size variation within individual crickets. *Science*, 228: 1446-1448.
- Hatanaka, T. e Galetti Jr., P. M. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (1): 19 – 25.
- Higuchi, M. & Kato, K. 2002. Sequence variability in the mitochondrial DNA control region of five *Sebastes* species. *Fisheries Science*, 68:643–650

- Hoorn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A., Lorente, M.A., 1995. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology* 23, 237–240.
- Huergo, G. P. C. M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum*, Lichtenstein 1819) e da piraíba negra (*Brachyplatystoma capapretum*, Lundberg e Akama 2005), na Amazônia Brasileira, inferidas através do DNA mitocondrial: Subsídios para Manejo e Conservação. Tese (doutorado) – INPA.
- Iwamoto, K.; Takemura, A.; Yoshino, T. and Imai, H. 2009. Molecular ecological study of *Siganus spinus* and *S. guttatus* from Okinawan waters based on mitochondrial DNA region control sequences. *Journal of Oceanography* 65: 103 – 112.
- Kalinowski, S.T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conserv. Genetics* 5: 539-543.
- Keeney, D.B., Heupel, M.R., Hueter, R.E., Heist, E.J. 2005. Microsatellite and mitochondrial DNA analyses of the genetic structure of blacktip shark (*Carcharhinus limbatus*) nurseries in the northwestern Atlantic, Gulf of Mexico, and Caribbean Sea. *Mol. Ecol.*, 14: 1911–1923.
- Laikre, L.; Palm, S. & Ryman, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio* 34(2): 111-119.
- Lee, W.; Conroy, J.; Howell, W. H.; Kocher, T. D. 1995. Structure and evolution of teleostei mitochondrial DNA Control Regions. *J. Mol. Evol.*, 41:54-66.
- Liu, Z. J. & Cordes, J. F. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture* 238 (2004) 1 –37.
- Lovejoy, N.R., Collette, B.B., 2001. Phylogenetic relationships of New World needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia* 2001, 324–338.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S.L., Wesselingh, F.P., 1998. 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., Lucena, C.A.S. (Eds.), *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. EDIPUCRS, Porto Alegre, Brazil, pp. 13-48.

- Machado, V.N. 2009. Análise da variabilidade genética da curimatã *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Mestrado, UFAM, Manaus.
- Martins, C.; Wasko, A. P.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2003. Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, 26 (1): 33 – 38.
- Menezes, N. A.; Weitzman, S. H.; Oyakama, O. T.; De Lima, F. C. T.; Castro, R. M. C.; Weitzman, M. J. 2007. Peixes de água doce da Mata Atlântica: lista preliminar das espécies e comentários sobre conservação de peixes de água doce neotropicais. São Paulo: Museu de Zoologia – Universidade de São Paulo. 408 pp.
- Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochem. Mol. Biol. Fishes*, 2: 1-38.
- McMillan, W. O. and Palumbi, S. R. 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific Butterflyfishes (Chaetodontidae). *J. Mol. Evol.* 45: 473 – 484.
- Muller, A.C. 1995. Hidrelétricas, meio ambiente e desenvolvimento. Itaipu Binacional. Makron Books.
- Nelson, J. 1994. Fishes of the World. 3rd Edition. Printed of USA. 600pp.
- Pearse, D.E., Arndt, A.D., Valenzuela, N., Miller, B.A., Cantarelli, V.H., Sites Jr., J.W., 2006. Estimating population structure under non equilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon River turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Mol. Ecol.* 15, 985-1006.
- Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N.; Carrera, A. 2004. Marcadores Moleculares. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. pp. 61 – 68.
- Py-Daniel, L. R.; Deus, C. P.; Henriques, A. L.; Pimpão, D. M.; Ribeiro, O. M. 2007. Biodiversidade do Médio Madeira: Bases científicas para propostas de conservação. INPA: Manaus. 244 p.
- Rahel, F. J. 2007. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* 52:696-710.
- Räsänen, M.E., Salo, J.S., Kalliola, R.J., 1987. Fluvial perturbation in the western Amazon basin: regulation by long-term sub-Andean tectonics. *Science* 238, 1398 - 1401.

- Renno J, García C, Duponchelle F, Nuñez J. 2005. Biología de las Poblaciones de Peces de la Amazonía y Piscicultura. Comunicaciones del Primer Coloquio Internacional de la Red de Investigación sobre la Ictiofauna Amazónica, Iquitos, Perú.
- Renno, J-F; Hubert, N.; Torrico, J. P.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia, C.; Willis, S. C.; Desmarais, E. 2006. Phylogeography of *Cichla* (Cichlidae) in the upper Madera basin (Bolivian Amazon). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41: 503–510.
- Rodriguez, F. C. 2009. Estimativa da variabilidade da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop de quatro localidades da Amazônia diferenças entre calha e tributários. Dissertação (mestrado) – INPA/UFAM.
- Rozas, J., Rozas, R. 1999. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15: 174-175.
- Ryman, N. 1991. Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY.
- Santos, G. M.; Ferreira E. J. G.; Zuanon J. A. S. 2006. Peixes comerciais de Manaus. Manaus: Ibama/AM, ProVárzea, p. 144.
- Santos, M. C. F.; Ruffino, M. L. and Farias, I. P. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *Journal of Fish Biology* 71: 33 – 44.
- Schmitt, R. 2005. Filogeografia de *Hypopygus lepturus* Hoedman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia. Mestrado, CPBA, INPA/UFAM, Manaus, 95 pp.
- Schneider, C. H. 2007. Análise da variabilidade genética do peixe ornamental *Carnegiella strigata* (Characiformes, Gasteropelecidae) de três rios de água preta da Amazônia Central. Dissertação (mestrado) – INPA/UFAM.
- Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Guilherme, O. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major south american rivers. *Mol. Ecol.*, 10: 407-417.

- Spruell, P.; Hemmingsen, A. R.; Howell, P. J.; Kandal, N.; Allendorf, F. W. 2003. Conservation genetics of bull trout: geographic distribution of variation at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 4: 17 – 29.
- Sunnucks, P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, 15: 199-203.
- Tamura K.; Dudley, J., Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA 5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596–1599.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595.
- Terêncio, M.L. 2009. Estimativa da variabilidade genética da região controle do DNA mitocondrial de *Nannostomus eques* (Characiformes, Lesbasiinidae) da bacia do rio Negro. Dissertação de Mestrado, CGBEv, INPA, Manaus 102 pp.
- Thuesen, P.A., Pusey, B.J., Peck, D.R., Pearson, R., Congdon, B.C. 2008. Genetic differentiation over small spatial scales in the absence of physical barriers in an Australian rainforest stream fish. *J. Fish. Biol.*, 72: 1174-1187.
- Torrente-Vilara, G.; Zuanon, J.; Leprieur, F.; Oberdoff, T.; Tedesco, P. A. 2011. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). *Ecology of Freshwater Fish*. 20: 1 – 10.
- Wasko, A. P. e Galetti Jr., P. M. 2002. RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474: 131 – 137.
- Weiss, S.; Antunes, A.; Schlotterer and Alexandrino, P. 2000. Mitochondrial haplotype diversity among Portuguese brown trout *Salmon trutta* L. populations: relevance to the post-Pleistocene recolonization of northern Europe. *Molecular Ecology* 9: 691 – 698.
- Weiss, S.; Schlotterer, C.; Waidbacher, H. and Jungwirth, M. 2001. Haplotype (mtDNA) diversity of brown trout *Salmon trutta* in tributaries of the Austrian Danube: massive introgression of Atlantic basin fish – by man or nature? *Molecular Ecology* 10: 1241 – 1246.