

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise da Diversidade Genética em Curimbatá (*Prochilodus*)
da Bacia do Prata e Amazônica**

Jefferson Monteiro Henriques

Botucatu

2014

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise da Diversidade Genética em Curimatá (*Prochilodus*)
da Bacia do Prata e Amazônica**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Zoologia) do Instituto de Biociências de Botucatu, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor.

Aluno: Jefferson Monteiro Henriques

Orientador: Prof. Dr. Claudio Oliveira

Botucatu

2014

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE - CRB 8/5651

Henriques, Jefferson Monteiro.

Avaliação da diversidade genética em curimatá (*Prochilodus*) da Bacia do Prata e Amazônica / Jefferson Monteiro Henriques. - Botucatu, 2014

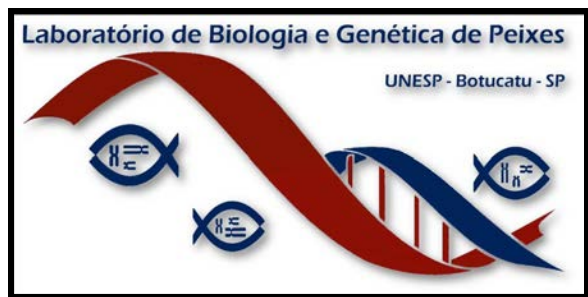
Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Claudio de Oliveira

Capes: 20204000

1. Peixe - População. 2. Peixe - Preservação. 3. Diversidade genética. 4. Genética de populações.

Palavras-chave: D-loop; Diversidade genética; Genética de populações; Microssatélite; *Prochilodus*.



Aos meus pais, que sempre se dedicaram, me incentivaram e estiveram presentes em todas as etapas da minha vida...

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me abençoar sempre, por me enviar em uma bela família e por ter amigos inesquecíveis!!!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio de Oliveira, pelo exemplo de profissionalismo, pelos ensinamentos, pela paciência e pela confiança em mim depositada .

Ao Prof. Dr. Fausto Foresti pelo exemplo como pesquisador e dedicação aos alunos.

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Morfologia (Renato Devidé, Ricardo Teixeira e Zé Eduardo), pela disposição nas coletas e pelos momentos de descontração.

Agradeço ao apoio e amizade de todos companheiros e colegas do Departamento de Morfologia.

Aos companheiros de risadas, distrações e churrascos. “A amizade, depois da sabedoria, é a mais bela dádiva feita aos homens”. [*François La Rochefoucauld*](#).

À Universidade Estadual Paulista, ao Instituto de Biociências (Botucatu-SP) e ao Departamento de Morfologia que proporcionaram a oportunidade e as condições para a realização desse estudo.

A toda minha família, meus pais: Adelino Henriques e Neuza Monteiro Henriques, e irmã: Jeniffer, pelo apoio, amizade e é claro, a confiança.

Ao CNPq e a Capes pelas bolsas concedidas e suporte financeiro.

Muito obrigado!

Resumo

A intensificação do uso de recursos aquáticos tem produzido um grande impacto sobre as comunidades de peixes. Dentre as ações antrópicas mais impactantes destacam-se a construção de barragens, a sobrepesca, o mau uso do solo na agricultura, o descarte de esgoto sem tratamento prévio nos rios, a construção de hidrovias e a introdução de espécies exóticas. O futuro das populações selvagens depende grandemente da variação genética das populações naturais. A variação genética dentro de uma espécie é um conceito fundamental para a genética aplicada à ecologia e diversos autores sugerem pelo menos três razões biológicas para a preservação da variabilidade genética das populações naturais como objetivos da biologia da conservação: a perda da variabilidade pode aumentar a probabilidade de extinção através de um declínio na fecundidade e viabilidade; populações com baixos níveis de variação genética, sobre as quais a seleção natural pode operar, podem ter oportunidades reduzidas para futuras adaptações frente a mudanças evolutivas; e a preservação da variabilidade genética pode ter papel chave na identificação de unidades evolutivas significativas para a formulação de programas de conservação. Assim, o estudo da variação genética é fundamental para o desenvolvimento de projetos de manejo sustentável. Um dos marcadores moleculares mais eficazes para o estudo populacional são os microssatélites e a região controladora da DNA mitocondrial (D-loop), que tem revelado diferenças significativas mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas. Neste contexto, o presente estudo, teve como objetivo caracterizar a diversidade genética de populações de curimatá coletados ao longo da Bacia do Prata (*Prochilodus lineatus*) e da Bacia Amazônica (*Prochilodus nigricans*) utilizando esses marcadores moleculares. Com base nos resultados obtidos, a espécie *P. lineatus* apresentou –se sem estruturação genética

quando comparadas apenas amostras coletas na Bacia do Alto Paraná, porém apresentou índices de estruturação quando essas amostras foram comparadas aos grupos amostrais pertencentes a Bacia do Paraguai. No caso da espécie *P. nigricans*, os diferentes marcadores apresentaram índices diferentes de estruturação. No caso dos microssatélites, este obteve índices de estruturação somente no grupo amostrado na localidade purus (rio Purus), e nenhuma estruturação nos demais grupos, já para o marcador mitocondrial, o mesmo apresentou altos índices de estruturação entre os grupos de diferentes rios, caracterizando cada rio como uma população. Isso pode nos levar a crer que a espécie *P. nigricans*, pode ter comportamento migratório diferente entre os sexos, isso devido ao tipo de herança típica de cada marcador.

Sumário

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1. Importância dos peixes..... | 1 |
| 1.2. Estratégias de Conservação | 1 |
| 1.3. Marcadores Moleculares e estudos genéticos em peixes | 3 |
| 1.4. Espécies estudadas | 7 |
| 1.4.1. <i>Prochilodus lineatus</i> e <i>P. nigricans</i> | 7 |
| 1.5. Áreas de estudo | 10 |
| 1.5.1. Bacia do rio da Prata | 10 |
| 1.5.2. Bacia do rio Amazonas | 11 |
| 2. OBJETIVOS | 13 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 15 |
| 3.1. Material Amostrado..... | 15 |
| 3.2. Extração do DNA total..... | 18 |
| 3.3. Microssatélites..... | 19 |
| 3.4. Amplificação e sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial..... | 20 |
| 3.5. Análise dos dados..... | 21 |
| 4. RESULTADOS..... | 24 |
| 4.1. Diversidade genética em <i>Prochilodus lineatus</i> | 24 |
| 4.1.1. Microssatélites..... | 24 |
| 4.1.2. Região controladora do DNAm (D-loop)..... | 34 |
| 4.2. Diversidade genética em <i>Prochilodus nigricans</i> | 38 |
| 4.2.1. Microssatélites..... | 38 |
| 4.2.2. Região controladora do DNAm (D-loop)..... | 46 |

| | |
|---|----|
| 5. DISCUSSÃO..... | 50 |
| 5.1. Caracterização da estrutura populacional de <i>P. lineatus</i> | 51 |
| 5.1.1. Microssatélites..... | 51 |
| 5.1.2. Região controladora do DNAm (D-loop)..... | 55 |
| 5.1.3. Estrutura Populacional em <i>P. lineatus</i> | 56 |
| 5.2. Caracterização da estrutura populacional de <i>P. nigricans</i> | 58 |
| 5.2.1. Microssatélites..... | 58 |
| 5.2.2. Região controladora do DNAm (D-loop)..... | 60 |
| 5.2.3. Estrutura Populacional em <i>P. nigricans</i> | 61 |
| 5.3. Implicações para conservação de <i>P. lineatus</i> e <i>P. nigricans</i> | 65 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 69 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 70 |
| 8. APÊNDICES..... | 88 |

1 INTRODUÇÃO

1.1. Importância dos peixes

A intensificação do uso de recursos aquáticos tem produzido um grande impacto sobre as comunidades de peixes. Dentre as ações antrópicas mais impactantes destacam-se a construção de barragens, a sobrepesca, o mau uso do solo na agricultura, o descarte de esgoto sem tratamento prévio nos rios, a construção de hidrovias e a introdução de espécies exóticas.

Ormerod (2003) destaca que os peixes estão entre os recursos naturais mundiais mais importantes e que se a importância econômica não é suficiente para enfatizar o valor que estes organismos representam, deve-se considerar a importância intrínseca de sua conservação. Esta importância está na biodiversidade e ciclos de vida que apresentam, na ecologia comportamental, nas interações ecológicas e nas adaptações fisiológicas desenvolvidas ao longo do processo evolutivo, além da potencial utilidade que muitas espécies oferecem no manejo de ecossistemas, exercendo atividades de controle de insetos vetores, manejo de vegetação invasora e em biomanipulações usadas para restaurações de sistemas aquáticos. Além disso, os peixes são reconhecidos pelo importante papel que cumprem nos processos que ocorrem no ecossistema, os quais incluem principalmente a transferência de energia entre os níveis da cadeia trófica.

1.2. Estratégias de Conservação

Peixes e outros organismos marinhos são os únicos animais selvagens consumidos em grande escala pela espécie humana, principalmente em decorrência da

exploração direta de populações naturais. Assim, os problemas e as soluções encontradas na sua exploração são completamente diferentes daqueles oriundos da exploração das plantas e animais domésticos (Solé-Cava 2001).

Uma constatação crescente identificada pelos dados estatísticos é que os estoques naturais de peixes têm sofrido sensível redução nos cursos d'água, como resultado da exploração desordenada dos recursos, pela captura de indivíduos jovens, pela pesca predatória, falta de fiscalização e medidas protecionistas e, principalmente, pela crescente fragmentação dos rios devido à construção de empreendimentos hidrelétricos que modificam as áreas de desova coletiva e interrompem o trajeto da migração reprodutiva de algumas espécies. Desta maneira, o futuro das populações selvagens depende grandemente do conhecimento da biologia e da dinâmica populacional destes animais, bem como da variação genética das populações naturais para a tomada de medidas racionais na preservação dos estoques e desenvolvimento de projetos de manejo sustentável. (Ryman, 1991, Hahn *et al.*, 1998; Hilsdorf e Petrere, 2002; Agostinho *et al.*, 2002, Marciano, 2005; Ribeiro Filho, 2006).

A variabilidade genética dentro e entre populações é um parâmetro fundamental na biologia evolutiva e conservação. Altos níveis de variação genética podem aumentar o potencial das populações em responder à seleção, acentuar a adaptação dentro de um habitat particular e também ampliar os limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em uma grande variedade de ambientes (Carvalho, 1993; Kalinowski, 2004). 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).

As espécies não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos geneticamente mais semelhantes, estando o grau de isolamento diretamente relacionado à dispersão de indivíduos entre estes grupos (Balloux & Lugon-Moulin, 2002; Laikre *et al.*, 2005). Mecanismos que promovem o isolamento das populações incluem capacidade de dispersão restrita dos indivíduos e comportamento de *homing* (tendência de retornar ao local de nascimento para reprodução). Uma troca limitada de indivíduos reprodutores entre os grupos resulta em uma diferenciação genética entre eles.

Segundo Laikre *et al.* (2005), o padrão de distribuição da variação genética dentro e entre populações é referido como “estrutura genética populacional” de uma espécie, e a mesma poderia ser de três tipos: (1) populações distintas (com baixo fluxo gênico e manutenção de isolados populacionais), (2) populações contínuas (com fluxo gênico moderado e padrão de isolamento por distância) e (3) sem diferenciação (homogeneidade genética entre todas as áreas de distribuição geográfica estudadas). Deste modo, para o estabelecimento de estratégias de manejo deve-se considerar cada um destes casos, pois o manejo incorreto pode levar à perda de alelos raros e conseqüentemente à diminuição na variação genética da espécie, uma vez que cada população contribui com uma parcela da variação total (Laikre *et al.*, 2005).

A identificação desta estrutura e diversos outros parâmetros é possível mediante a utilização de técnicas moleculares.

1.3. Marcadores Moleculares e estudos genéticos em peixes

Diversos estudos genético-populacionais têm sido conduzidos na tentativa de identificar estruturação populacional em peixes neotropicais e a maioria desses estudos

têm focado principalmente espécies pertencentes às ordens Characiformes e Siluriformes (Oliveira *et al.*, 2009). Análises moleculares apresentam especial relevância para abordagem conservacionista, uma vez que permitem avaliar a estrutura e dinâmica de uma população. A utilização de diversas classes de marcadores moleculares, como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), DNA mitocondrial, minissatélites ou VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) e microssatélites ou SSR (Simple Sequence Repeats), baseadas em PCR (Polymerase Chain Reaction), está possibilitando a caracterização da estrutura genética de diversas populações, incluindo a identificação de indivíduos migrantes e análises de diversidade genética intra- e inter-populacional (Haig, 1998; Wasko e Galetti, 2003; Matoso *et al.*, 2004; Hatanaka *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2009).

A técnica de RAPD baseia-se na utilização de apenas um primer com uma sequência arbitrária em reações de PCR e, portanto, com sequência alvo desconhecida. *primers* únicos de sequências cernes universais de VNTRs também podem ser utilizados para amplificar regiões arbitrárias do genoma de diversas espécies, incluindo peixes (Wasko e Galetti, 2002; Lopera-Barrero, N. *et al.*, 2013) e camarões (Freitas e Galetti, 2002). Existem ainda outros métodos moleculares, como RFLP (Restriction Fragment Polymorphism) e AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), que podem ser utilizados para inferir sobre a estrutura genética das populações. A técnica de RFLP baseia-se no uso de enzimas de restrição e hibridação destes fragmentos com sequências homólogas de DNA marcadas com radioatividade ou compostos luminescentes para detectar polimorfismos nos sítios de restrição (Imslan *et al.*, 2004; Okimoto *et al.*, 2008). A AFLP utiliza um misto de digestão de enzimas de restrição e posterior PCR, com análise dos fragmentos em géis de alta resolução (Ferreira e Grattapaglia, 1995; Mickett *et al.*, 2003; Maldinia *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2006).

Entre as técnicas que têm sido mais utilizadas no estudo de genética de populações, podemos destacar os marcadores microssatélites e análise da região controladora do mtDNA (D-loop).

O termo microssatélite se refere a uma classe de marcadores de DNA codominantes que possuem padrão de herança mendeliana. São sequências de 1 a 6 bases repetidas in tandem e estão presentes em organismos procariotos e eucariotos, em menor ou maior abundância, podendo ser encontrados em regiões codificantes e não codificantes do genoma da maioria dos organismos (Chambers e Macavoy, 2000; De Woody e Avise, 2000, Christiakov *et al.* 2006).

Os microssatélites têm se mostrado uma ferramenta extremamente vantajosa para o mapeamento do genoma de muitos organismos (Christiakov *et al.*, 2006). Além disso, suas aplicações se estendem por diferentes áreas como em estudos filogenéticos, forenses, de paternidade, na genética de populações e na conservação e manejo dos recursos biológicos, entre outras (Jarne e Lagoda, 1996; Christiakov *et al.*, 2006).

A grande aplicabilidade dos microssatélites em estudos com peixes pode ser evidenciada primeiramente pela grande quantidade de artigos disponíveis na literatura referentes ao isolamento e caracterização destes marcadores nesse grupo de organismos (Lee e Kocher 1996; O'Connell *et al.*, 1998; Revaldaves *et al.* 2005; Christiakov *et al.*, 2006; Morelli *et al.* 2007; Barbosa *et al.*, 2008; Gondim *et al.*, 2010; Rueda *et al.* 2011).

Os trabalhos utilizando microssatélites em peixes têm abrangido estudos relacionados à variabilidade genética, estrutura de populações com inferências sobre conservação e manejo de espécies, estudos de padrões de migração, diferenciação de estoques cultivados, evidências de introgessão genética, sistemas reprodutivos, efeitos de fragmentação de ambientes e relações filogenéticas entre táxons relacionados, entre

outros, pois revelam diferenças significativas mesmo entre populações separadas por pequenas distâncias geográficas (Lee e Kocher, 1996; García de León *et al.*, 1997; Jones e Avise, 1997; Beacham e Wood, 1999; Hansen *et al.*, 2000; Mezzera e Lurgiàder, 2001; Koskinen *et al.*, 2002; Shikano e Taniguchi, 2002; Hänfling *et al.*, 2002; Melon Barroso *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2006; Hrbek *et al.*, 2007; Carvalho-Costa *et al.*, 2008; Abreu *et al.*, 2009; Calcagnotto e DeSalle, 2009; Matsumoto e Hilsdorf, 2009; Pereira *et al.*, 2009; Hausdorf *et al.*, 2011, Barroca *et al.*, 2012, Sanches *et al.*, 2012; Mello *et al.*, 2013).

No caso do DNA mitocondrial, este é provavelmente uma das moléculas mais estudadas para uma vasta gama de projetos incluindo filogenia, filogeografia e genética de populações (Tatarenkov & Avise, 2007). Esta escolha é bem fundamentada, pois os genes mitocondriais podem ser facilmente amplificados em uma grande variedade de táxons e, por serem haplóides, as sequências podem ser obtidas sem clonagem. Por ter uma alta taxa de evolução e tamanho populacional efetivo de um quarto dos marcadores nucleares, a chance de recuperar o padrão e o tempo dos acontecimentos históricos recentes, sem um extenso esforço de sequenciamento é maior. Ainda, por possuir baixa taxa de recombinação, pode-se assumir que toda a molécula tem a mesma história genealógica (Hurst & Jiggins, 2005).

O tamanho do genoma mitocondrial (mtDNA) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16,5 kb (quilobases) nos vertebrados e até 570 kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Apresenta-se altamente conservado em animais, variando de 14 a 26 kb (Billington & Hebert, 1991), sendo representado por dois genes que codificam rRNA (12S e 16S), 22 genes que codificam tRNAs e 13 genes que codificam proteínas envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de mtDNA possui uma região controle de cerca de 1 kb, que é rica em

seqüências AT e desprovida de genes, embora exerça importante papel no início da replicação do mtDNA e na transcrição do RNA. Esta região controle em vertebrados é conhecida como “D-loop” - displacement loop (Lewin, 1994).

Haplótipos de DNA mitocondrial também vem sendo, nos últimos anos, utilizados intensamente nas pesquisas em genética de peixes para a resolução de problemas populacionais (Perdices *et al.*, 2004; Strecker *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004; Mendonça *et al.*, 2009; Cardoso & Montoya-Burgos, 2009).

Independente do método empregado, análises moleculares realizadas estão permitindo investigar a estrutura genética de diversas espécies de peixes em diferentes bacias hidrográficas do Brasil. No caso específico dos peixes migradores, estes estudos têm apontado para a presença de populações panmíticas (Revaldaves *et al.*, 1997; Carvalho-Costa, 2008; Calcagnotto e DeSalle, 2009, Iervolino *et al.*, 2010; Mello et al 2013) e também de metapopulações, ou seja, conjunto de populações geneticamente diferenciadas que mantêm fluxo gênico entre outras metapopulações (Hatanaka *et al.*, 2006, Morelli *et al.*, 2007b).

1.4. Espécies estudadas

1.4.1. *Prochilodus lineatus* e *P. nigricans*

A ordem Characiformes contém cerca de 1.680 espécies (Nelson, 2006), sendo exclusivamente restrita ao ambiente de água doce. As espécies pertencentes a esta ordem, podem ser encontradas nos continentes africano e americano, atingindo maior diversidade nas principais drenagens neotropicais (Buckup, 1998). No caso do gênero *Prochilodus*, este se apresenta como o gênero mais especioso na família Prochilodontidae e está amplamente distribuído em grande parte da América do Sul

com exceção nos rios da vertente norte da Venezuela, os rios Oriental do Uruguai, os rios da Argentina ao sul da região La Plata, e os rios que drenam para o Oceano Pacífico do continente sul americano (Castro e Vari, 2004).

A espécie *Prochilodus lineatus* está amplamente distribuída na Bacia do Prata, sendo uma das principais espécies comerciais da região (Castro e Vari, 2004). Por ser uma espécie de ampla distribuição, formas do corpo diferentes são encontradas em diferentes habitats, sendo discutido por Sverlij *et al.* (1993), Cabrera e Cândia (1964), Vidal (1967) e Pignalberi-Cordiviola e Yuan (1973), que encontraram contornos do corpo diferentes entre diferentes populações da espécie, com a variação aparentemente relacionadas aos recursos bióticos e abióticos do habitat. Na Bacia do Prata, devido a atividades pesqueiras sem nenhum tipo de manejo, populações selvagens vêm sofrendo uma redução drástica e a caracterização genética dessas populações pode ter aplicações práticas para a conservação da diversidade genética dessas espécies.

Já a espécie *Prochilodus nigricans*, possui área de ocorrência ao longo do leito principal do Rio Amazonas, bem como nos tributários à oeste e sul do Rio Amazonas e também na bacia do Rio Tocantins. Esta espécie é aparentemente ausente nas bacias do Rio Negro e Rio Branco e outros afluentes do norte do Rio Amazonas (Castro e Vari 2004). É uma espécie de grande importância comercial na região, constituindo uma das principais espécies exploradas para o consumo regional na Amazônia (Batista, 1998).

Na região de Manaus, o curimatá tem sofrido grande esforço pesqueiro, sendo capturado em grande quantidade (Petrere, 1978). Saint-Paul e Bayley (1979) estimaram o desembarque de curimatá, em Manaus, em torno de 11% da captura total para o ano de 1976 e em 19%, em 1977, para Porto Velho. Na região de Itacoatiara, o curimatá está entre as 27 espécies de peixes que são consideradas pelos amazônidas como sendo “peixes reimosos” - peixe com alto teor de gordura que, segundo crenças existentes

entre os amazônidas, pode fazer mal a saúde (Smith, 1979). No médio Tocantins, *Prochilodus nigricans* é responsável por 66% das 614 toneladas capturadas na região de Imperatriz (ELETRONORTE/THEMAG, 1989).



Fig. 1. Exemplar de curimatá (*Prochilodus lineatus* Valenciennes, 1837); (<http://images.google.com.br>).



Fig. 2. Exemplar de curimatá (*Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829); (<http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=23445&genusname=Prochilodus&speciesname=nigricans&lang=Portuguese>).

1.5. Áreas de estudo

1.5.1. Bacia do rio da Prata

A Bacia do Rio da Prata tem uma área de 3,1 milhões de Km², equivalente a 17% da superfície da América do Sul, sendo a segunda maior bacia deste Continente (CIC – Comité Intergubernamental Coordinador de Los Países de La Cuenca Del Plata, 2004).

Este sistema hidrográfico abrange os territórios de cinco países: Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai, sendo que a maior parte da área da bacia se encontra no Brasil, totalizando 1.415.000 km², seguido por Argentina (920.000 km²), Paraguai (410.000 km²), Bolívia (205.000 km²) e Uruguai (150.000 km²). O Paraguai é o único dos cinco países que tem todo seu território inserido na Bacia. O principal rio da Bacia do Prata é o Paraná, com 3.780 km, acompanhado de seus maiores afluentes: o Paraguai, com 2.620 km e o Uruguai, com 1.600 km. O Rio Paraná se torna Rio da Prata ao receber o Rio Uruguai, pouco antes de desembocar no Oceano Atlântico. (ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS, 2005, p. 5) Outros importantes rios da Bacia do Prata são o Bermejo, o Pilcomaio e o Salado, que, juntamente com o Rio Paraguai, formam a vertente ocidental da Bacia (Fonseca, 1997).

É a bacia mais populosa da América do Sul, com cerca de 120 milhões de habitantes, grandes áreas metropolitanas e uma grande concentração na sua porção superior (capital de São Paulo e bacia do rio Tietê) (Tundisi et al., 1999).

O potencial hidrelétrico da Bacia é de 60 a 70 milhões de kW e seus principais rios e afluentes proporcionam 15 mil quilômetros de vias navegáveis, constituindo a

única saída natural para o mar para Bolívia e Paraguai pelo Oceano Atlântico, bem como para importantes regiões do Brasil e da Argentina (Schilling, 1981).

Só no pantanal, uma parte considerável da bacia do Prata, ocorrem mais de 260 espécies de peixes na Planície do Pantanal (Britski et al. 1999), e apesar da sua riqueza, apenas 5 foram responsáveis por mais de 71% de todo o desembarque pesqueiro registrado pelo SCPESCA/MS entre 1994 e 1999 na BAP/MS: pacu *Piaractus mesopotamicus* (30%), pintado *Pseudoplatystoma corruscans* (17%), piavuçu *Leporinus elongatus* (10%), dourado *Salminus maxillosus* (7%) e cachara *Pseudoplatystoma fasciatum* (7%) (Catella, 2003).

1.5.2. Bacia do rio Amazonas

A bacia do rio Amazonas envolve todo o conjunto de recursos hídricos que convergem para o rio Amazonas. Essa bacia hidrográfica faz parte da região hidrográfica do Amazonas, uma das doze regiões hidrográficas do território brasileiro.

A bacia Amazônica abrange uma área de 7 milhões de km², compreendendo terras de vários países da América do Sul (Peru, Colômbia, Equador, Venezuela, Guiana, Bolívia e Brasil). É a maior bacia fluvial do mundo. De sua área total, cerca de 3,8 milhões de km² encontram-se no Brasil, abrangendo os estados do Acre, Amazonas, Roraima, Rondônia, Mato Grosso, Pará e Amapá (ANA – Agência Nacional de Águas, 2010).

A população na Região Hidrográfica Amazônica, em 2000, era de 7.609.424 habitantes (4,5% da população do País) e a densidade demográfica de apenas 2,01 hab/km² (ANA – Agência Nacional de Águas, 2009).

Os rios amazônicos, com suas praias, restingas, igarapés, matas inundadas, lagos de várzea e matupás (ilhas de vegetação aquática), assim como o estuário, são colonizados por uma enorme diversidade de plantas e animais. A bacia amazônica possui a maior diversidade de peixes do mundo, cerca de 2.500 a 3.000 espécies (IBAMA, 2009).

A pesca na região amazônica se destaca em relação às demais regiões brasileiras, tanto costeiras quanto de águas interiores, pela riqueza de espécies exploradas, pela quantidade de pescado capturado e pela dependência da população tradicional a esta atividade (Barthem & Fabre, 2004).

Uma estimativa conservadora do total desembarcado nos núcleos urbanos e do que é consumido pela população ribeirinha tem se aproximado de valores em torno de 400.000 toneladas anuais (Bayley & Petrere, 1989).

Pelo exposto, o manejo dos recursos pesqueiros se faz necessário tanto pela conservação dos sistemas aquáticos Amazônico quanto pela manutenção de uma atividade de destacada importância sócio-econômica para a população tradicional Amazônica. O sucesso do manejo depende do conhecimento integrado da biologia das espécies exploradas e das características do ambiente onde vivem (Barthem & Fabre, 2004).

2. OBJETIVOS

O conhecimento da estrutura genética das espécies selvagens de peixes é extremamente valioso para a definição de políticas de conservação, principalmente considerando que muitas dessas espécies são de grande interesse econômico e comercial.

Tendo em vista o cenário de fragmentação dos rios nas bacias dos rio Paraná-Paraguai e Amazonas, o desmatamento de matas ciliares pela exploração agrícola, a crescente degradação dos ambientes, a prática de pesca comercial e esportiva aliadas à falta de fiscalização e controle, torna-se necessário um estudo detalhado da estrutura populacional das espécies de peixes nestas regiões, para que medidas conservacionistas possam ser tomadas com o intuito de preservar esta espécie.

Assim, o presente projeto tem como objetivo principal caracterizar a diversidade genética de populações de curimatá da Bacia do Prata (*Prochilodus lineatus*) e da Bacia Amazônica (*Prochilodus nigricans*) através de marcadores do tipo microssatélite e mtDNA (D-loop), procurando testar a hipótese de que os exemplares dessas duas espécies estão em panmixia nessas bacias hidrográficas. A partir destas informações tornar-se-á possível estabelecer a ocorrência de bancos genéticos selvagens para estas espécies e avaliar a existência de diferenças entre populações de diferentes localidades.

De forma específica, pretende-se:

a) Estudar, com uso de marcadores genéticos moleculares do tipo microssatélite e mtDNA (D-loop), a variabilidade genética de curimatá na Bacia do Prata e na Bacia Amazônica;

b) Identificar geneticamente as populações e caracterizar possíveis bancos genéticos para estas espécies nessa bacia;

c) Comparar a estrutura genética de cada espécie para levantar hipóteses sobre a evolução das mesmas;

d) Avaliar as implicações das condições ambientais na composição genética das populações de curimbatá e seu significado biológico;

e) Propor programas de conservação e manejo para as espécies estudadas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material Amostrado

As coletas de exemplares de *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus nigricans* foram realizadas ao longo das Bacias do Prata e Amazônica, nas localidades indicadas nas Figuras 3 e 4, quando possível, foram amostrados cerca de 30 indivíduos para cada ponto de coleta (Tabela 1 e 2). Para obtenção das amostras, de cada animal foi retirado amostras de tecido muscular ou nadadeira, que é conservado em álcool para análises genéticas em laboratório.

Tabela 1. Relação de localidades e quantidade de amostras de *P. lineatus* da Bacia do Prata:

| Localidades amostradas | Número de indivíduos |
|--------------------------------------|-----------------------------|
| Rio Uruguai (URU) | 30 |
| Rio Tietê (TE) | 30 |
| Rio Paranapanema (PA) | 30 |
| Rio Taquari (TQ) | 14 |
| Rio Cuiabá (CU) | 12 |
| Rio Miranda (MR) | 30 |
| Rio Paraná (Lago Itaipu) (PRI) | 30 |
| Rio Paraná (Foz Paranapanema) (PRII) | 30 |
| Rio Sucuriú (SU) | 30 |
| Rio Grande (RG) | 30 |
| Rio Paranaíba (PAR) | 30 |

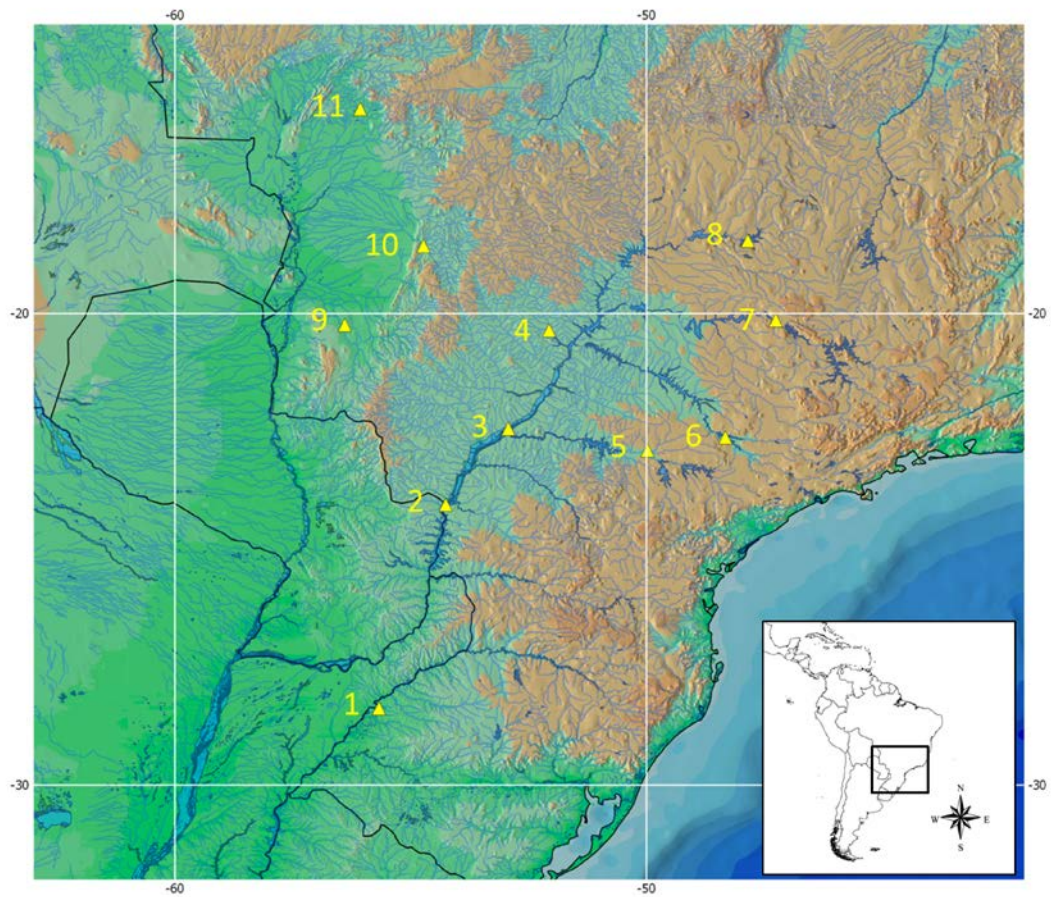


Figura 03. Mapa identificando os locais de amostragem de *Prochilodus lineatus*. 1- Rio Uruguai; 2- Rio Paraná (Lago de Itaipú); 3- Paraná (Foz do Rio Paranapanema); 4- Rio Sucuriú; 5- Rio Paranapanema; 6- Rio Tietê; 7- Rio Grande; 8- Rio Paranaíba; 9- Rio Miranda; 10- Rio Coxim; 11- Rio Cuiabá.

Tabela 2. Relação de localidades e quantidade de amostras de populações de *P. nigricans* da Bacia Amazônica e Araguaia:

| Localidades amostradas | Número de amostras |
|--|--------------------|
| Rio Amazonas (Manaus) (MN) | 30 |
| Rio Solimões (Iquitos) (IQ) | 30 |
| Rio Madeira (Montante cachoeira de Teotônio) (MDI) | 30 |
| Rio Madeira (Jusante cachoeira de Teotônio) (MDII) | 30 |
| Rio Purus (PU) | 30 |
| Rio Tapajós (TJ) | 30 |
| Rio Araguaia (AR) | 20 |

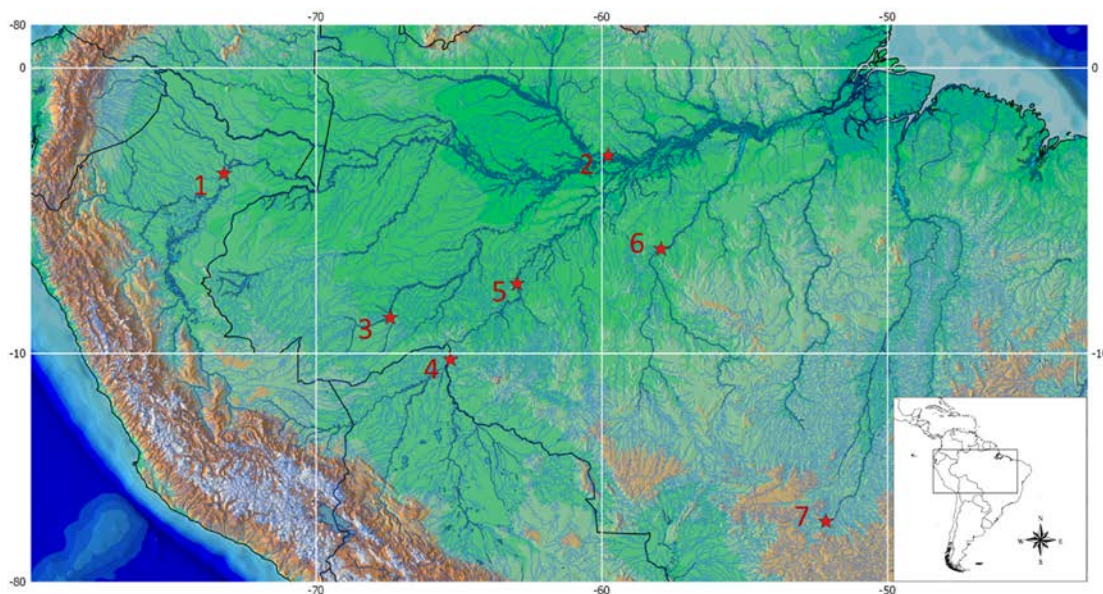


Figura 04. Mapa identificando os locais de amostragem de *Prochilodus nigricans*. 1- Rio Solimões (Iquitos); 2- Rio Amazonas (Manaus); 3- Rio Purus; 4- Rio Madeira (Montante); 5- Rio Madeira (Jusante); 6- Rio Tapajós; 7- Rio Araguaia.

3.2. Extração do DNA total

Para os estudos populacionais o DNA total foi obtido a partir de amostras de músculo e fragmentos de nadadeiras conservados em álcool, utilizando o protocolo de extração descrito abaixo, modificado de Aljanabi & Martinez (1997):

1. Prepara-se uma solução MIX contendo:

| Soluções | Volume |
|---|---------------|
| Tampão de Extração (Tris-HCl + EDTA + SDS 1%) | 290,0 µl |
| Proteinase K (10 mg/ml) | 10,0 µl |

2. Em um cadinho, dissocia-se a amostra juntamente com a solução MIX (sem a Proteinase K) e transfere-se a solução obtida para um tubo tipo *ependorf* 1,5 ml.

3. Adiciona-se a Proteinase K e deixa-se em banho-maria (55°C) de 2 a 3 horas, vertendo-os esporadicamente.

4. Coloca-se 100 µl de solução de NaCl 5M e mistura-se bem vertendo o tubo vagarosamente.

5. Centrifuga-se a 10.000 rpm por 10 minutos à temperatura ambiente.

6. Remove-se 300 µl de sobrenadante e transfere-se para um novo tubo de 1,5 ml.

7. Adiciona-se 600 µl de etanol 100% gelado.

8. Deixa-se no ultrafreezer (-70°C) por 20 minutos.

9. Centrifuga-se a 14.000 rpm por 30 minutos a 4°C.

10. Remove-se o sobrenadante.

11. Seca-se bem (pode deixar em estufa a 37°C por até 30 minutos ou então overnight em temperatura ambiente).

12. Adiciona-se 200 µl de água ultrapura autoclavada. Deixa-se na bancada ou na geladeira por pelo menos 24 horas para hidratação.

13. Aliquota-se o DNA e guarda-se 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 Microssatélites

Os *loci* microssatélites utilizados no presente trabalho foram os descritos para espécie *Prochilodus lineatus* por Rueda et al. (2011) (Tabela 3).

Todos os primers *forward* do presente trabalho foram sintetizados com a adição de uma cauda de 18pb, conhecida como sequencia universal M13 (5' TGT AAA ACG ACG GCC AGT), na extremidade 5' de um dos primers (*forward* ou *reverse*) e testados em PCR. Esta adição foi proposta por Schuelke (2000) com o objetivo de baratear os custos de genotipagem em sequenciador automático. Desse modo, são utilizados na mesma reação três *primers*, dois específicos, com um deles contendo a adição da cauda M13, e um terceiro contendo o *primer* universal M13 com um fluoróforo (FAM, TET, NED ou HEX), o responsável pela possibilidade de leitura do fragmento amplificado no sequenciador automático.

Tabela 3. Sequências dos *primers*, número de alelos, variações de tamanho e condições de amplificação dos *loci* microssatélites de *Prochilodus lineatus* utilizados:

| LOCUS | Sequência do primer | Variação do tamanho dos alelos | Ta (C°) |
|-------|--|--------------------------------|---------|
| PL3 | F: 5-TCTGAGCTGTGAGGAATGGA-3' R: 5-AGAGCGCTCAAGCACAAGAT-3' | 185–203 | 50 |
| PL9 | F: 5-CGAACATTTCTGCTGGGTGTA-3' R: 5-TCTCCAACCACTGGGAGAAC-3' | 196–248 | 55 |
| PL14 | F: 5-TGCCCAACACTGAACTGAG-3' R: 5-CTCATCAACCTGCCTGGAAT-3' | 104–134 | 61 |
| PL23 | F: 5-TTGGCTACTTCCCAAACAC-3' R: 5-GGGGAAGTAGTTTGACGATGC-3' | 244–252 | 59 |
| PL25 | F: 5-GAAGCTTGGGCTCTTGACAT-3' R: 5-CGTTTGCTCTAGCCTTTTG-3' | 104–112 | 59 |
| PL28 | F: 5-GAAGCTTGGGCTCTTGACAT-3' R: 5-CGTTTGCTCTAGCCTTTTG-3' | 239–249 | 59 |
| PL119 | F: 5-GAAAAAGGCTAGGGGACTGG-3' R: 5-GAGGAAAAT TGCCTT TTGTAGG-3' | 161–207 | 59 |
| PL139 | F: 5-CAGTGGCATGATGAT TAGATGG-3' R: 5-CACCTTTTGTGGCTTTTAGG-3' | 169–235 | 53 |
| PL190 | F: 5-GCTTGGGAGCCTATTCATCC-3' R: 5-GGGTTTCTGCACCATACAGG-3' | 197–227 | 62 |
| PL216 | F: 5-GGT ACC CGG GAA GCT TGG-3' R: 5-GGGAAGCTTGGGATCTACC-3' | 198–268 | 52 |

Todas as reações de PCR (Polymerase Chain Reaction) foram realizadas utilizando os aparelhos termocicladores Veriti 96 *well* (Applied Biosystems). As amplificações foram realizadas em uma solução com um volume total de 10 µl com 6.95µl de H₂O, 1µl tampão (10X), 0,25µl MgCl₂ (50mM), 0,25µl dNTP (2mM), 0,25 µl de cada primer (10mM), 0,05 µl de Taq DNA polimerase e 1,0 µl de DNA. As reações consistiram de uma sequência de denaturação inicial a 95°C por 5 min, 32 ciclos com denaturação da cadeia a 95°C por 30 seg, hibridização dos primers em sua respectiva temperatura de anelamento (TA) por 45 seg e extensão dos nucleotídeos a 72°C por 45 seg, mais 12 ciclos para adição da cauda M13 com o fluoróforo, com denaturação de 95°C por 30 seg, hibridização da cauda a 53°C por 45 seg e extensão a 72°C por 45 seg, seguido pela extensão final a 72°C por 20 min.

Após o término das reações, os produtos com amplificação satisfatória foram submetidos à análise em sequenciadores automáticos ABI 3100 e ABI 3130 (Applied Biosystems), e genotipados utilizando-se o programa GENEMAPPER 3.1, tendo o ROX350 como referência de tamanho (Applied Biosystems).

3.4 Amplificação e sequenciamento da região controle do DNA mitocondrial

O segmento de DNA mitocondrial D-loop foi amplificado utilizando o *primer forward* F-TTF: 5'GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA3' descrito por Sivasundar et al. (2001) e o *primer reverse*, nomeado provisoriamente de RCR1: 5'GTCAGGACCATGCCTTTGTG3'. Todas as reações foram realizadas utilizando os aparelhos termocicladores Veriti 96 *well* (Applied Biosystems). As amplificações foram realizadas em uma solução com um volume total de 12,5 µl com 9,45µl de H₂O, 1,25µl tampão (10X), 0,3µl MgCl₂ (50mM), 0,25µl dNTP (2mM), 0,25 µl de cada primer (10mM), 0,05 µl de Taq DNA polimerase e 1,0 µl de DNA. As reações consistiram de uma denaturação inicial a 95 °C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de denaturação a

94 °C por 30 segundos, anelamento a 54 °C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72 °C por 10 minutos.

O sequenciamento da região controle foi realizada em sequenciadores automáticos ABI 3130 e ABI 3500 (Applied Biosystems) utilizando o protocolo de reação do Kit “Big Dye™ Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction” (Applied Biosystems). Foram sequenciados tanto os fragmentos forward quanto o reverse, sendo que as sequências consenso foram obtidas pelo software ATGC versão 4.0.

3.5 Análise dos dados

De forma geral, as análises estatísticas foram realizadas com o intuito de averiguar tanto a variabilidade genética dentro dos grupos quanto sua distribuição dentro de uma população, visando identificar indícios de possível estruturação populacional entre os grupos analisados.

O software Genealex 6.5 (Peakall e Smouse 2006) foi utilizado para a determinação do número total de alelos (N_a), alelos privados (N_p) e para a exportação das matrizes utilizadas em outros programas. Os valores de heterozigosidade esperada e observada (H_e , H_o), os índices de fixação intra e interpopulacional (Wright 1978), a análise de variância molecular (AMOVA), teste exato de desequilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o teste de neutralidade (FS de FU e D de Tajima) foram obtidas com a aplicação do software Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005). Os níveis de significância para os testes de desequilíbrio de HWE e FST foram ajustados usando as correções de Bonferroni (Rice, 1989; Guo e Thompson, 1992), sendo a correção padrão para HWE ($P \leq \alpha/k$, onde α representa o índice de significância 0,05 e k o número de loci) e sequencial para índices de fixação ($P \leq \alpha/k$, onde α representa o índice de

significância 0,05 e k o número de estimativas). Eventuais desvios do HWE podem ser atribuídos à presença de alelos nulos, resultantes da não amplificação de alguns alelos devido a substituições, inserções ou deleções no sítio de hibridização dos primers; stutters, representados por série de bandas causadas provavelmente pelo deslizamento da Taq polimerase durante a PCR; ou *dropouts*, decorrentes da presença de alelos menores amplificados com mais frequência em relação aos alelos de maior tamanho, explicados pela amplificação preferencial. Dessa forma, o software Microchecker 2.2.1 (van Oosterhout et al. 2004) foi utilizado para determinar a presença destes fatores nos loci analisados.

O programa Structure 2.3.1. (Pritchard et al., 2000) foi utilizado para a verificação da estrutura populacional. Este programa utiliza a abordagem de análise Bayesiana para determinação de possíveis populações existentes (K) na amostragem, considerando-se apenas os genótipos dos indivíduos amostrados. O número de populações (K) foi estimado utilizando o modelo de ancestralidade *no admixture*, com o número de (K) variando de 2 a 10. Cinco corridas independentes com 500.000 gerações de cadeias Markovianas (MCMC) e *burn in* de 100.000 foi utilizado para cada valor de (K). A correção dos dados obtidos no STRUCTURE proposta por Evanno et al. (2005), foram realizadas no programa STRUCTURE HARVESTER.

A correlação das distâncias geográficas pelas distâncias genéticas par a par (F_{st}) foram testadas utilizando a permutação de Mantel (Mantel, 1967), utilizando o programa ISOLDE, implementado no programa GENEPOP 3.3 (Raymond & Rousset 1995). As significâncias foram testadas com 10000 permutações.

Para as análises do marcador mitocondrial D-Loop, as sequências foram alinhadas e editadas pelo software Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), para então serem utilizados os softwares DNAsp Sequence Polymorphism (Rozas et al.

2003) e Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005), que resultaram na determinação do número de haplótipos (Nh), número de sítios polimórficos (Nsp), diversidade gênica e nucleotídica, análise de variância molecular (AMOVA), teste de neutralidade (FS de FU e D de Tajima), índices de fixação interpopulacional (FST) e análise de Mismatch.

4. RESULTADOS

4.1. Diversidade genética em *Prochilodus lineatus*

4.1.1. Microssatélites

Foram analisadas 275 amostras de *Prochilodus lineatus*, divididas em grupos, sendo cada grupo correspondente a um local de coleta (Tabela 01). Todos os *loci* analisados se mostraram polimórficos e em grande parte dos *loci* a heterozigosidade esperada apresentou valores superiores ou próximos dos valores de heterozigosidade observada. Somente para o *locus* P109, o mesmo apresentou valores superiores de heterozigosidade observada para seis grupos amostrais. Os valores maiores e menores de heterozigosidade observada foram observados no *locus* P1190 da amostra Paraná I (0,897) e no *locus* P123 das amostras Tietê e Uruguai (0,000), respectivamente. Mas, de uma forma geral, os valores de heterozigosidade observada mostraram-se satisfatórios, apresentando valores acima de 0,2, sendo que o maior valor de heterozigosidade média observada foi verificado nas amostras da localidade Grande (0,624) e o menor na localidade Coxim (0,366) (Tabela 04).

O número de alelos (N_a) e o número de alelos privados (N_p), foram estimados para cada *locus* e para cada ponto amostrado, sendo que as localidades que apresentaram o maior número de alelos foram Grande e Miranda com 26 alelos para o *locus* P125, e o número de alelos privados, quando presentes, não ultrapassaram a dois dentro de uma amostra em um *locus*. Realizando-se um comparativo entre os grupos amostrados, o maior valor médio de alelos foram encontrados nos grupos Grande, Miranda e Paranaíba (12,222) e o menor no grupo Cuiabá (5,222), porém, o mesmo

também possui o menor número de amostras entre os grupos. Em relação aos alelos privados o grupo Coxim apresentou o maior valor médio (0,778) e o grupo Cuiabá o menor (0,222) (Tabela 03).

O índice de fixação populacional (F_{is}), que avalia e fornece uma estimativa em relação à endogamia nas amostras analisadas, foi estimado, de modo que o maior valor absoluto obtido foi para os grupos Miranda, Tietê e Uruguai (1,000) para o *locus* PL23 e o menor para o grupo Paraná II (-0,568) para o *locus* PL09. Na comparação entre os grupos (Tabela 03), o maior valor de F_{is} foi obtido para o grupo Coxim (0,443) e o menor valor para o grupo Grande (0,062). Todos os grupos analisados apresentaram valores positivos para o F_{is} , ou seja, todos os grupos apresentaram deficiência de heterozigotos, apresentando um valor médio final de 0,256 para todos os *loci* e grupos analisados.

A hipótese nula (H_0) de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aceita em 47 das 90 estimativas com valores significantes de $P > 0,005$ após correção de Bonferroni. Assim, foi verificada significância de desvio em 43 estimativas. Em praticamente todas as ocorrências, os valores significantes de desequilíbrio estão associados à presença de alelos nulos (Tabela 03).

Tabela 03. Dados de nove *loci* microsatélites para cada grupo de *P. lineatus*. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; Np = número de alelos privados; Ho = heterozigidade observada; He = heterozigidade esperada; F_{is} = índice de fixação (endogamia); HWE = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,005$ ajustados com a correção de Bonferroni; R = frequência de alelos nulos por *locus*.

| | <i>LOCI</i> | | | | | | | | |
|-----------------|-------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | PI03 | PI09 | PI14 | PI23 | PI25 | PI119 | PI139 | PI190 | PI216 |
| Cuiabá | | | | | | | | | |
| N | 06 | 05 | 05 | 06 | 04 | 06 | 06 | 06 | 05 |
| Na/Np | 07/01 | 03 | 04 | 01 | 05 | 10/01 | 07 | 07 | 03 |
| Ne | 06 | 2,62 | 3,333 | 1,000 | 4,571 | 9,000 | 6,545 | 6,000 | 2,632 |
| I | 1,864 | 1,03 | 1,280 | 0,000 | 1,560 | 2,254 | 1,907 | 1,864 | 1,030 |
| Ho | 0,333 | 0,600 | 0,600 | 0,000 | 0,250 | 0,833 | 0,333 | 0,667 | 0,800 |
| He | 0,833 | 0,620 | 0,700 | 0,000 | 0,781 | 0,889 | 0,847 | 0,833 | 0,620 |
| Fis | 0,600 | 0,032 | 0,143 | N/D | 0,680 | 0,062 | 0,607 | 0,200 | -0,290 |
| HWE | 0,079 | 0,079 | 0,244 | - | 0,100 | 0,352 | 0,092 | 0,092 | 0,769 |
| R | 0,272 | - | - | - | 0,298 | - | 0,278 | - | - |
| Coxim | | | | | | | | | |
| N | 26 | 26 | 28 | 19 | 19 | 23 | 22 | 24 | 0 |
| Na/Np | 10 | 03/02 | 09/02 | 02 | 18/01 | 16/02 | 15/01 | 13/02 | 0 |
| Ne | 3,101 | 1,659 | 4,598 | 1,111 | 14,440 | 10,907 | 10,637 | 7,945 | 0,000 |
| I | 1,544 | 0,697 | 1,768 | 0,206 | 2,778 | 2,549 | 2,527 | 2,292 | 0,000 |
| Ho | 0,538 | 0,346 | 0,750 | 0,000 | 0,579 | 0,391 | 0,318 | 0,375 | 0,000 |
| He | 0,678 | 0,397 | 0,783 | 0,100 | 0,931 | 0,908 | 0,906 | 0,874 | 0,000 |
| Fis | 0,205 | 0,128 | 0,042 | 1,000 | 0,378 | 0,569 | 0,649 | 0,571 | - |
| HWE | 0,000* | 0,012 | 0,004* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | - |
| R | 0,290 | - | 0,270 | 0,277 | 0,285 | 0,281 | 0,289 | 0,294 | - |
| Paraná I | | | | | | | | | |
| N | 29 | 29 | 29 | 30 | 16 | 30 | 29 | 29 | 26 |
| Na/Np | 10/02 | 05/01 | 09/02 | 01 | 13 | 25/03 | 18 | 13 | 04 |
| Ne | 3,318 | 2,246 | 4,596 | 1,000 | 8,828 | 11,688 | 10,579 | 8,538 | 2,288 |
| I | 1,626 | 0,990 | 1,749 | 0,000 | 2,361 | 2,844 | 2,606 | 2,310 | 0,981 |
| Ho | 0,690 | 0,586 | 0,828 | 0,000 | 0,313 | 0,633 | 0,517 | 0,897 | 0,692 |
| He | 0,699 | 0,555 | 0,782 | 0,000 | 0,887 | 0,914 | 0,905 | 0,883 | 0,563 |

| | | | | | | | | | |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Fis | 0,013 | -0,057 | -0,058 | N/D | 0,648 | 0,307 | 0,429 | -0,015 | -0,230 |
| HWE | 0,101 | 0,000* | 0,684 | - | 0,000* | 0,009 | 0,001* | 0,779 | 0,184 |
| R | - | - | - | - | 0,304 | 0,146 | 0,203 | - | - |
| Paraná II | | | | | | | | | |
| N | 29 | 29 | 29 | 27 | 19 | 19 | 19 | 18 | 25 |
| Na/Np | 06 | 02 | 12/01 | 02 | 15 | 19/01 | 15 | 11 | 06/03 |
| Ne | 2,628 | 1,859 | 6,161 | 1,800 | 10,028 | 15,362 | 11,460 | 6,291 | 1,471 |
| I | 1,218 | 0,655 | 2,068 | 0,637 | 2,502 | 2,830 | 2,561 | 2,100 | 0,746 |
| Ho | 0,241 | 0,724 | 0,759 | 0,000 | 0,579 | 0,579 | 0,316 | 0,722 | 0,280 |
| He | 0,620 | 0,462 | 0,838 | 0,444 | 0,900 | 0,935 | 0,913 | 0,841 | 0,320 |
| Fis | 0,610 | -0,568 | 0,094 | 1,000 | 0,357 | 0,381 | 0,654 | 0,141 | 0,125 |
| HWE | 0,000* | 0,002* | 0,873 | 0,000* | 0,056 | 0,001* | 0,000* | 0,339 | 0,751 |
| R | 0,233 | - | - | 0,307 | 0,169 | 0,184 | 0,312 | - | - |
| Grande | | | | | | | | | |
| N | 32 | 29 | 29 | 26 | 23 | 30 | 30 | 30 | 32 |
| Na/Np | 10/01 | 03 | 09 | 03 | 26/02 | 25 | 20/01 | 11 | 03 |
| Ne | 4,796 | 2,064 | 4,269 | 2,195 | 18,241 | 18,182 | 12,000 | 8,257 | 1,099 |
| I | 1,827 | 0,767 | 1,720 | 0,925 | 3,090 | 3,047 | 2,700 | 2,234 | 0,219 |
| Ho | 0,531 | 0,690 | 0,517 | 0,769 | 0,739 | 0,800 | 0,533 | 0,967 | 0,094 |
| He | 0,792 | 0,515 | 0,766 | 0,544 | 0,945 | 0,945 | 0,917 | 0,879 | 0,090 |
| Fis | 0,329 | -0,338 | 0,325 | -0,413 | 0,218 | 0,153 | 0,418 | -0,100 | -0,038 |
| HWE | 0,011 | 0,208 | 0,069 | 0,017 | 0,008 | 0,000* | 0,000* | 0,241 | 0,994 |
| R | 0,145 | - | 0,140 | - | 0,105 | 0,074 | 0,200 | - | - |
| Miranda | | | | | | | | | |
| N | 21 | 27 | 29 | 19 | 22 | 29 | 27 | 27 | 25 |
| Na/Np | 08 | 02 | 14 | 02 | 26/02 | 23 | 15 | 15/03 | 05 |
| Ne | 4,691 | 1,759 | 6,420 | 1,111 | 17,926 | 16,653 | 11,571 | 6,688 | 1,341 |
| I | 1,790 | 0,623 | 2,232 | 0,206 | 3,087 | 2,956 | 2,561 | 2,262 | 0,584 |
| Ho | 0,619 | 0,630 | 0,586 | 0,000 | 0,727 | 0,655 | 0,444 | 0,889 | 0,200 |
| He | 0,797 | 0,431 | 0,844 | 0,100 | 0,944 | 0,940 | 0,914 | 0,850 | 0,254 |
| Fis | 0,213 | -0,459 | 0,306 | 1,000 | 0,230 | 0,303 | 0,514 | -0,045 | 0,214 |

| | | | | | | | | | |
|------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| HWE | 0,062 | 0,017 | 0,000* | 0,000* | 0,135 | 0,001* | 0,000* | 0,334 | 0,005* |
| R | 0,093 | - | 0,139 | 0,111 | - | 0,146 | 0,245 | - | - |
| Paranaíba | | | | | | | | | |
| N | 28 | 31 | 29 | 28 | 19 | 32 | 30 | 32 | 31 |
| Na/Np | 09/02 | 05 | 12 | 04 | 23/01 | 23/01 | 16/02 | 12 | 06/01 |
| Ne | 4,296 | 2,403 | 6,347 | 2,190 | 17,610 | 15,398 | 11,321 | 6,966 | 1,265 |
| I | 1,706 | 1,037 | 2,084 | 0,968 | 2,999 | 2,921 | 2,593 | 2,130 | 0,519 |
| Ho | 0,357 | 0,484 | 0,759 | 0,643 | 0,947 | 0,656 | 0,433 | 0,781 | 0,161 |
| He | 0,767 | 0,584 | 0,842 | 0,543 | 0,943 | 0,935 | 0,912 | 0,856 | 0,210 |
| Fis | 0,534 | 0,171 | 0,100 | -0,183 | -0,004 | 0,298 | 0,525 | 0,088 | 0,231 |
| HWE | 0,000* | 0,000* | 0,373 | 0,000* | 0,103 | 0,000* | 0,000* | 0,795 | 0,580 |
| R | 0,232 | - | - | - | - | 0,144 | 0,250 | - | - |
| Sucuriú | | | | | | | | | |
| N | 26 | 25 | 26 | 26 | 21 | 25 | 20 | 21 | 25 |
| Na/Np | 06 | 03 | 13/01 | 03 | 14/02 | 22/01 | 16/02 | 13/03 | 05 |
| Ne | 2,246 | 1,994 | 5,541 | 2,667 | 8,563 | 11,905 | 11,765 | 7,538 | 1,341 |
| I | 1,139 | 0,792 | 2,055 | 1,035 | 2,380 | 2,786 | 2,597 | 2,249 | 0,584 |
| Ho | 0,231 | 0,600 | 0,846 | 0,385 | 0,619 | 0,520 | 0,550 | 0,762 | 0,280 |
| He | 0,555 | 0,498 | 0,820 | 0,625 | 0,883 | 0,916 | 0,915 | 0,867 | 0,254 |
| Fis | 0,584 | -0,204 | -0,032 | 0,385 | 0,299 | 0,432 | 0,399 | 0,122 | -0,101 |
| HWE | 0,000* | 0,128 | 0,030 | 0,001* | 0,000* | 0,000* | 0,002* | 0,001* | 1,000 |
| R | 0,208 | - | - | 0,147 | 0,140 | 0,206 | 0,190 | - | - |
| Tietê | | | | | | | | | |
| N | 22 | 21 | 22 | 24 | 18 | 26 | 21 | 26 | 21 |
| Na/Np | 09 | 05/03 | 10/01 | 02 | 17/02 | 21/03 | 16 | 15 | 04 |
| Ne | 4,502 | 2,321 | 3,737 | 1,087 | 10,125 | 12,636 | 11,025 | 8,723 | 2,471 |
| I | 1,778 | 1,082 | 1,675 | 0,173 | 2,577 | 2,800 | 2,569 | 2,402 | 1,027 |
| Ho | 0,409 | 0,476 | 0,591 | 0,000 | 0,444 | 0,615 | 0,524 | 0,692 | 0,333 |
| He | 0,778 | 0,569 | 0,732 | 0,080 | 0,901 | 0,921 | 0,909 | 0,885 | 0,595 |
| Fis | 0,474 | 0,163 | 0,193 | 1,000 | 0,507 | 0,332 | 0,424 | 0,218 | 0,440 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|-------|--------|
| HWE | 0,087 | 0,000* | 0,551 | 0,000* | 0,000* | 0,023 | 0,000* | 0,690 | 0,001* |
| R | - | 0,207 | - | 0,102 | 0,240 | 0,159 | 0,201 | - | 0,164 |
| Uruguai | | | | | | | | | |
| N | 26 | 26 | 27 | 22 | 22 | 24 | 26 | 26 | 24 |
| Na/Np | 10/01 | 03 | 10 | 02 | 24/02 | 24 | 18 | 12 | 04 |
| Ne | 4,646 | 2,143 | 4,718 | 1,095 | 14,448 | 9,521 | 9,589 | 6,563 | 1,917 |
| I | 1,806 | 0,826 | 1,921 | 0,185 | 2,933 | 2,767 | 2,587 | 2,140 | 0,890 |
| Ho | 0,462 | 0,577 | 0,741 | 0,000 | 0,545 | 0,667 | 0,423 | 0,846 | 0,458 |
| He | 0,785 | 0,533 | 0,788 | 0,087 | 0,931 | 0,895 | 0,896 | 0,848 | 0,478 |
| Fis | 0,412 | -0,082 | 0,060 | 1,000 | 0,414 | 0,255 | 0,528 | 0,002 | 0,042 |
| HWE | 0,001* | 0,422 | 0,103 | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,748 | 0,088 |
| R | 0,181 | - | - | 0,070 | 0,199 | 0,120 | 0,249 | - | - |

Tabela 04. Índices de diversidade genética intrapopulacional obtidos com marcadores microsatélites para os grupos de *P. lineatus*. * = $P \leq 0,005$ ajustados com a correção de Bonferroni. (N_a = número de alelos; N_e = número de alelos efetivos; H_0 = heterozigiosidade observada; H_e = heterozigiosidade esperada; F_{is} = Índice de endogamia)

| GRUPOS | N_a | N_e | H_0 | H_e | F_{is} |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|----------|
| Cuiabá | 5,222 | 4,635 | 0,491 | 0,680 | 0,254* |
| Coxim | 9,556 | 6,044 | 0,366 | 0,620 | 0,443* |
| Paraná I | 10,889 | 5,898 | 0,573 | 0,688 | 0,130* |
| Paraná II | 9,778 | 6,340 | 0,467 | 0,697 | 0,311* |
| Grande | 12,222 | 7,900 | 0,627 | 0,710 | 0,062* |
| Miranda | 12,222 | 7,573 | 0,528 | 0,674 | 0,253* |
| Paranaíba | 12,222 | 7,533 | 0,580 | 0,733 | 0,195* |
| Sucuriú | 10,556 | 5,951 | 0,532 | 0,704 | 0,209* |
| Tietê | 11,000 | 6,292 | 0,454 | 0,708 | 0,417* |
| Uruguai | 11,889 | 6,071 | 0,524 | 0,693 | 0,292* |
| Média Total | 10,556 | 6,424 | 0,514 | 0,691 | 0,256* |

O índice de diferenciação genética F_{st} (baseado no modelo de mutação IAM) entre os grupos de *P. lineatus* para todos os *loci*, mesmo apresentando índices baixos, mostraram uma possível divergência entre os grupos analisados. Pela análise do F_{st} par a par (Tabela 05), é possível verificar que os valores maior e menor de divergência entre os grupos estão na comparação entre os grupos Cuiabá e Coxim (0,108) e Grande e Paranaíba (0,014), respectivamente.

Tabela 05. Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par entre os grupos de *P. lineatus* com marcadores microssatélites.

(* = P < 0,05)

| | Cuiabá | Coxim | Paraná I | Grande | Miranda | Paranaíba | Paraná II | Sucuriú | Tietê | Uruguai |
|-----------|--------|--------|----------|--------|---------|-----------|-----------|---------|--------|---------|
| Cuiabá | 0,000 | | | | | | | | | |
| Coxim | 0,108* | 0,000 | | | | | | | | |
| Paraná I | 0,050* | 0,110* | 0,000 | | | | | | | |
| Grande | 0,085* | 0,142* | 0,054* | 0,000 | | | | | | |
| Miranda | 0,065* | 0,108* | 0,035* | 0,030 | 0,000 | | | | | |
| Paranaíba | 0,082* | 0,130* | 0,054* | 0,014 | 0,027* | 0,000 | | | | |
| Parana II | 0,084* | 0,121* | 0,061 | 0,031* | 0,026* | 0,021* | 0,000 | | | |
| Sucuriú | 0,101* | 0,139* | 0,075 | 0,032* | 0,039 | 0,023* | 0,019 | 0,000 | | |
| Tietê | 0,034* | 0,094* | 0,028* | 0,051* | 0,029* | 0,046* | 0,047* | 0,058* | 0,000 | |
| Uruguai | 0,048* | 0,108* | 0,029* | 0,035* | 0,019* | 0,034* | 0,039* | 0,053* | 0,023* | 0,000 |

Pela análise de variância molecular (AMOVA) foi possível identificar que a maior fonte de variação está presente dentro dos grupos (96,42%). O valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional ($F_{ST} = 0,03$) é considerado baixo, indicando nenhuma ou pouca estruturação genética entre os dez grupos amostrados (Tabela 06).

Tabela 06. Análise da variância molecular (AMOVA) e F_{ST} , entre os grupos de *P. lineatus*, com marcadores microssatélites. * $P < 0,05$

| População | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes da variação | % da variação | F_{ST} |
|-----------|-----------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|----------|
| Grupos | Entre os grupos | 15.255 | 0.011 | 0.35 | 0.03* |
| | Entre ind. dentro de grupos | 59.611 | 0.101 | 3.23 | |
| | Dentro dos grupos | 137.804 | 3.049 | 96.42 | |
| Total | | 212.670 | 3.161 | | |

A análise bayesiana realizada por iterações de cadeias markovianas gerada pelo programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) sob o modelo Admixture, avaliando $K = 1$ a 8 populações, mostrou a mais alta verossimilhança ($\ln PD$) em uma estrutura populacional de $K=3$, resultado que foi corroborado pela estimativa de Delta K (Fig. 05).

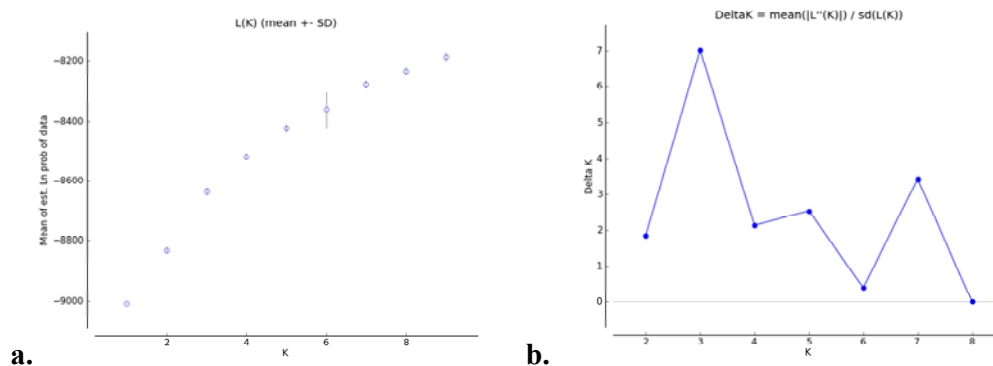


Fig.05. (a) Gráfico dos valores médios de \ln das probabilidades de cada K . (b) Valores de delta (K), segundo correção de Evanno et al. (2005), mostrando o maior valor de delta (K) para $K=3$.

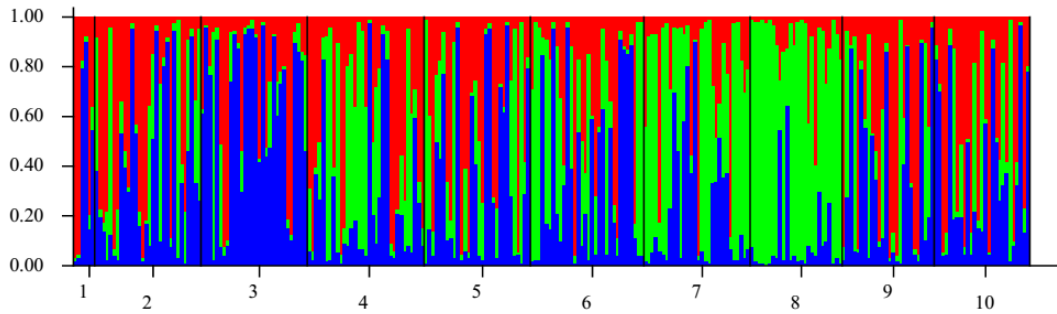


Fig. 06. Gráfico obtido com o programa STRUCTURE (K=3). Valor de (K) obtido segundo a correção de Evanno et al (2005) para as amostras de *P. lineatus*.

Os resultados obtidos para o teste de Mantel (Fig. 07), mostram uma débil relação entre a distância geográfica e os valores para o índice de fixação ($R^2=0,0169$) com valor de $P > 0,05$, não significativo, indicando que isolamento por distância é improvável de ter gerado o padrão de estrutura observado.

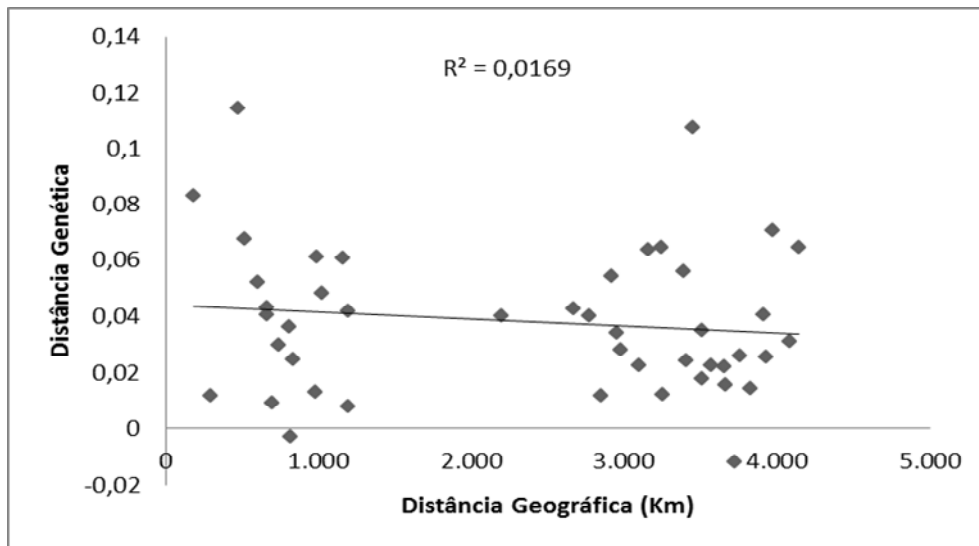


Fig.07. Gráfico obtido após teste de Mantel, relacionando distância genética e distância geográfica.

4.1.2. Região controladora do DNAm (D-loop)

Nas análises com o marcador D-Loop, foram utilizados 276 espécimes, divididos em onze grupos. O Apêndice 01 mostra a distribuição dos 141 haplótipos identificados nos grupos amostrais, sendo que o haplótipo 29, foi o mais compartilhado, ocorrendo em 12 indivíduos distribuídos em cinco grupos. Pelos resultados apresentados na Tabela xx é possível notar que, proporcionalmente ao número de indivíduos amostrados, o grupo Uruguai apresentou o menor número de haplótipos e sítios polimórficos (17 e 38, respectivamente), enquanto que o grupo Paraná I revelou os maiores valores (25 e 57, respectivamente). Os maiores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram detectados nos grupos Sucuriú e Coxim (0,99265 e 0,02329, respectivamente), enquanto que os menores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram verificados no grupo Uruguai (0,93103 e 0,0307, respectivamente).

Tabela 07. Número amostral (N), Número de Haplótipos (Nh), Diversidade Haplotípica, Número de Sítios Polimórficos e Diversidade Nucleotídica dos grupos formados pelas amostras de *P. lineatus*.

| Grupo | N | Nh | Diversidade Haplotípica | Nsp | Diversidade Nucleotídica |
|-------------------|----------|-----------|--------------------------------|------------|---------------------------------|
| Cuiabá | 11 | 10 | 0.98182 | 33 | 0.01818 |
| Coxim | 22 | 20 | 0.99134 | 54 | 0.02329 |
| Paraná I | 28 | 25 | 0.99206 | 57 | 0.01901 |
| Parapanema | 29 | 21 | 0.97537 | 50 | 0.01826 |
| Grande | 30 | 18 | 0.94253 | 37 | 0.1856 |
| Miranda | 26 | 19 | 0.97538 | 51 | 0.01976 |
| Paranaíba | 28 | 17 | 0.94444 | 40 | 0.01631 |
| Parana II | 30 | 23 | 0.97011 | 50 | 0.01588 |
| Sucuriú | 17 | 16 | 0.99265 | 45 | 0.01631 |
| Tietê | 26 | 17 | 0.96308 | 55 | 0.01908 |
| Uruguai | 29 | 17 | 0.93103 | 38 | 0.01356 |
| Total | 276 | 141 | 0.99017 | 111 | 0.01841 |

Segundo a análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 08), foi identificado que a maior fonte de variação está contida dentro dos grupos amostrais (95,7%). Ainda nesta análise, foi observado que a estimativa do índice de fixação interpopulacional F_{st} para todos os grupos foi de 0,04, valor este baixo para indicar uma estruturação genética populacional entre os grupos. Pela análise do F_{st} par a par (Tabela 09) foi possível identificar quais grupos são mais próximos e mais distantes entre si, sendo que o maior valor de F_{st} foi determinado na comparação entre os grupos Sucuriú e Uruguai (0,086) e o menor valor significativo entre os grupos Paranaíba e Grande (0,018).

Tabela 08. Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, entre os grupos de *P. lineatus*, utilizando marcador mitocondrial D-loop. (* $P < 0,05$)

| População | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes da variação | % da variação | FST |
|-----------|-----------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|-------|
| Grupos | Entre os grupos | 24.443 | 0.16346 | 2.44 | 0.04* |
| | Entre ind. dentro de grupos | 85.938 | 0.12469 | 1.86 | |
| | Dentro dos grupos | 1698.540 | 6.40959 | 95.7 | |
| Total | | 1808.920 | 6.69774 | | |

Para este marcador, também foram realizados os testes de neutralidade de D de Tajima e F_s de Fu. Para o teste D de Tajima, nenhum dos valores obtidos foi significativo e no teste F_s de Fu, apenas quatro valores apresentaram valores estatisticamente significativos e negativos, indicativo de um estado de expansão dos grupos (Tabela 10).

Tabela 09. Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par entre os grupos de *P. lineatus*, utilizando marcador mitocondrial D-loop.

(* = P < 0,05)

| | Cuiabá | Coxim | Paraná I | Paranapanema | Grande | Miranda | Paranaíba | Paraná II | Sucuriú | Tietê | Uruguai |
|--------------|--------|--------|----------|--------------|--------|---------|-----------|-----------|---------|-------|---------|
| Cuiabá | 0,000 | | | | | | | | | | |
| Coxim | -0.026 | 0,000 | | | | | | | | | |
| Paraná I | -0.017 | -0.001 | 0,000 | | | | | | | | |
| Paranapanema | 0.020 | 0.034* | 0.020* | 0,000 | | | | | | | |
| Grande | 0.037* | 0.060* | 0.025* | 0.015 | 0,000 | | | | | | |
| Miranda | 0.047 | 0.045* | 0.011 | 0.016 | 0.031* | 0,000 | | | | | |
| Paranaíba | -0.021 | -0.011 | -0.007 | -0.002 | 0.018* | 0.005 | 0,000 | | | | |
| Parana II | 0.056* | 0.067* | 0.028* | 0.052* | 0.027 | 0.062* | 0.037* | 0,000 | | | |
| Sucuriú | 0.028 | 0.027 | -0.005 | 0.039* | 0.058* | 0.041* | 0.021 | 0.068* | 0,000 | | |
| Tietê | 0.032* | 0.043* | 0.011 | 0.036* | 0.010 | 0.067* | 0.029* | 0.044* | 0.027 | 0,000 | |
| Uruguai | 0.036* | 0.049* | 0.042* | 0.036* | 0.003 | 0.079* | 0.025* | 0.047* | 0.086* | 0.010 | 0,000 |

Tabela 10. Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu) para os grupos de *P. lineatus*, com marcadores mitocondriais D-Loop. (* P < 0,05.)

| Grupo | D de Tajima | Valor de P | Fs de Fu | Valor de P |
|--------------|-------------|------------|-----------|------------|
| Cuiabá | -0.44815 | 0.36800 | -1.03268 | 0.21900 |
| Coxim | -0.47183 | 0.35900 | -2.94237 | 0.10800 |
| Paraná I | -1.05052 | 0.14800 | -8.51358* | 0.00200 |
| Paranapanema | -0.73771 | 0.24800 | -5.33432* | 0.03700 |
| Grande | 0.32959 | 0.72200 | -1.90769 | 0.27600 |
| Miranda | -0.65945 | 0.29300 | -1.26962 | 0.29900 |
| Paranaíba | -0.41593 | 0.39000 | -2.26391 | 0.19400 |
| Parana II | -1.10130 | 0.12900 | -8.43297* | 0.00300 |
| Sucuriú | -1.39043 | 0.06600 | -7.22577* | 0.00400 |
| Tietê | -0.97319 | 0.16000 | -2.04990 | 0.22700 |
| Uruguai | -0.79413 | 0.21500 | -3.07598 | 0.14900 |

A caracterização da expansão populacional com a análise de distribuição Mismatch (Fig. 08), mostra que os grupos apresentam uma distribuição unimodal, o que demonstra que as populações passaram por uma expansão demográfica recente ou há elevados níveis de migração entre grupos vizinhos (Excoffier, 2004).

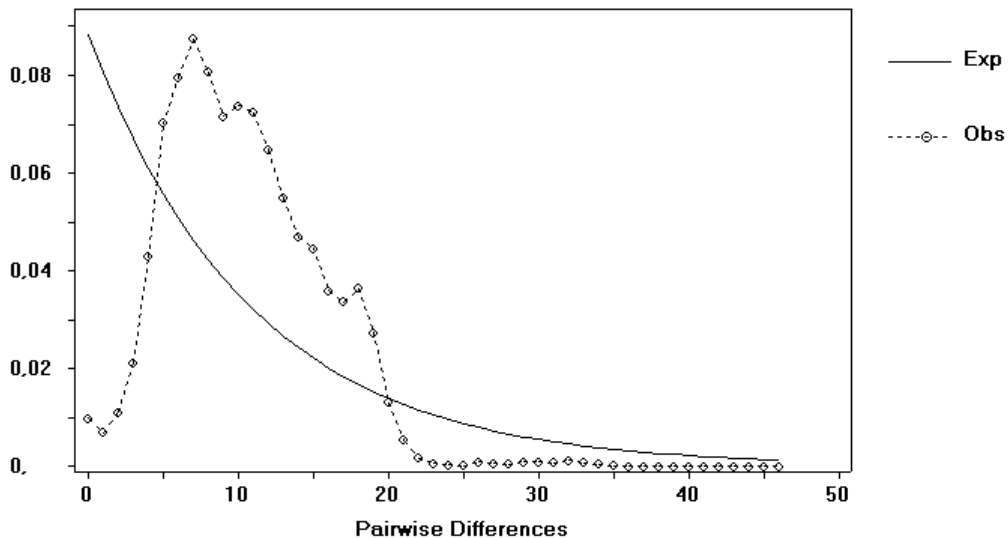


Fig. 08. Distribuição Mismatch usando a informação da região controle (D-loop) de *P. lineatus*.

4.2. Diversidade genética em *Prochilodus nigricans*

4.2.1. Microsatélites

Foram analisadas 199 amostras de *Prochilodus nigricans*, divididas em grupos, sendo cada grupo correspondente a um local amostrado (Tabela 02). Todos os *loci* analisados se mostraram polimórficos e em grande parte dos *loci* a heterozigosidade esperada apresentou valores superiores ou próximos dos valores de heterozigosidade observada. Os maiores valores de heterozigosidade observada foram observados no *locus* PI119 da amostra Iquitos (1,000) e os menores valores, nos *locus* PI09 e PI25 das amostras Araguaia, PI09 das amostras Madeira Montante, PI139 das amostras Purus e PI23 das amostras Tapajós (0,000) (Tabela 11). Mas, de uma forma geral, os valores de heterozigosidade observada mostraram-se satisfatórios, apresentando valores acima de 0,2, sendo que o maior valor de heterozigosidade média observada foi verificado nas amostras da localidade Iquitos (0,568) e o menor na localidade Araguaia (0,371) (Tabela 12).

O número de alelos (N_a) e o número de alelos privados foram estimados para cada *locus* e para cada ponto amostrado, sendo que as localidades que apresentaram o maior número de alelos foram Grande e Miranda com 26 alelos para o *locus* PI25, e o número de alelos privados (N_p), quando presentes, não ultrapassaram a dois dentro de uma amostra em um *locus*. Realizando-se um comparativo entre os grupos amostrados, o maior valor médio de alelos foram encontrados nos grupos Grande, Miranda e Paranaíba (12,222) e o menor no grupo Cuiabá (5,222), porém, o mesmo também possui o menor número de amostras entre os grupos. Em relação aos alelos privados o grupo Coxim apresentou o maior valor médio (0,778) e o grupo Cuiabá o menor (0,222) (Tabela 11).

O índice de fixação populacional (F_{is}), que avalia e fornece uma estimativa em relação à endogamia nas amostras analisadas, foi estimado, de modo que o maior valor absoluto obtido, foram para os grupos Araguaia (*loci* 09 e 25), Madeira Montante (*locus* P109), Tapajós (P123) e Purus (P1139) com o índice de 1,000 e o menor para o grupo Purus (*locus* P1216) com o índice de -0,571. Na comparação entre os grupos (Tabela 11), o maior valor de F_{is} foi obtido para o grupo Araguaia (0,513) e o menor valor para o grupo Purus (0,264). Todos os grupos analisados apresentaram valores positivos para o F_{is} , ou seja, todos os grupos apresentaram deficiência de heterozigotos, apresentando o índice médio final de 0,352 para todos os *loci* e os grupos analisados.

A hipótese nula (H_0) de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi aceita em 27 das 63 estimativas com valores significantes de $P > 0,005$ após correção de Bonferroni. Assim, foi verificada significância de desvio em 36 estimativas. Dessas, 28 estimativas estavam associadas à possível presença de alelos nulos (Tabela 11).

Tabela 11. Dados de nove *loci* microsatélites para cada grupo de *P. nigricans*. N = número de indivíduos; Na = número de alelos; Np = número de alelos privados; Ho = heterozigosidade observada; He = heterozigosidade esperada; FIS = índice de fixação (endogamia); HWE = valores probabilísticos de concordância com o equilíbrio de Hardy-Weinberg; * = $P \leq 0,005$ ajustados com a correção de Bonferroni; R = frequência de alelos nulos por *locus*.

| | <i>LOCI</i> | | | | | | | | |
|-------------------------|-------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | PI03 | PI09 | PI14 | PI23 | PI25 | PI119 | PI139 | PI190 | PI216 |
| Araguaia | | | | | | | | | |
| N | 20 | 17 | 20 | 15 | 10 | 17 | 12 | 13 | 12 |
| Na | 09 | 02 | 13 | 03 | 09 | 14 | 06 | 13 | 02 |
| Ne | 4,734 | 1,125 | 8,889 | 2,228 | 8,333 | 8,141 | 4,881 | 8,895 | 1,385 |
| I | 1,826 | 0,224 | 2,343 | 0,882 | 2,164 | 2,369 | 1,690 | 2,378 | 0,451 |
| Ho | 0,500 | 0,000 | 0,700 | 0,133 | 0,000 | 0,824 | 0,250 | 0,769 | 0,167 |
| He | 0,789 | 0,111 | 0,888 | 0,551 | 0,880 | 0,877 | 0,795 | 0,888 | 0,278 |
| Fis | 0,366 | 1,000 | 0,211 | 0,758 | 1,000 | 0,061 | 0,686 | 0,133 | 0,400 |
| HWE | 0,001* | 0,000* | 0,034 | 0,000* | 0,000* | 0,009 | 0,002* | 0,347 | 0,166 |
| R | 0,161 | 0,090 | 0,090 | 0,269 | 0,468 | - | 0,303 | - | - |
| Iquitos | | | | | | | | | |
| N | 30 | 29 | 30 | 27 | 25 | 28 | 25 | 27 | 26 |
| Na | 16 | 04 | 16 | 05 | 27 | 22 | 20 | 21 | 04 |
| Ne | 8,696 | 2,219 | 7,171 | 3,269 | 19,531 | 15,680 | 15,625 | 12,150 | 2,106 |
| I | 2,427 | 0,928 | 2,306 | 1,384 | 3,131 | 2,905 | 2,859 | 2,744 | 0,844 |
| Ho | 0,367 | 0,414 | 0,800 | 0,074 | 0,520 | 1,000 | 0,320 | 0,926 | 0,692 |
| He | 0,885 | 0,549 | 0,861 | 0,694 | 0,949 | 0,936 | 0,936 | 0,918 | 0,525 |
| Fis | 0,586 | 0,247 | 0,070 | 0,893 | 0,452 | -0,068 | 0,658 | -0,009 | -0,318 |
| HWE | 0,000* | 0,000* | 0,870 | 0,000* | 0,000* | 0,973 | 0,000* | 0,564 | 0,479 |
| R | 0,275 | - | - | 0,366 | 0,220 | - | 0,318 | - | - |
| Madeira Montante | | | | | | | | | |
| N | 30 | 19 | 30 | 23 | 14 | 29 | 29 | 30 | 24 |
| Na | 11 | 05 | 12 | 04 | 11 | 18 | 16 | 15 | 06 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ne | 4,511 | 2,270 | 7,895 | 2,200 | 7,127 | 12,101 | 7,897 | 9,231 | 1,641 |
| I | 1,911 | 1,129 | 2,228 | 0,951 | 2,193 | 2,674 | 2,357 | 2,448 | 0,862 |
| Ho | 0,633 | 0,000 | 0,600 | 0,130 | 0,071 | 0,862 | 0,621 | 0,800 | 0,292 |
| He | 0,778 | 0,873 | 0,873 | 0,545 | 0,860 | 0,917 | 0,873 | 0,892 | 0,391 |
| Fis | 0,186 | 1,000 | 0,313 | 0,761 | 0,917 | 0,060 | 0,289 | 0,103 | 0,253 |
| HWE | 0,018 | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,005* | 0,000* | 0,048 | 0,438 |
| R | 0,081 | 0,358 | 0,145 | 0,268 | 0,423 | - | 0,134 | - | - |
| Madeira | | | | | | | | | |
| Jusante | | | | | | | | | |
| N | 30 | 24 | 30 | 21 | 25 | 29 | 29 | 30 | 26 |
| Na | 11 | 09 | 13 | 02 | 21 | 21 | 20 | 12 | 04 |
| Ne | 4,737 | 3,945 | 5,714 | 1,849 | 9,766 | 11,681 | 8,087 | 7,143 | 1,218 |
| I | 1,858 | 1,688 | 2,016 | 0,652 | 2,703 | 2,743 | 2,551 | 2,152 | 0,408 |
| Ho | 0,533 | 0,292 | 0,733 | 0,048 | 0,520 | 0,897 | 0,552 | 0,800 | 0,192 |
| He | 0,789 | 0,747 | 0,825 | 0,459 | 0,898 | 0,914 | 0,876 | 0,860 | 0,179 |
| Fis | 0,324 | 0,609 | 0,111 | 0,896 | 0,421 | 0,020 | 0,370 | 0,070 | -0,074 |
| HWE | 0,001* | 0,000* | 0,003* | 0,000* | 0,000* | 0,358 | 0,000* | 0,066 | 1,000 |
| R | 0,142 | 0,260 | - | 0,282 | 0,199 | - | 0,173 | - | - |
| Manaus | | | | | | | | | |
| N | 38 | 38 | 38 | 34 | 24 | 38 | 32 | 37 | 29 |
| Na | 12 | 04 | 14 | 07 | 19 | 22 | 21 | 21 | 04 |
| Ne | 7,386 | 1,824 | 6,732 | 4,498 | 7,529 | 13,248 | 13,474 | 10,178 | 2,288 |
| I | 2,164 | 0,846 | 2,185 | 1,678 | 2,501 | 2,771 | 2,794 | 2,648 | 0,987 |
| Ho | 0,553 | 0,263 | 0,868 | 0,294 | 0,375 | 0,816 | 0,313 | 0,892 | 0,552 |
| He | 0,865 | 0,452 | 0,851 | 0,778 | 0,867 | 0,925 | 0,926 | 0,902 | 0,563 |
| Fis | 0,361 | 0,418 | -0,020 | 0,622 | 0,568 | 0,118 | 0,662 | 0,011 | 0,020 |
| HWE | 0,004* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 0,000* | 1,000 | 0,000* |
| R | 0,167 | 0,130 | - | 0,272 | 0,263 | 0,056 | 0,318 | - | - |
| Purus | | | | | | | | | |
| N | 30 | 24 | 30 | 19 | 21 | 29 | 4 | 19 | 27 |
| Na | 05 | 04 | 04 | 02 | 21 | 06 | 4 | 07 | 04 |

| | | | | | | | | | |
|----------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Ne | 1,321 | 2,992 | 1,357 | 1,170 | 16,036 | 2,744 | 4,000 | 2,208 | 2,303 |
| I | 0,554 | 1,154 | 0,525 | 0,276 | 2,902 | 1,291 | 1,386 | 1,251 | 0,954 |
| Ho | 0,233 | 0,542 | 0,300 | 0,053 | 0,810 | 0,517 | 0,000 | 0,053 | 0,889 |
| He | 0,243 | 0,666 | 0,263 | 0,145 | 0,938 | 0,636 | 0,750 | 0,547 | 0,566 |
| Fis | 0,039 | 0,186 | -0,139 | 0,638 | 0,137 | 0,186 | 1,000 | 0,904 | -0,571 |
| HWE | 0,150 | 0,000* | 0,988 | 0,005* | 0,161 | 0,000* | 0,062 | 0,000* | 0,022 |
| R | - | - | - | 0,081 | 0,066 | - | 0,428 | 0,319 | - |
| Tapajós | | | | | | | | | |
| N | 18 | 14 | 13 | 7 | 11 | 16 | 11 | 14 | 16 |
| Na | 10 | 11 | 09 | 2 | 12 | 13 | 13 | 14 | 05 |
| Ne | 3,224 | 6,323 | 5,541 | 1,324 | 8,643 | 8,678 | 11,524 | 9,333 | 2,977 |
| I | 1,668 | 2,131 | 1,915 | 0,410 | 2,323 | 2,334 | 2,500 | 2,434 | 1,300 |
| Ho | 0,389 | 0,429 | 0,769 | 0,000 | 0,818 | 0,563 | 0,545 | 0,643 | 0,563 |
| He | 0,690 | 0,842 | 0,820 | 0,245 | 0,884 | 0,885 | 0,913 | 0,893 | 0,664 |
| Fis | 0,436 | 0,491 | 0,061 | 1,000 | 0,075 | 0,364 | 0,403 | 0,280 | 0,153 |
| HWE | 0,014 | 0,001* | 0,549 | 0,008 | 0,377 | 0,007 | 0,046 | 0,138 | 0,000* |
| R | 0,178 | 0,224 | - | 0,196 | - | 0,171 | 0,192 | 0,132 | - |

Tabela 12. Índices de diversidade genética intrapopulacional obtidos com marcadores microssatélites para os grupos selvagens de *P. nigricans*. * = $P \leq 0,005$ ajustados com a correção de Bonferroni. (N_a = número de alelos; N_e = número de alelos efetivos; H_0 = heterozigosidade observada; H_e = heterozigosidade esperada; F_{is} = Índice de endogamia)

| GRUPOS | N_a | N_e | H_0 | H_e | F_{is} |
|--------------------|--------|-------|-------|-------|----------|
| Araguaia | 7,889 | 5,401 | 0,371 | 0,673 | 0,513 |
| Iquitos | 15,000 | 9,605 | 0,568 | 0,806 | 0,279 |
| Madeira M | 10,889 | 6,097 | 0,446 | 0,743 | 0,431 |
| Madeira J | 12,556 | 6,015 | 0,507 | 0,727 | 0,305 |
| Manaus | 13,778 | 7,462 | 0,547 | 0,792 | 0,307 |
| Purus | 6,333 | 3,792 | 0,547 | 0,792 | 0,264 |
| Tapajós | 9,889 | 6,396 | 0,524 | 0,759 | 0,363 |
| Média Total | 10,905 | 6,396 | 0,477 | 0,718 | 0,352 |

O índice de diferenciação genética F_{st} (baseado no modelo de mutação IAM) entre os grupos de *P. nigricans* para todos os *loci*, mostrou uma possível divergência entre os grupos analisados. Pela análise do F_{st} par a par (Tabela 13), é possível verificar que os valores maior e menor de divergência entre os grupos estão na comparação entre os grupos Araguaia e Purus (0,393) e Iquitos e Madeira Jusante (0,023), respectivamente. O grupo Purus apresentou altos índices, quando comparado com todos os outros grupos analisados, apresentando o índice de fixação interpulacional sempre acima de 0,25.

Tabela 13. Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par entre os grupos de *P. nigricans* com marcadores microssatélites. (* = $P < 0,05$)

| | Araguaia | Iquitos | Madeira M | Madeira J | Manaus | Purus | Tapajós |
|-----------|----------|---------|-----------|-----------|--------|--------|---------|
| Araguaia | 0,000 | | | | | | |
| Iquitos | 0.044* | 0,000 | | | | | |
| Madeira M | 0.092* | 0.031* | 0,000 | | | | |
| Madeira J | 0.089* | 0.023* | 0.016 | 0,000 | | | |
| Manaus | 0.038* | 0.010 | 0.026* | 0.014 | 0,000 | | |
| Purus | 0.393* | 0.278* | 0.369* | 0.324* | 0.321* | 0,000 | |
| Tapajós | 0.056* | -0.012 | 0.041* | 0.010 | 0.009 | 0.264* | 0,000 |

Pela análise de variância molecular (AMOVA) foi possível identificar que a maior fonte de variação está presente dentro dos grupos (87,60%). Apesar da maior parte desta variação ser atribuída a variabilidade genética presente dentro de cada grupo, o valor atribuído ao índice de fixação interpopulacional ($F_{st} = 0,12$) é considerado médio, indicando grupos com indício de estruturação genética entre os sete grupos amostrados (Tabela 14), porém ressaltando que o grupo Purus foi o principal responsável por elevar o índice para esse marcador.

Tabela 14. Análise da variância molecular (AMOVA) e F_{st} , entre os grupos de *P. nigricans*, com marcadores microssatélites. * $P < 0,05$

| População | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes da variação | % da variação | F_{st} |
|-----------|-----------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|----------|
| Grupos | Entre os grupos | 5,244 | 0,00804 | 0,98 | 0,12* |
| | Entre ind. dentro de grupos | 31,320 | 0,09359 | 11,42 | |
| | Dentro dos grupos | 280,680 | 0,71785 | 87,60 | |
| Total | | 317,244 | 0,81948 | 100 | |

A análise bayesiana realizada por iterações de cadeias markovianas gerada pelo programa STRUCTURE sob o modelo Admixture, avaliando $K = 1$ a 9 populações, mostrou a mais alta verossimilhança ($\ln PD$) em uma estrutura populacional de $K=2$, resultado que foi corroborado pela estimativa delta de K (Fig. 09)

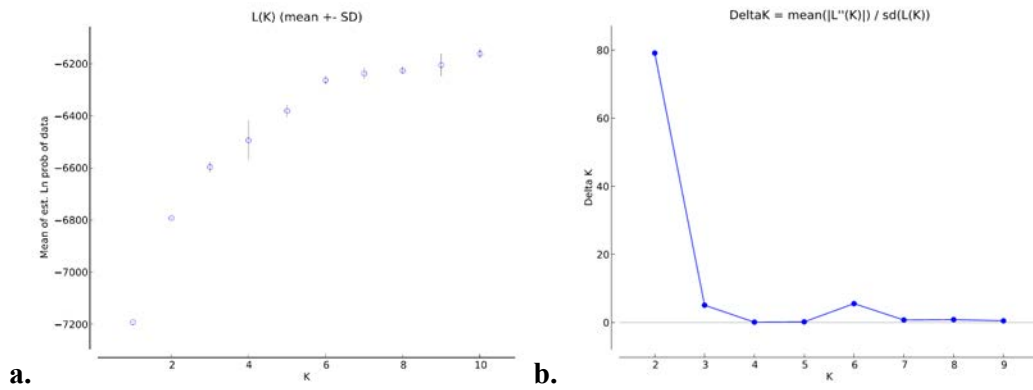


Fig.09. (a) Gráfico dos valores médios de Ln das probabilidades de cada K. (b) Valores de delta (K), segundo correção de Evanno et al. (2005), mostrando o maior valor de delta (K) para K=2.

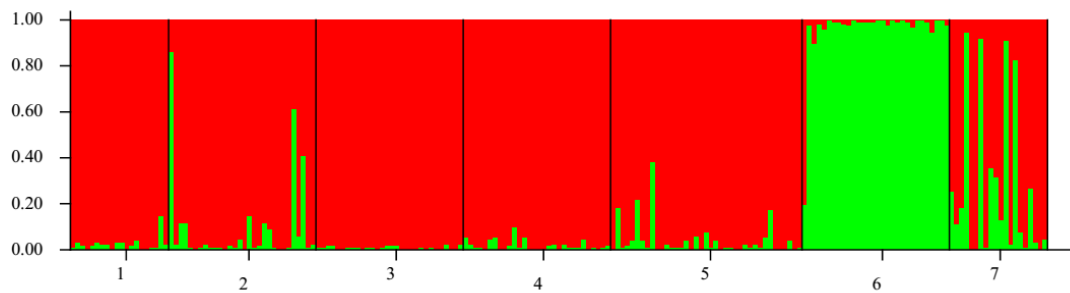


Fig. 10. Gráfico obtido com o programa STRUCTURE (K=2). Valor de (K) obtido segundo a correção de Evanno et al (2005) para as amostras de *P. nigricans*.

Os resultados obtidos para o teste de Mantel (Fig. 11), mostram uma débil relação entre a distância geográfica e os valores para o índice de fixação ($R^2=0,0277$) com valor de $P=0,05$, não significativo, indicando que isolamento por distância é improvável de ter gerado o padrão de estrutura observado.

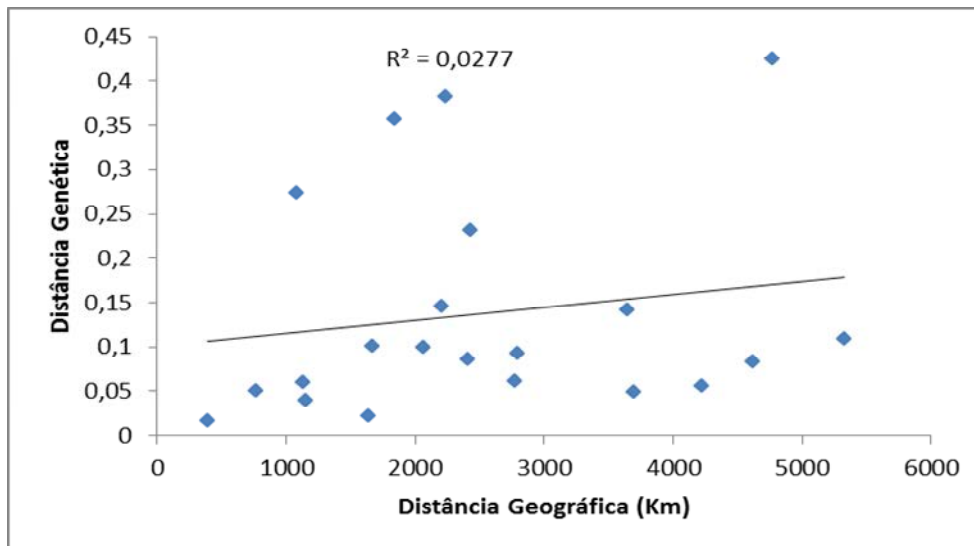


Fig.11. Gráfico obtido após teste de Mantel, relacionando distância genética e distância geográfica.

4.2.2. Região controladora do DNAm (D-loop)

Nas análises com o marcador D-Loop, foram utilizados 155 espécimes, divididos em sete grupos. O Apêndice 02 mostra a distribuição dos 68 haplótipos identificados nos grupos amostrais, sendo que o haplótipo 09, foi o mais compartilhado, ocorrendo em 48 indivíduos distribuídos em quatro grupos. Pelos resultados apresentados na Tabela 14 é possível notar que, proporcionalmente ao número de indivíduos amostrados, o grupo Purus apresentou o menor número de haplótipos e sítios polimórficos (08 e 07, respectivamente), enquanto que o grupo Madeira Montante revelou os maiores valores (17 e 43, respectivamente). Os maiores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram detectados no grupo Madeira Montante (0,97403 e 0,02493, respectivamente), enquanto que os menores valores de diversidade haplotípica e nucleotídica foram verificados no grupo Purus (0,79435 e 0,00216, respectivamente).

Tabela 14. Número amostral (N), Número de Haplótipos (Nh), Diversidade Haplótipica, Número de Sítios Polimórficos e Diversidade Nucleotídica dos grupos formados pelas amostras de *P. nigricans*.

| Grupo | N | Nh | Diversidade Haplótipica | Nsp | Diversidade Nucleotídica |
|------------------|----------|-----------|--------------------------------|------------|---------------------------------|
| Araguaia | 07 | 06 | 0.95238 | 11 | 0.00746 |
| Iquitos | 29 | 16 | 0.87931 | 27 | 0.00779 |
| Madeira M | 22 | 17 | 0.97403 | 43 | 0.02493 |
| Madeira J | 28 | 16 | 0.91270 | 41 | 0.02302 |
| Manaus | 30 | 12 | 0.82069 | 14 | 0.00422 |
| Purus | 32 | 08 | 0.79435 | 07 | 0.00216 |
| Tapajós | 07 | 05 | 0.90476 | 30 | 0.01900 |
| Total | 155 | 68 | 0.94160 | 75 | 0.02280 |

Segundo a análise de variância molecular (AMOVA) (Tabela 15), foi identificado uma divisão bem evidente da fonte de variação, onde a maior percentagem de variação foi encontrada dentro dos grupos amostrais (39,61%%), porém muito próximo dos valores obtidos pelas outras fontes de variação. Ainda nesta análise, foi observado que a estimativa do índice de fixação interpopulacional F_{st} para todos os grupos foi de 0,6, valor extremamente alto, e que indica uma alta estruturação genética populacional entre os grupos. Pela análise do F_{st} par a par (Tabela 16) foi possível identificar quais grupos são mais próximos e mais distantes entre si, sendo que o maior valor de F_{st} foi determinado na comparação entre os grupos Araguaia e Purus (0,882) e o menor valor significativo entre os grupos Madeira Montante e Tapajós (0,149).

Tabela 15. Análise da variância molecular (AMOVA) e FST, entre os grupos de *P. nigricans*, utilizando marcador mitocondrial D-loop. (* P < 0,05)

| População | Fonte de variação | Soma dos quadrados | Componentes da variação | % da variação | FST |
|-----------|-----------------------------|--------------------|-------------------------|---------------|------|
| Grupos | Entre os grupos | 73.056 | 3.15410 | 29.25 | 0.60 |
| | Entre ind. dentro de grupos | 425.639 | 3.35728 | 31.13 | |
| | Dentro dos grupos | 632.214 | 4.27172 | 39.61 | |
| Total | | 1130.910 | 10.78310 | | |

Tabela 16. Índices de Fixação Interpopulacional (FST) par a par entre os grupos de *P. nigricans*, utilizando marcador mitocondrial D-loop. (* = P < 0,05)

| | Madeira M | Madeira J | Manaus | Iquitos | Tapajós | Purus | Araguaia |
|-----------|-----------|-----------|--------|---------|---------|--------|----------|
| Madeira M | 0,000 | | | | | | |
| Madeira J | -0.012 | 0,000 | | | | | |
| Manaus | 0.187* | 0.273* | 0,000 | | | | |
| Iquitos | 0.173* | 0.256* | 0.004 | 0,000 | | | |
| Tapajós | 0.149* | 0.191* | 0.651* | 0.644* | 0,000 | | |
| Purus | 0.523* | 0.602* | 0.780* | 0.781* | 0.813* | 0,000 | |
| Araguaia | 0.363* | 0.463* | 0.730* | 0.731* | 0.557* | 0.882* | 0,000 |

Para este marcador, também foram realizados os testes de neutralidade de D de Tajima e Fs de Fu. Para o teste D de Tajima, nenhum dos valores obtidos foi significativo e no teste Fs de Fu, apenas um grupo apresentou valor estatisticamente significativo e negativo, indicativo de um estado de expansão do grupo (Tabela 17).

Tabela 17. Valores dos testes de neutralidade (D de Tajima e FS de Fu) para os grupos de *P. nigricans*, com marcadores mitocondriais D-Loop. (* P < 0,05.)

| Grupo | D de Tajima | Valor de P | Fs de Fu | Valor de P |
|------------------|-------------|------------|-----------|------------|
| Araguaia | -0.47530 | 0.33200 | -1.54035 | 0.13600 |
| Iquitos | -1.36331 | 0.07600 | -2.98689 | 0.12300 |
| Madeira M | 0.62875 | 0.79100 | -1.10668 | 0.30900 |
| Madeira J | 0.74480 | 0.82800 | -0.25511 | 0.51300 |
| Manaus | -1.15107 | 0.14900 | 0.26693 | 0.60200 |
| Purus | -0.92526 | 0.18900 | -3.11008* | 0.03000 |
| Tapajós | -0.84630 | 0.25400 | 1.75387 | 0.77700 |

Ao contrário dos testes de neutralidade, a caracterização da expansão populacional com a análise de distribuição Mismatch (Fig. 11), mostra que os grupos apresentam uma distribuição multimodal, característica de populações em equilíbrio demográfico (Schneider et al., 2000). Essa diferença pode indicar que a população pode ter passado por uma expansão recente, porém passa por um momento de estabilidade em seu tamanho populacional.

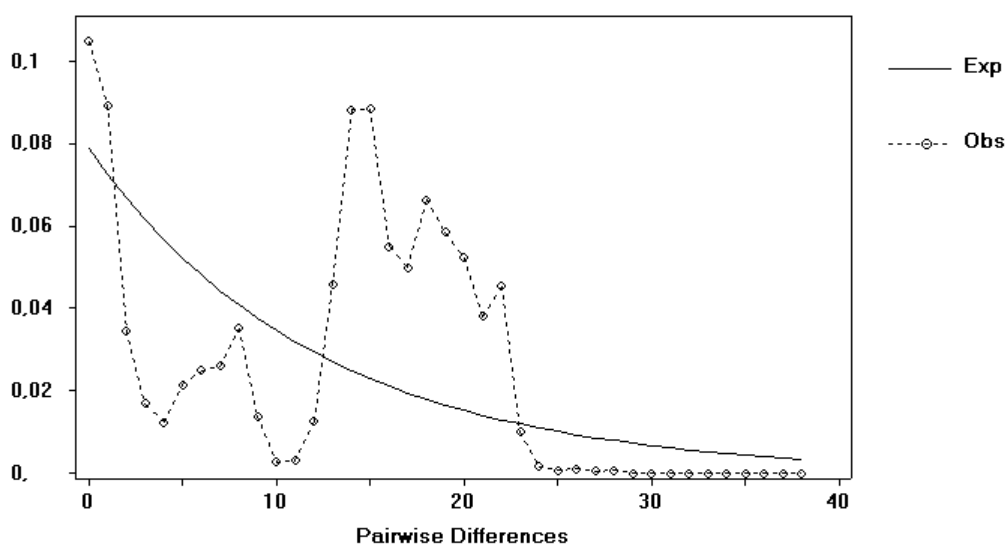


Fig. 11. Distribuição Mismatch usando a informação da região controle (D-loop) de *P. nigricans*.

5. DISCUSSÃO

Estudos da diversidade genética de diversas espécies de peixes têm sido realizados com diferentes classes de marcadores moleculares e os resultados obtidos indicando diferentes níveis de variabilidade entre as classes de marcadores refletem um equilíbrio entre as taxas de mutação e deriva genética. Neste sentido, as taxas de mutação para marcadores microssatélites são estimadas entre 10^{-3} e 10^{-4} por *locus* por geração, enquanto para marcadores D-loop essas taxas tem valores de 10^{-5} a 10^{-9} por geração (Lougheed *et al.*, 2000). Com base nisso, marcadores moleculares hipervariáveis como microssatélites e a região controladora do DNAm (D-loop) são úteis nos estudos que visam estimar a variabilidade e a estrutura genética dos componentes populacionais de uma espécie (Brown, 1986; Excoffier *et al.*, 1992). Alguns fatores devem ser considerados para a escolha dos marcadores moleculares utilizados em um estudo genético populacional, sendo que para este estudo foram selecionados dois marcadores com características e alvos distintos (um nuclear e outro mitocondrial). Por se tratar de um marcador molecular co-dominante e apresentar alta taxa evolutiva, os microssatélites foram escolhidos para a análise da variabilidade e estrutura genética populacional dos grupos de curimatá na Bacia do Prata e Amazônica. Segundo Selkoe e Toonen (2006), cada *locus* microssatélite pode ser considerado uma amostra do genoma. Devido à recombinação, seleção e deriva genética, genes e regiões diferentes do genoma têm histórias genealógicas ligeiramente diferentes, sendo que o uso de um único *locus*, ou poucos *loci*, pode determinar uma alta taxa de erro na estimativa das características populacionais. Assim, a análise de múltiplas amostras do genoma, pela combinação dos resultados de muitos *loci*, pode fornecer uma maneira mais precisa e estatisticamente mais poderosa de comparar populações e indivíduos.

5.1. Caracterização da estrutura populacional de *P. lineatus*

5.1.1. Microsatélites

Em peixes, o número de alelos por *locus* é bastante variável. Em truta, *Oncorhynchus mykiss*, altos números de alelos para *loci* microsatélites (média de 24,5 alelos por *locus*) já foram relatados (Narum *et al.*, 2004). Em espécies neotropicais, como *Brycon opalinus*, Barroso *et al.* (2003) encontraram média de 23,1 alelos por *locus*. Em *Prochilodus argenteus* o valor médio de alelos por *locus* foi 12,4 (Hatanaka *et al.*, 2006), enquanto Sanches (2007) encontrou apenas 5,91 alelos por *locus* na espécie *B. hilarii*. Outro estudo realizado em *Piaractus mesopotamicus*, evidenciou uma média de 8,5 alelos por *locus* (Calcagnotto e DeSalle, 2009).

No presente estudo, a espécie *P. lineatus* revelou uma média de número de alelos de 10,55 por *locus*, valor esse, próximos aos relatados por Rueda *et al.* (2013), também analisando *P. lineatus*, que encontrou uma média de alelos de 13,1, utilizando os mesmos *loci* microsatélites.

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados em 8 dos 9 *loci* analisados em pelo menos um grupo amostral, e os índices de heterozigosidade encontradas no presente estudo (0,491 –0,680) foram similares àqueles encontrados por Rueda *et al.* (2011) no trabalho de caracterização dos *loci* microsatélites e similares aos encontrados por Barbosa *et al.* (2008) e Melo *et al.* (2013) no estudo de outras espécies do gênero *Prochilodus*. Mesmo sendo valores similares a outros estudos, os valores de heterozigosidade observados foram menores que o esperado (F_{IS} positivo) em todos os grupos, sugerindo assim uma deficiência de heterozigotos.

Essa deficiência de heterozigotos é bastante comum em peixes e tem sido comumente relatados em estudos com populações naturais e diversos fatores podem explicar estes déficits, incluindo o efeito de Wahlund, endogamia, a presença de alelos nulos e alelos *drop-out*, erros de genotipagem e erros amostrais, além de acasalamento não aleatório (Broughton *et al.*, 2002; Narum *et al.*, 2004; Barroso *et al.*, 2005; Balding, 2006; Hatanaka *et al.*, 2006; Chapuis e Estoup, 2007; Calcagnotto e DeSalle, 2009; Morin *et al.* 2009).

O efeito de Wahlund diz respeito sobre a frequência de homozigotos em populações subdivididas, ou seja, quando duas ou mais populações são fusionadas em uma amostragem, o número de homozigotos tende a ser maior que o número de heterozigotos nesta nova população (uma amostragem é tida como uma única população, mas na verdade ela pode conter várias populações). Deste modo, desvios no EHW com déficits de heterozigotos podem ser indicativos deste efeito e sugerirem uma possível subdivisão populacional na amostragem (Ridley, 2006).

No caso dos alelos nulos, o conceito foi primeiramente introduzido por Callen *et al.* (1993), quando estes demonstraram que uma deleção de 8pb em um sítio de ligação de *primers* microssatélites, era a responsável pela não amplificação de marcadores com repetições (AC)_n, implicando em exclusão de paternidade em humanos, uma vez que não seria possível a identificação de um dos alelos. Na genética de populações a presença de alelos nulos tem sido comumente relatada e pode interferir em estimativas de variabilidade genética e distâncias genéticas, além de outras inferências sobre a estrutura genética de populações (Falush *et al.*, 2003; Chapuis e Estoup, 2007).

No presente trabalho, o déficit de heterozigotos observado para maioria dos *loci* analisados pode estar relacionado com alguns desses fatores, preferencialmente os

alelos nulos, já que os alguns *loci* analisados apresentaram valores de frequências para presença destes alelos relativamente altos e geralmente associados a índices significantes de desequilíbrio de Hardy-Weinberg. Como foi observado um possível indício de estruturação genética nos grupos Coxim e Cuiabá pelos dados de microssatélites, o efeito de Wahlund, pode ser também, um dos responsáveis pelo índice de heterozigosidade obtida nesses grupos.

Estudos de diferenciação populacional em peixes vêm sendo realizados para a identificação e manejo de diferentes pools genéticos. Segundo Laikre *et al.* (2005), a diferenciação populacional pode ocorrer sob diferentes formas (desde populações geneticamente distintas até populações panmíticas) e deste modo, a unidade básica de conservação seria representada por um grupo geneticamente homogêneo de indivíduos, como por exemplo, a existência de diferentes populações locais.

No presente estudo, os valores de diferenciação gênica e genotípica, baseados nas frequências alélicas e genotípicas observadas, indicaram uma possível diferenciação genética entre alguns grupos analisados. A partir dessa indicação de diferenciação, os valores de F_{ST} encontrados entre pares de populações variaram de 0,014 (Grande x Paranaíba) e 0,142 (Coxim x Grande), estes significantes após a correção de Bonferroni ($P \leq 0.005$). Pode-se observar, que o grupo Coxim, ao ser comparado com todos os outros grupos, apresentou índices não inferiores a 0,094 e o grupo Cuiabá obteve índices que variaram de 0,034 à 0,108. Todos os outros grupos quando comparados, apresentaram índices inferiores à 0,054.

De acordo com Wright (1978), índices F_{ST} com valores abaixo de 0,05 indicam pequena diferenciação genética; entre 0,05 e 0,15, moderada diferenciação; entre 0,15 e 0,25, grande diferenciação; e valores acima de 0,25, diferenciação muito elevada. Deste

modo, parece existir uma diferenciação moderada nos grupos Coxim e Cuiabá, muito mais evidente no grupo Coxim. Nos outros grupos amostrais, os valores de F_{ST} , sugerem pouco ou nenhuma estruturação genética.

Apesar disso, as análises de AMOVA demonstram que entre os grupos (Coxim e Cuiabá x todos os outros grupos) há pouca variação (0,35%) e que a maior percentagem de variação, está mesmo dentro dos grupos (96,42%) sugerindo pouca ou nenhuma diferenciação entre eles. Isto reforça a idéia de que os grupos amostrais formam na realidade, um grupo não estruturado ou em início de estruturação.

Na última década, muitos estudos genético-populacionais passaram a utilizar o Structure (Pritchard *et al.*, 2000) para realizar inferências sobre o grau de estruturação ou diferenciação genética entre populações com base em dados moleculares.

No entanto, níveis claros de diferenciação genética, nem sempre são obtidos através de análises realizadas neste programa. Martien *et al.* (2007), por exemplo, ao estudar baleias nos mares do ártico mostraram que o programa identificou apenas um único estoque para esta região. Entretanto, segundo os pesquisadores, há pelo menos dois estoques notadamente diferentes, apresentados em estudos anteriores e comprovados em análises baseadas em F_{st} . Latch *et al.* (2006), em seu estudo simulado, demonstrou que a habilidade de inferir corretamente o número K de populações pelo programa Structure está diretamente associada aos valores de F_{ST} , ou seja, quanto maiores estes valores, melhores as inferências. Os autores apontam ainda que para valores de F_{st} próximos de 0,01 o programa não detecta nenhuma estruturação, e que para valores maiores que 0,03 as estimativas de K e ΔK são mais precisas.

Após análises no STRUCTURE, e serem realizadas correções de Evanno *et al.* (2005), os índices sugeriram a existência de três populações.

5.1.2. Região controladora do DNAm (D-loop)

O marcador mitocondrial D-loop também foi utilizado para este estudo, tendo em vista sua herança materna e por apresentar maior taxa evolutiva que os demais genes mitocondriais. O primer *forward* utilizado foi o descrito no trabalho de Sivasundar (2001), desenvolvido para a espécie *Prochilodus lineatus*. A fim de se obter um fragmento menor que aquele analisado por Sivasundar, foi desenvolvido outro primer *reverse*, mais interno, cujo fragmento resultante da amplificação deste conjunto fosse uma região menor, mais fácil de ser amplificada e que ainda contemplasse a porção inicial mais polimórfica da região controladora do DNA mitocondrial (Brown, 1986; DeWoody e Avise, 2000).

De forma geral, considerando todos os grupos analisados, foram encontrados 141 haplótipos em 276 amostras analisadas, e os índices de diversidade haplotípica ficaram todos acima de 0,93. Valores esses, semelhantes aos encontrados em trabalhos como os de Martins *et al.* (2003) que apresentou 32 haplótipos e diversidade haplotípica variando de 0,848 a 1,00 para *Leporinus elongatus* do rio Paraná; e de Garcez *et al.* (2011) que estimou 46 haplótipos em 141 indivíduos amostrados e diversidade haplotípica de 0,555 a 0,941 em *Prochilodus lineatus* do Alto Paraná.

Quando considerada a análise inter-populacional entre amostras dos grupos de *P. lineatus*, o valor global de F_{st} obtido foi de 0,04, muito próximo ao valor obtido pelos microssatélites (0,03). Quando o índice (F_{ST}) foi analisado par a par, o grupo Coxim que

havia apresentado índices que representavam estruturação moderada quando comparado com todos os outros grupos analisados, utilizando marcadores microssatélites, neste, apresentou índices mais baixos em todas as comparações, sendo significativo e representando uma estruturação moderada somente quando comparado com os grupos Grande (0,060) e Paraná II (0,067); o grupo Cuiabá, que também havia apresentado índices de estruturação moderada em muitas comparações, neste caso também apresentou índices mais baixos e só apresentou este tipo de estruturação quando comparado ao grupo Paraná II (0,056). Na análise de variância molecular (AMOVA), os dados de D-loop corroboraram os resultados obtidos por Garcez *et al.* (2011), bem como os de microssatélites do presente estudo determinando que a maior fonte de variação da espécie é encontrada dentro dos grupos (95,7%).

5.1.3. Estrutura Populacional em *P. lineatus*

Uma característica muito importante de conectividade genética em populações de peixes é a mobilidade, na medida em que as espécies caracterizadas por uma grande mobilidade tendem a apresentar níveis menos complexos de estrutura da populacional (Ward *et al.*, 1994). No entanto, outros fatores, além da mobilidade podem influenciar as taxas de fluxo gênico e estrutura da população, tais como a presença de barreiras físicas ou ecológicas; traços comportamentais (por exemplo, filopatria); história de vida; fluxo gênico ligado ao sexo e dispersão (no caso de marcadores genéticos de transmissão uniparental); pressões seletivas diferenciais entre DNA mitocondrial e nuclear, eventos demográficos que perturbam o equilíbrio entre fluxo gênico, deriva genética e distância geográfica entre sub-populações (Avice, 1994).

Sivasundar *et al.* (2001), em estudos anteriores de *P. lineatus* utilizando marcadores mitocondriais, detectaram altos níveis de variabilidade genética e fluxo gênico através da Bacia do Paraná. Resultados semelhantes foram obtidos por Turner *et al.* (2004), Moyer *et al.* (2005), Piorski (2010) e Aguirre-Pabón *et al.* (2013), em espécies do mesmo gênero, *P. mariae*, *P. robrotaeniatus*, *P. lacustris* e *P. madaglenae*.

Em contraste a isso, no presente estudo, evidenciado por dois tipos de marcadores moleculares, um possível indício de estruturação genética foi detectado para os grupos Cuiabá e Coxim. Considerando-se somente os grupos pertencentes à Bacia do Alto Paraná, os dados corroborariam os estudos já realizados por Sivasundar *et al.* (2001) e Garcez *et al.* (2011), porém como a amplitude da amostragem do presente estudo foi mais abrangente, englobando boa parte dos tributários e rios que formam a bacia em questão, a possibilidade de um melhor entendimento da estrutura populacional de *P. lineatus* torna-se possível.

Rueda *et al.* (2013), utilizando os mesmos *loci* microssatélites encontrou evidências de estruturação populacional sazonal no baixo rio Uruguai em *P. lineatus*, destacando a presença de pelo menos três estoques em três épocas distintas, evidenciando que essa região funcionaria como área de alimentação e depois os cardumes seguiriam para outras regiões.

Como essa espécie é considerada migradora de grandes distâncias, podendo migrar por mais de 1000 Km, e não há registros de diferenças no padrão de migração entre os sexos segundo Agostinho *et al.* (2003), e por viver em uma região que sofre grandes impactos antrópicos tais como hidrelétricas e grandes plantações, além de ser uma espécie que é muito utilizada em peixamentos, poderia se pensar que a diversidade genética das populações poderia estar fortemente afetada. No entanto, apesar do índice

de heteroziguidade encontrada estar um pouco baixa, a riqueza alélica e diversidade haplotípica se mostraram satisfatórios, assim como encontrado por Garcez *et al.* (2011) e Lopera-Barrero *et al.* (2013).

Após realização do teste de Mantel, não foi encontrada relação significativa entre distância geográfica e divergências genéticas estimadas pelo *F_{st}*. Essa relação não significativa, pode ocorrer por alguns motivos; um deles seria o fato de realmente essa espécie, por ser uma grande migradora, poder transpor grandes distâncias e manter o fluxo genético ao longo de toda a bacia; outro fator, seria o manejo incorreto por parte de empresas que realizam programas de repovoamento ao longo da bacia nas últimas décadas, que poderiam estar misturando os estoques de diferentes localidades, e não levando em consideração o *pool* gênico que cada população poderia ter, fazendo com que pudesse estar ocorrendo um fluxo genético por ação antrópica.

Esta situação distorceria a história evolutiva das populações naturais a ponto de reduzir processos evolutivos de fixação de alelos de centenas de anos, há poucas décadas (Aguirre-Pabón, 2013).

5.2. Caracterização da estrutura populacional de *P. nigricans*

5.2.1. Microssatélites

Considerando a grande diversidade biológica registrada na região amazônica e a importância do recurso íctico nesta área, um aumento dos estudos da variabilidade genética de diversas espécies de peixes amazônicos tem acontecido nos últimos anos, principalmente aquelas que constituem uma unidade de exploração comercial.

Segundo DeWoody & Avise 2000 e Oliveira *et al.* 2009, a variabilidade genética encontrada para peixes de água doce tem uma média de 9,1 alelos por *locus*. No presente estudo, em *Prochilodus nigricans*, a média de alelos encontrados foi de 10,905, muito similar ao encontrado neste mesmo estudo em *P. lineatus* (10,50).

Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados em todos os *loci* analisados em pelo menos um grupo amostral, e os índices de heterozigosidade observada encontrados no presente estudo (0,000 – 1,000) foram similares àqueles encontrados por Rueda *et al.* (2011) no trabalho de caracterização dos *loci* microssatélites e similares aos encontrados por Barbosa *et al.* (2008) e Melo *et al.* (2013) no estudo de outras espécies do gênero *Prochilodus*. Mesmo sendo valores similares a outros estudos, os valores de heterozigosidade observados foram menores que o esperado (F_{IS} positivo) em todos os grupos, principalmente no grupo Araguaia sugerindo assim uma deficiência de heterozigotos.

Assim como encontrado em *P. lineatus* no presente estudo, essa deficiência pode ter como causas prováveis a endogamia, o efeito Wahlund ou a presença de alelos nulos. Os alelos nulos também justificam as rejeições significantes de HWE ($P > 0,005$, após correção de Bonferroni) encontradas no presente estudo.

No presente estudo, os valores de diferenciação gênica e genotípica, baseados nas frequências alélicas e genotípicas observadas, indicaram diferenciação genética entre alguns dos grupos analisados. A partir dessa indicação de diferenciação, os valores de F_{ST} encontrados entre pares de populações variaram de 0,023 (Madeira J x Iquitos) e 0,393 (Araguaia x Purus), estes significantes após a correção de Bonferroni ($P \leq 0.005$). Pode-se observar que o grupo Purus, ao ser comparado com todos os outros grupos, apresentou índices não inferiores a 0,278 e o grupo Araguaia obteve índices que

variaram de 0,038 a 0,393. Todos os outros grupos quando comparados, apresentaram índices inferiores a 0,041.

De acordo com Wright (1978), pode se dizer que existe uma diferenciação muita elevada na população Purus e o grupo Araguaia com uma diferenciação que fica entre moderada à grande. Nos outros grupos amostrais, os valores de F_{ST} , sugerem pouco ou nenhuma estruturação genética.

Apesar disso, as análises de AMOVA demonstram que entre os grupos (Purus x Araguaia x todos os outros grupos) há pouca variação (0,98%) e que a maior percentagem de variação, está mesmo dentro dos grupos (87,6%) sugerindo pouca diferenciação entre eles.

A análise Bayesiana realizada no programa STRUCTURE, e as estimativas de $\ln(P)D$ e ΔK , indicaram a formação de dois grupos sustentando a estruturação registrada para a localidade Purus.

5.2.2. Região controladora do DNAm (D-loop)

A análise diversidade indicou que *P. nigricans* possui uma alta diversidade genética, tanto haplotípica quanto nucleotídica (0,9416 e 0,022 respectivamente), números semelhantes ou superiores aos encontrados no presente estudo, com *P. lineatus*, bem como em outros estudos (Batista e Alves-Gomes, 2006; Da Acosta, 2009; Batista, 2010; Piorski, 2010; Garcez *et al.*, 2011).

Quando considerada a análise inter-populacional entre amostras dos grupos de *P. nigricans*, o valor global de F_{st} obtido foi de 0,6, surpreendentemente um valor muito

acima ao valor obtido pelos microssatélites (0,12), que já havia apresentado um valor diante de outros estudos para espécies do mesmo gênero. Quando o índice (F_{ST}) foi analisado par a par, praticamente todas as comparações entre os grupos apresentaram algum tipo de estruturação, com exceção dos grupos Madeira Montante x Madeira Jusante, como também os grupos Manaus x Iquitos, que não apresentaram valores significativos para esse índice, portanto sem diferenciação significativa entre eles. O grupo Purus, para esse índice, apontou valores muito elevados, inclusive mais elevados do que os valores que já haviam sido apresentados pelos marcadores microssatélites, variando o índice de 0,523 à 0,882, que indicariam uma estruturação extremamente elevada. Na análise de variância molecular (AMOVA), os dados de D-loop também não corroboraram os resultados pelos microssatélites do presente estudo, determinando que a fonte de variação da espécie se encontra dividida, com uma pequena vantagem percentual de variação dentro dos grupos (39.61%), o que também nos mostra um elevado grau de diferenciação entre os grupos analisados. Mesmo quando comparado a outros estudos que evidenciaram estruturação populacional em outros grupos de peixes como no caso de Pereira *et al.* 2009, os números do presente estudo são extremamente elevados.

5.2.3. Estrutura Populacional em *P. nigricans*

As diferenças encontradas entre os marcadores mitocondriais e os marcadores microssatélites, em relação à estrutura registrada para todos os grupos, pode estar relacionado com os níveis de variabilidade, entre as diversas classes de marcadores além do tipo de herança destes. Estimativas realizadas das taxas de mutação de

marcadores moleculares em peixes indicam que a taxa de mutação da região controle seja de $3,6 \pm 0,46\%$ por milhão de anos (Donaldson e Wilson, 1999), no entanto os microssatélites possuem uma taxa de mutação maior que os marcadores mitocôndrias de 10^{-2} - 10^{-6} por locus por geração (Ellegren, 2000) e se deve às alterações no número da unidade de repetição. Soma-se a isso, o fato da região controladora ter uma herança estritamente materna.

Devido a essa herança estritamente materna das linhagens de mtDNA, e as diferenças significativas encontradas entre os dois marcadores utilizados no presente estudo, surge a hipótese de que a espécie *P. nigricans* tenha comportamentos diferentes em ambos os sexos quando relacionados a padrões migratórios, onde a fêmea poderia ter um comportamento de não migrar por longas das distâncias (seriam residentes), ao contrário do comportamento dos machos que migrariam por distâncias maiores e seriam responsáveis pela variabilidade encontrada nos microssatélites e não nas linhagens de mtDNA.

Padrões de estrutura genética foram identificados para algumas espécies de peixes amazônicos como o jaraqui (*Semaprochilodus insignis*), foi observada estruturação entre a bacia amazônica e do Orinoco, no entanto ainda as espécies compreendem um único estoque na região amazônica (Batalha, 2009). Olivares *et al.* (2013) evidenciou estruturação genética em *Osteoglossum ferreirai*. Em outros estudos, Hurgo (2009) identificou que *B. filamentosum* apresenta estruturação genética associada principalmente ao tipo de água (branca, clara e preta), posteriormente foi observada uma baixa estruturação para *B. rousseauxii* entre o rio Madeira e rio Japurá (Batista, 2010).

A estrutura populacional é o resultado de eventos do passado e da influência ambiental que tem modelado o fluxo gênico contemporâneo (Templenton *et al.*, 1995). Os padrões de diversificação das populações e espécies na região tropical têm sido associados principalmente à influência das incursões marinhas (Fjeldså 1994; Roy *et al.*, 1997; Nores 1999; Hubert e Renno 2006) e dos processos paleogeográficos relacionados com o surgimento dos Andes (Räsänen *et al.*, 1990, 1992; Patton *et al.*, 1994; Hoorn *et al.*, 1995; Patton e Da Silva 1998;), que datam principalmente do Mioceno, entretanto a influência das flutuações climáticas do Pleistoceno, na demografia e variabilidade genética entre populações é pouco explorada (Hubert *et al.*, 2007).

Segundo Rice *et al.* (2008), tributários desempenham importantes funções dentro de uma bacia hidrográfica, fornecendo habitats únicos e suporte a funções ecológicas importantes. Este fato poderia explicar os valores encontrados de estruturação genética estimada para os diferentes afluentes do Rio Solimões/Amazonas, visto que seus tributários apresentam fatores bióticos e abióticos próprios, dando condições e gerando pressões seletivas distintas para cada grupo.

O comportamento migratório do gênero *Prochilodus* não é suficientemente claro. Estudos utilizando técnicas de marcação e recaptura e de detecção por rádio em *P. lineatus* e *P. argenteus* reportaram fidelidade aos locais de desova em anos consecutivos (Godoy, 1959, 1975; Godinho e Kynard, 2006), de alimentação e de reprodução e preferência por zonas alagadas (Pessoa e Schulz, 2010), migrações anuais que envolvem longas distâncias (460-600 km), sem qualquer razão conhecida (Bayley, 1973; Agostinho *et al.*, 1997; Espinach-Ros e Delfino, 1993) e as migrações diárias (10-16 km) durante os períodos de desova (Godoy, 1975).

No caso do grupo Purus, é provável que ocorra acasalamento preferencial entre os indivíduos da população residente no rio Purus possa explicar a forte estrutura genética observada, esta hipótese também é fundamentada na evidencia do não isolamento por distância entre as populações. Neste sentido provavelmente indivíduos distribuídos em outras localidades, até possam entrar no rio Purus, mas tenham uma reprodução pequena com a população residente, mantendo assim a estrutura populacional observada, no entanto não pode ser descartada a presença de barreiras químicas na área da jusante do rio Purus, que dificulte a entrada de indivíduos na bacia do rio Purus, o que corroboraria os dados de diversidade genética obtidos que apresentam as menores taxas de diversidade entre todos os grupos analisados.

Embora não se tenham estudos específicos dos padrões reprodutivos para *P. nigricans*, é provável que a população residente desta espécie no rio Purus, siga o padrão de migração reprodutiva descrito por Barthem e Goulding (1997), onde indivíduos dos tributários migram rio abaixo para desovar nas águas do canal principal do rio Purus, e posteriormente as larvas e ovos seriam levados à áreas de várzea dispersando-se na floresta inundada onde permaneceriam alimentando se por alguns meses. A população do rio Purus teria uma área de alimentação própria, onde indivíduos provavelmente realizariam curtas migrações reprodutivas dentro desta bacia, enquanto que outros rios dispõem de diferentes áreas de alimentação ao longo da bacia amazônica (Barthem e Goulding, 1997; Barthem e Goulding, 2007; Leite *et al.*, 2007).

Padrões de estrutura genética e divergência populacional, associados a eventos climáticos no Pleistoceno já foram identificados para *Serrasalmus rhombeus*, onde populações desta espécie se estabeleceram recentemente (1 Ma) no alto rio Madeira, sugerindo que modernas linhagens de mtDNA provieram da área do refúgio de

Aripuanã aproximadamente durante o último milhão de anos (Hubert *et al.* 2007), padrões similares foram observados para tucunaré (*Cichla*) (Renno *et al.*, 2006) e *Leporinus* na Guiana Francesa (Renno *et al.*, 1990, 1991). Segundo Aleixo 2004, a divergência de espécies ou populações em áreas de refúgio esta correlacionada com processos de expansão populacional posteriores à ultima grande glaciação (10,000-80,000 anos).

Outra hipótese, que pode contribuir no entendimento da divergência de peixes neotropicais e provavelmente na divergência populacional alopátrica, corresponde à hipótese hidrogeológica relacionada com a estruturação atual da bacia amazônica. Segundo Montoya-Burgos (2003) a divisão das drenagens, a mudança no curso dos rios e as repetidas incursões e regressões marinhas podem ter produzido muitos eventos vicariantes, promovendo a riqueza biótica atual. Segundo Lundberg (1997) a diversidade de peixes de água doce pode ser o resultado de mudanças paleohidrológicas, que promoveram dispersão seguida por divergência vicariante.

A estrutura genética e divergência populacional de *P. nigricans*, na área de estudo, pode ter sido modelada por diversos eventos e mantida por processos adaptativos das populações a ambientes particulares, que tem influenciado o fluxo gênico entre as populações identificadas.

5.3. Implicações para conservação de *P. lineatus* e *P. nigricans*.

A diversidade genética é a responsável pelas adaptações e evolução de uma espécie frente às contínuas mudanças ambientais e uma perda desta diversidade implica na redução geral do valor adaptativo (Frankham *et al.*, 2008). Para o planejamento e

conservação de uma espécie é importante a identificação das linhagens com significado evolutivo para manter ao máximo a diversidade genética e incorporar informação relacionada com os processos históricos populacionais (Moritz, 1998).

Análises filogeográficas constituem uma ferramenta importante na biologia da conservação; a idéia de propor políticas de conservação em nível intraespecífico constitui uma forma de identificar unidades de manejo que refletem a importância evolutiva das linhagens dentro das espécies, e com esta informação elaborar programas efetivos para a conservação de espécies em risco (Awise e Hamrick, 1996).

Estudos revelam que espécies sob influências antrópicas, ou que sofreram algum gargalo populacional, em geral, tem sua variabilidade genética diminuída quando comparadas com as espécies não ameaçadas e/ou com grande tamanho populacional. Uma vez que esta variabilidade é também responsável pelo potencial evolutivo de uma espécie, quando perdida ou reduzida, seu potencial evolutivo também é alterado (Frankham *et al.*, 2008).

No caso dos grupos de *P. lineatus* analisados no presente estudo, estes demonstraram grande variabilidade genética e um cenário com provável ausência de estruturação genética para os grupos do Alto Paraná e uma leve estruturação quando comparados com os grupos pertencentes à bacia do Paraguai, essa ausência de diferenciação entre os grupos do Alto Paraná deve ser considerada com cautela. Laikre *et al.* (2005) advertem que a hipótese de ausência de estruturação deve ser aceita somente quando realizado um estudo ao longo de vários anos, com grandes amostragens e número de *loci* analisados, pois somente assim teremos uma visão mais ampla da diversidade genética da espécie como um todo.

Outro ponto importante, é o fato da espécie *P. lineatus*, fazer parte de vários programas de reintrodução na bacia do Prata, ações que visem investigar a estrutura e diversidade genética de populações naturais, como no presente estudo, bem como análise dos estoques que estão sendo usados para reprodução e posterior soltura, são essenciais para determinação de estratégias conservacionistas, evitando assim com que haja um perda de variabilidade genética para a espécie.

A identificação de unidades geneticamente estruturadas em peixes brasileiros é necessária para a conservação, dado que várias espécies demonstram diferenças significativas entre diversas populações analisadas (Wasko e Galetti, 2003; Hatanaka e Galetti, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006; Sanches e Galetti, 2007). Até mesmo pequenos valores de F_{st} merecem atenção, como valores encontrados nos estudos para *P. argenteus* ($F_{st}=0,008;p<0,0001$) (Hatanaka *et al.*, 2006) e *B. hilarii* ($F_{st}=0,0091;p<0,048$) (Sanches, 2007).

Definir uma área de conservação para *P.nigricans* é uma tarefa difícil. Ainda que a informação obtida neste estudo constitua um ponto de partida, ainda se requer informações adicionais em nível biológico, ecológico e comportamental; aspetos que não são completamente conhecidos até o momento, principalmente pela diferença nos resultados encontrados entre os marcadores moleculares utilizados, diferenças essas que podem ser explicadas quando se obter mais dados sobre o comportamento reprodutivo dessa espécie. No entanto, considerando a estrutura genética identificada para *P. nigricans* na área de estudo, em ambos os marcadores, e a redução da variabilidade genética na região do rio Purus, se considera de grande importância à implementação de medidas de conservação e manejo.

Neste contexto deve ser ressaltada a importância dos estudos populacionais, com a utilização de ferramentas apropriadas e resolutivas. Os marcadores genéticos moleculares têm se mostrado apropriados para tais estudos e considera-se que sua aplicação poderá resultar em informações decisivas para a melhor compreensão da estrutura das populações e para a formulação de programas adequados de manejo e conservação das espécies de peixes.

6. CONCLUSÕES

É fato que o crescimento populacional humano tem gerado inúmeros problemas para o meio ambiente e para a manutenção de sua biodiversidade. Pelos fatores anteriormente considerados, populações nativas intactas de peixes de água doce são atualmente raras, sendo que na maioria dos casos são submetidas a intensos impactos antrópicos. Com base nos resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Para a espécie *P. lineatus*, nenhum índice de estruturação populacional foi encontrado quando comparou-se somente os grupos amostrados na Bacia do Alto Paraná, porém quando comparou-se todos os grupos amostrados para esta espécie, incluindo os amostrados na Bacia do Paraguai, a população do rio Coxim apresentou-se estruturada em relação as outras em ambos os marcadores, já a população Cuiabá, apresentou evidências de estruturação somente para os marcadores microssatélites.
- A espécie *P. nigricans*, apresentou resultados bem distintos entre os marcadores utilizados. No caso dos marcadores microssatélites, estes evidenciaram a existência de estruturação populacional somente o grupo amostrado no rio Purus. Quando analisou-se o marcador mitocondrial, este evidenciou índices de estruturação populacional entre todos rios amostrados, sendo os índices da população Purus os mais altos, apresentando alta estruturação quando comparado com todos os outros grupos.
- Na Bacia do Prata, por sofrer grande impacto de ações antrópicas, como construção de barragens, poluição, entre outros, a espécie *P. lineatus* é muito utilizada em programas de reintrodução ao longo da Bacia. Um estudo e acompanhamento desses programas seria necessário para garantir um correto manejo para a espécie.
- Os índices de estruturação distintos, obtidos entre os diferentes marcadores moleculares para a espécie *P. nigricans*, sugerem que talvez a espécie possua comportamentos migratórios diferentes entre os sexos, isso devido ao tipo de herança típica de cada marcador, porém mais estudos, entre eles ecológicos para a espécie são necessários para comprovar tal hipótese.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu MM, Pereira LHG, Vila VB, Foresti F & Oliveira C (2009) Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin, *Genetics and Molecular Biology*, 32 (4): 868-873.
- Agostinho AA, Gomes LC, Fernandez DR e Suzuki HI (2002) Efficiency of Fish Ladders for Neotropical Ichthyofauna. *River Res and Applic* 18:299–306.
- Agostinho AA e Gomes LC (1997) Reservatório de Segredo: Bases Ecológicas para o Manejo. EDUEM, Maringá, 319-364 pp.
- Agostinho AA e Gomes LC (2005) O Manejo da Pesca em Reservatórios da Bacia do Alto Rio Paraná: Avaliação e Perspectivas. In: Nogueira MG, Henry R e Jorcin A (Orgs.) *Ecologia de Reservatórios: Impactos Potenciais, Ações de Manejo e Sistemas em Cascata*. Ed. RiMa, São Carlos, 23–55 pp.
- Agostinho AA, Thomaz SM e Gomes LC (2005) Conservation of the Biodiversity of Brazil's Inland Waters. *Conserv. Biol.* 19:646-652.
- Aguirre-Pabón, J., Narváez Barandica, J., & Castro García, L. (2013). Mitochondrial DNA variation of the bocachico *Prochilodus magdalenae* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Magdalena River Basin, Colombia. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 23(4), 594-605.
- Aleixo, A. 2004. Historical diversification of a terra-firme forest bird superspecies: a phylogeographic perspective on the role of different hypotheses of Amazonian diversification. *Evolution*, 58, 1303–1317.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acid Res*, 25 (22), 4692-4693.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. Bacia Amazônica Disponível em: <<http://www2.ana.gov.br/Paginas/portais/bacias/amazonica.aspx>>. Acesso em: 15 dez. 2009.
- ANA – AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS. *Bacias brasileiras do Rio da Prata: avaliações e propostas*. Brasília, DF, 2001. 102 p. Disponível em: <<http://www5.prossiga.br/recursoshidricos/pdf/relprata.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2005.
- Appleyard, S. A., Ward, R..D., Grewe, P. M. (2002). Genetic stock structure of big eye tuna in the Indian Ocean using mitochondrial DNA and microsatellites. *J. Fish Biol.* 60: 767-770.

- Arias, J., Sanchez, L., Martinez, P. (1995). Low stocking incidence in brown trout populations from northwestern Spain monitored by LDH-5* diagnostic marker. *J. Fish Biol.* 47: 170-176.
- Aurelle, D.; Cattaneo-Berrebi, G.; Berrebi, P. (2002). Natural and secondary contact in brown trout (*Salmo trutta*, L.) in the French western Pyrennes assessed by allozymes and microsatellites. *Heredity* 89: 171-183.
- Avise JC. 1994. *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York, NY, USA. Avise, J.C., Hamrick, J.L. (1996). *Conservation genetics. Case histories from nature*. Chapman & Hall, New York, 512 p.
- Balding, D.J. (2006). A tutorial on statistics methods for population association studies. *Nature Reviews Genetics*, 7, 781-791
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Mol. Ecol.*, 11, 155-165.
- Barbosa, A.C.D.R.; Galzerani, F.; Corrêa, T.C.; Galleti JR., P.M. & Hatanaka, T. (2008). Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Gen. Mol. Biology*, 31, 1 (supl.), 357-360.
- Barroca, T., Magalhães, B., Siqueira, F. F., Almeida, M. O., Carmo, A. O., & Kalapothakis, E. (2012, September). Evaluation of genetic diversity of hatchery-reared fish used as broodstock in Volta Grande Environmental Station (Minas Gerais, Brazil). In *FEBS JOURNAL* (Vol. 279, pp. 331-331). 111 RIVER ST, HOBOKEN 07030-5774, NJ USA: WILEY-BLACKWELL.
- Barroso RM, Hilsdorf AWS, Moreira HLM, Mello AM, Guimarães SEF, Cabello PH e Traub-Cseko YM (2003) Identification and Characterization of Microsatellites Loci in *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Mol. Ecol. Notes*. 3:297–298.
- Barthem, R.B and Goulding, M. 2007. *An unexpected ecosystem: the Amazon revealed by the fisheries*. Gráfica Biblos, Lima. Botanical Garden Press. Missouri. 241 pp.
- Barthem, R and Goulding, M. 1997. *Os Bagres Balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de Peixes Amazônicos*. Sociedade Civil Mamirauá, MCT - CNPq, IPAAM. Brasilia, Brazil. 140 pp.
- Barthem, R.B.; Fabrè. N. N, (2004). *Biologia e Diversidade dos Recursos Pesqueiros da Amazônia*. In: *A Pesca e os Recursos Pesqueiros na Amazônia Brasileira*. Ruffino, M. L. (Coord.) – Manaus: Ibama/Provárzea 272 p.

- Bassan, B.J.; Caetano- Anolles, G.; Gresshoff, P.M. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry* (Anal. Biochem) 196: 80- 83.
- 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. A. (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.
- Batista, V.S., (1998) - Distribuição, dinâmica da frota e dos recursos pesqueiros da Amazônia Central. Manaus: INPA/FUA, Tese de Doutorado: 291 pp.
- Batista, J.S. 2010. Caracterização genética da dourada - *Brachyplatystoma rousseauxii*, Castelnau, 1855 (Siluriformes-Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo/ Jacqueline da Silva Batista. Manaus: [s.n.], 2010. Tese de doutorado. INPA. Manaus.
- Bayley P.B. 1973. Studies on the Migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg, 1889, (Pisces, Characoidei) in the River Pilcomayo, South America. *Journal of Fish Biology* 5:25–40.
- Bayley, P. B. ; Petrere Jr. (1989) Amazon fisheries: assessment methods, current status, and management options. *In: Dodge, D.P. (ed.) Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publications, Fisheries and Aquatic Sciences*, 106: 385-398.
- Beachan, T.D., Wood C.C. (1999). Application of the microsatellite DNA variation to estimation of stock composition and escapement of Nass river sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 56: 297-310.
- Beheregaray L.B., Möller, L.M., Schwartz, T.S., Chao, N.L., Caccone, A. (2004a). Microsatellite markers for the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*, a commercially important fish from central Amazonia. *Mol. Ecol. Notes*, 4: 330–332
- Beheregaray L.B., Schwartz, T.S., Möller, L.M., Call, D., Chao, N.L., Caccone, A. (2004b). A set of microsatellite DNA markers for the one-lined pencilfish *Nannostomus unifasciatus*, an Amazonian flooded forest fish. *Mol. Ecol. Notes* 4: 333-335

- Billington, N., & Hebert, P. D. (1991). Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48(S1), 80-94.
- Britski, H. A.; Silimon, K. Z. de S.; Lopes, B. S. *Peixes do Pantanal: manual de identificação*. Brasília: Embrapa-SPI; Corumbá: Embrapa-CPAP, 1999. 184 p. il.
- Broughton, R.E.; Stewart, L.B.; GOLD, J.R. (2002). Microsatellite variation suggests substantial gene flow between king mackerel (*Scomberomorus cavalla*) in the western Atlantic Ocean and Gulf of Mexico. *Fisheries Research* 54:305-316.
- Brown GG (1986) Structural Conservation and Variation in the D-Loop Containing Region of Vertebrate Mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 192:503-511.
- Buckup, P.A. (1998). Relationships of the Characidiinae and phylogeny of characiform fishes (Teleostei: Ostariophisy). p. 123-144. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena Z.M. & Lucena, C.A. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS, p. 279-330.
- Cabrera, S.E., and C. Candia (1964). Contribucion al conocimineto de la biologia del sabalo (*Prochilodus platensis* Holmberg) del Rio de la Plata; B, Estudio bio-ecologico, III: Analisis del crecimiento; C, Estudio bio-economico. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, series 1,4:57-83.
- Calcagnotto, D., & DeSalle, R. (2009). Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotrop Ichthyol*, 7, 607-616.
- Calcagnotto, D., DeSalle, R. (2009). Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotrop. Ichthyol.*, 7(4): 607-616.
- Calcagnotto, D., Russello, M., DeSalle, R. (2001). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Mol. Ecol.* 10:245-247.
- Callen, D.F., Thompson, A.D.; Shen, Y. (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the. (AC)n microsatellite markers. *Am J Hum Genet* 52: 922-927.
- Cardoso, Y. P., & MONTROYA-BURGOS, J. I. (2009). Unexpected diversity in the catfish *Pseudancistrus brevispinis* reveals dispersal routes in a Neotropical center of endemism: the Guyanas Region. *Molecular Ecology*, 18(5), 947-964.
- Carvalho, G.R. (1993). Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *Journal of Fish Biol.* 43, 53-73.

- Carvalho-costa L.F.; Hatanaka, T.; Galetti, P.M. (2008). Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl), 377-380.
- Castro, R.M.C. and R.P. Vari (2004). Detritivores of the South American Fish Family Prochilodontidae (Teleostei: Ostariophysi: Characiformes): A phylogenetic and Revisionary Study. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 622: 1-189
- Catella, A. C. (2003) A pesca no Pantanal sul: situação atual e perspectivas. Corumbá: Embrapa Pantanal,. 43p.(Embrapa Pantanal. Documentos, 48).
- Chambers, GK; Macavoy, ES. (2000). Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 126:455-476.
- Chapuis, M.P.; Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24(3):621–631.
- Chistiakov DA, Hellemans B e Volckaert FAM (2006) Microsatellites and their Genomic Distribution, Evolution, Function and Applications: A Review with Special Reference to Fish Genetics. *Aquaculture* 255:1–29.
- CIC – Comité Intergubernamental Coordinador de Los Países de La Cuenca Del Plata. *La Cuenca del Plata: Información General*. Buenos Aires, 2004. Disponível em: <http://www.cicplata.org/?id=lc_infogen#lcdp>. Acesso em: 01 dezembro. 2009.
- Da Acosta R. 2009. Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) por meio de marcadores moleculares microsátélites e D-Loop de quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha y tributários. MSc thesis, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Manaus, Brasil.
- Desvignes, J. F., Laroche, J., Durand, J. D., Bouvet, Y.(2001). Genetic variability in reared stocks of common carp (*Cyprinus carpio* L.) based on allozymes and microsatellites. *Aquaculture* 194: 291-301.
- DeWoody J.A., Avise, J.C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *J. Fish Biol.* 56: (3) 461-473.
- Donaldson, K.A and Wilson Jr., R.R. 1999. Amphi-Panamic germinates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 13, 208–213.
- Earl, D. A. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359-361.

- ELETRONORTE/THEMAG (1989). Estudos de viabilidade de Serra Quebrada: estudos ambientais, relatório final de ictiofauna. SEQ. 16-1-14-0084-RE, ELETRONORTE, Brasília.
- Ellegren, H. 2000. Microsatellite mutations in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends Genet.* 16:551–558.
- Espinach Ros, A., & Delfino, R. (1993). Las pesquerías de la cuenca del Plata en Bolivia, Paraguay, Argentina y Uruguay. FAO.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, 14(8), 2611-2620.
- Excoffier, L., Laval, A., Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for populations genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* v.1: p. 47-50.
- Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567–1587.
- Ferreira, ME; Grattapaglia, D. (1995). Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP em análise genética. Brasília: EMBRAPA-Cenargen, 1995. pp. 220. (EMBRAPA-CENARGEN Documento 20).
- Fjeldså, J. 1994. Geographical patterns for relict and young species of birds in Africa and South America and implications for conservation priorities. *Biodivers. Conserv.* 3: 207–226.
- Fonseca, Getúlio Lamartine de Paula. (1997) O MERCOSUL e sua rede hidrográfica. *Informativon*° 4. Brasília, DF, Congresso Nacional, Comissão Parlamentar Conjunta do MERCOSUL, Representação Brasileira, fev.-mar. 1997. Disponível em: http://www.camara.gov.br/mercosul/Informativo/info_4.htm#Mercosul>. Acesso em: 08 abr.2005.
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2008). Fundamentos de Genética da Conservação. Tradução por Francisco, M.R.; Farias, I.P.; Rodrigues, F.P.; Galetti, P.Mi. Ribeirão Preto, SP: SBG (Sociedade Brasileira de Genética), 280p.
- Freitas, PD; Galetti JR., PM (2002). PCR-based VNTR core sequences analysis for inferring genetic diversity in the shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 4.
- Garcez, R., Calcagnotto, D., Almeida-Toledo, D., & Foresti, L. (2011). Population structure of the migratory fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) from Rio

- Grande basin (Brazil), an area fragmented by dams. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 21(3), 268-275.
- Garcia de Leon, F. J., Chikhi, L., & Bonhomme, F. (1997). Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1758). *Molecular Ecology*, 6(1), 51-62.
- Godinho AL & Kynard B (2006) Migration and spawning of radio-tagged zulega *Prochilodus argenteus* in a dammed Brazilian river. *Transactions of the American Fisheries Society*, 135: 811-824.
- Godoy MP (1975) Subordem Characoidei. In: *Peixes do Brasil: Bacia do Rio Mogi Guassu*. Editora Franciscana, Piracicaba, 539-552 pp.
- Gondim, S. G. C. A., Resende, L. V., Brondani, R. P. V., Collevatti, R. G., Silva-Júnior, N. J., Pereira, R. R., & Telles, M. P. C. (2010). Development of microsatellite markers for *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae). *Genetics and Molecular Research*, 9(3), 1513-1517.
- Goudet, J. (2002). Fstat A Program to Estimate and Test Gene Diversities and Fixation Indices (Version 2.9.3.2). URL: <http://www2.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Guo, S. W.; E. A. Thompson. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48:361-372.
- Hahn NS, Agostinho AA, Gomes LC e Bini LM (1998) Estrutura Trófica da Ictiofauna do Reservatório de Itaipu nos Primeiros Anos de sua Formação. *Interciencia*23:299-305.
- Haig, S.M. (1998). Molecular contributions to conservation. *Ecology*, 79(2), pp. 413-425.
- Hall, T. A. (1999, January). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Hansen, M.M., Ruzzamante, D.E, Nielsen, E.E., Mensberg, K. D. (2000) Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol. Ecol.* 9: 583-594.
- Hatanaka, T.; Galetti, 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.
- Hatanaka, T., Henrique-Silva, F. Galetti Jr., P.M. (2006). Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 1-7.

- Hausdorf B, Wilkens H & Strecker U (2011) Population genetic patterns revealed by microsatellite data challenge the mitochondrial DNA based taxonomy of *Astyanax* in Mexico (Characidae, Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 60: 89-97.
- Hayashy, C.; Ribeiro, R. P.; Furuya, W. M.; Furuya, V. R. B.(1996) Curso de atualização em piscicultura – espécies nativas e exóticas. *Apostila*. FADEC/ UEM, Maringá, 185 p.
- Hilsdorf AW e Petrere Jr M (2002) Conservação de Peixes na Bacia do Rio Paraíba do Sul. *Ciência Hoje* 30:62–67.
- 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.
- Hrbek T, Crossa M & Farias IP(2007) Conservation strategies for *Arapaima gigas*(Schinz, 1822) and the Amazonian várzea ecosystem. *Brazilian Journal of Biology*, 67(4, suppl.): 909-917
- Hubert, N; Duponchelle, F; Nuñez-Rivera, JR; Bonhomme, F and Renno, J.N. 2007. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. *Molecular Ecology* (2007) 16, 2488–2503.
- Hubert, N and Renno, J.-F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *J. Biogeogr.* 33, 1414–1436.
- Huergo, G.M. 2009. Estimativa da diversidade genética da piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (*B. capapretum* Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação. Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus, 114 pp.
- Hurst, G. D., & Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525-1534.
- IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis *Bacia Amazônica* Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/pescaamadora/locais/b_amazonica.htm>. Acesso em: 15 dez. 2009.
- Iervolino, F., de Resende, E. K., & Hilsdorf, A. W. S. (2010). The lack of genetic differentiation of pacu (< i> *Piaractus mesopotamicus*</i>) populations in the

- Upper-Paraguay Basin revealed by the mitochondrial DNA D-loop region: Implications for fishery management. *Fisheries Research*, 101(1), 27-31.
- Imsland, A.K.; Jónsdóttir, I.; Ó.D.B.; Danielsdóttir, I.; A.K. (2004). Nuclear DNA RFLP variation among Atlantic cod in south and south-east Icelandic waters. *Fisheries Research*, 67:227–233.
- Jackson, T. R.; Ferguson, M. M.; Danzmann, R.G.; Fishback, A. G.; Ihssen, P. E.; O’Connell, Crease, T. J. (1998). Identification of two QTL influencing upper temperature tolerance in three rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) half-sib families. *Heredity* 80: 143-151.
- Jarne, P., & Lagoda, P. J. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11(10), 424-429.
- Jones, A. G., & Avise, J. C. (1997). Polygynandry in the dusky pipefish *Syngnathus floridae* revealed by microsatellite DNA markers. *Evolution*, 1611-1622.
- Kalinowski, S.T. (2004). Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*. 5, 539-543.
- Koskinen, M. T.; Nilsson, J.; Veselov, J.; Potutkin, A. G.; Ranta, E.; Primmer, C. R. (2002). Microsatellite data resolve phylogeographic patterns in European grayling, *Thymallus thymallus*, Salmonidae. *Heredity* 88: 391-401.
- Laikre, L.; Palm, S. & Ryman, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio*. 34 (2), 111-119.
- Latch, E. K., Dharmarajan, G., Glaubitz, J. C., & Rhodes Jr, O. E. (2006). Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*, 7(2), 295-302.
- Lee, W. J., & Kocher, T. D. (1996). Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus*. *Journal of Fish Biology*, 49(1), 169-171.
- Leite, R.G; Cañas, C; Forsberg, B; Barthem, R.B and Goulding, M. 2007. Larvas dos Grandes Bagres Migradores. Lima, Peru. 127 pp.
- Lewin, B. (1994). Chromatin and gene expression: constant questions, but changing answers. *Cell*, 79(3), 397-406.
- Liu, Y-G.; Chena, S-L.; Lib, B-F.; Wang, Z-J.; Liu, Z. (2006). Analysis of genetic variation in selected stocks of hatchery flounder, *Paralichthys olivaceus*, using AFLP markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 33(10):993-1005.

- Lopera-Barrero, N., Povh, J., Fornari, D. C., Rodriguez-Rodriguez, M., Alves dos Santos, S. C., & Ribeiro, R. (2013). Genetic diversity of *Prochilodus lineatus* stocks using in the stocking program of Tietê River, Brazil. *Revista MVZ Córdoba*, 18(3).
- Lougheed SC, Gibbs HL, Prior KA e Weatherhead PJA (2000) Comparison of RAPD Versus Microsatellite DNA Markers in Population Studies of the Massasauga rattlesnake. *J Hered* 6:458–463.
- Lundberg, JG . 1997. Fishes of the La Venta fauna: additional taxa, biotic and paleoenvironmental implications. In: *Vertebrate Paleontology in the Neotropics: the Miocene Fauna of la Venta Colombia* (eds Kay RF, Madden RH, Cifelli RL, Flynn JJ), pp. 67–91. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Maldinia, M.; Marzanoa, F.N.; Fortesa, G.G.; Papa, R.; Gandolfia, G. (2006) Fish and seafood traceability based on AFLP markers: Elaboration of a species database. *Aquaculture*, 261(2):487-494.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer research*, 27(2 Part 1), 209-220.
- Marciano FT (2005) *Composição, Abundância e Aspectos Reprodutivos das Espécies de Peixes do Reservatório Álvaro de Souza Lima (Bariri, SP) e sua Relação com as Características Ambientais do Sistema*. Tese (doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 236 pp.
- Martien, K. K., Givens, G. H., & Archer, E. (2007). A note on the ability of STRUCTURE to correctly infer the number of populations for Bering-Chukchi-Beaufort Seas bowhead whales. *International Whaling Commission. Paper SC/59/BRG34*.
- 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.
- Matoso, D.A.; Artoni, R.F.; Galetti Jr, P.M. (2004). Genetic diversity of the small characid fish *Astyanax* sp., and its significance for conservation. *Hydrobiologia* 527: 223–225.
- Matsumoto CK & Hilsdorf AWS (2009) Microsatellite variation and population genetic structure of a neotropical endangered Bryconinae species *Brycon insignis* Steindachner, 1877: implications for its conservation and sustainable management. *Neotropical Ichthyology*, 7 (3): 395-402.
- Matthews, W. J. (1998). *Patterns in freshwater fish ecology*. Kluwer Academic Publisher, Norwell, Massachusetts, USA, 756p.

- McAllister, D. E. (1999). The crisis of aquatic biodiversity. Pages 25-28, In: R. S. V. Pullin, R. Froese, C. N. V. Casal (Eds). Proceedings of the conference on sustainable use of aquatic biodiversity: data, tools and cooperation. Brussels, ACP-EU Fisheries Research Initiative Report, 6.
- Melo, B. F., Sato, Y., Foresti, F., & Oliveira, C. (2013). The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *P. costatus*. *Neotropical Ichthyology*, 11(3), 625-636.
- Melon Barroso, R., Hilsdorf, A. W., Moreira, H. L., Cabello, P. H., & Traub-Cseko, Y. M. (2005). Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) using microsatellites. *Aquaculture*, 247(1), 51-65.
- Mendonça, F. F., Oliveira, C., Gadig, O. B. F., & Foresti, F. (2009). Populations analysis of the Brazilian Sharpnose Shark *Rhizoprionodon lalandii* (Chondrichthyes: Carcharhinidae) on the São Paulo coast, Southern Brazil: inferences from mt DNA sequences. *Neotropical Ichthyology*, 7(2), 213-216.
- Mezerra, M.; Largiader, C.R. (2001). Comparative analysis of introgression at three marker classes: a case study in a stocked population of brown trout. *J. Fish. Biol.* 59: 298-305.
- Mickett, K.; Morton, C.; Feng, J.; LI, P.; Simmons, M.; Cao, D.; Dunham, R. A.; Liu, Z. (2003) Assessing genetic diversity of domestic populations of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in Alabama using AFLP markers. *Aquaculture*, 228(1-4):91-105.
- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna *Molecular Ecology* (2003) 12, 1855–1867.
- Morelli, K.A.; Oliveira, C.; Porto-Foresti, F., Senhorini, J.A., Foresti, F. (2007b). Populational structure of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the Mogi Guaçu river identified by molecular analysis. In: Pompeu PSH, Santos HA, Alves CBM (eds) Proceedings of the international symposium on fish passages in south America, Lavras, UFLA, pp 7–10.
- Morelli, K.A.; Reveldaves, E.; Oliveira, C.; Foresti, F. (2007). Isolation and Characterization of eight microsatellite loci in *Leporinus macrocephalus* (Characiformes : Anostomidae) and cross – species amplification. *Mol. Ecol. Notes*, 7, 32-34.
- Morin, P.A.; Leduc, R.G.; Archer, F.I.; Martien, K.K.; Huebinger, R.; Bickham, J.W.; Taylor, B.L. (2009). Significant deviations from Hardy–Weinberg equilibrium

- caused by low levels of microsatellite genotyping errors. *Molecular Ecology Resources*. 9:498–504.
- Moritz, C and Faith, D. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7:419-429.
- Moyer, G. R., Winemeller, K. O., McPhee, M. V., & Turner, T. F. (2005). Historical demography, selection, and coalescence of mitochondrial and nuclear genes in *Prochilodus* species of northern South America. *Evolution*, 59(3), 599-610.
- Narum, S. R., Contor, C., Talbot, A., & Powell, M. S. (2004). Genetic divergence of sympatric resident and anadromous forms of *Oncorhynchus mykiss* in the Walla Walla River, USA. *Journal of Fish Biology*, 65(2), 471-488.
- Nelson, J. S. (2006) *Fishes of the World*, 4th ed. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 601 p.
- Nores, M. 1999. An alternative hypothesis for the origin of Amazonian bird diversity. *J. Biogeogr.* 26, 475–485
- O'Connell, M.; Wright, J.M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7:331-363.
- Okimoto, T.; Hara, K.; Ishihara, T.; Aranishi, F. (2008). PCR-RFLP genotyping for Japanese and Korean populations of Pacific oyster using mitochondrial DNA non coding region. *Aquat Ecol*, 42:1–4.
- Olivares, A. M., Hrbek, T., Escobar, M. D., & Caballero, S. (2013). Population structure of the black arowana (*Osteoglossum ferreirai*) in Brazil and Colombia: implications for its management. *Conservation Genetics*, 14(3), 695-703.
- Oliveira, C.; Foresti, F. & Hilsdorf, A.W.S. (2009). Genetics of neotropical fish: from chromosomes to populations. *Fish Physiol. and Biochem.* 35, 81-100.
- O'Reilly, P.T., Canino, M.F., Bailey, K.M., Bentzen, P. (2000). Isolation of twenty low stutter di- and tetranucleotide microsatellites for population analyses of walleye pollock and other gadoids. *J. Fish Biol.* 56: 1074-1086
- Ormerod SJ (2003) Current Issues With Fish and Fisheries: Editor's Overview and Introduction. *J. Appl. Ecol.* 40:204–213.
- Patton, JL; Da Silva MNF and Malcolm JR .1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (Rodentia: Echimyidae) of the Amazon basin: a test of the riverine barrier hypothesis. *Evolution*, 48, 1314–1323.
- Patton, JL and Da Silva, MNF. 1998. Rivers, refuges and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In: *Endless Forms: Species and Speciation* (eds Berlocher S, Howard D), pp. 202–216. Oxford University Press, New York.

- Peakall, R.; Smouse P.E. (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic programa for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-295.
- Perdices, A., Cunha, C., & Coelho, M. M. (2004). Phylogenetic structure of *Zacco platypus* (Teleostei, Cyprinidae) populations on the upper and middle Chang Jiang (= Yangtze) drainage inferred from cytochrome *b* sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(1), 192-203.
- Pereira LHG, Foresti F, Oliveira C. (2009). Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. *Ecology of Freshwater Fish* 2009: 18: 215–225.
- Perez-Enriquez, R., Takagi, M., Taniguchi, N. (1999). Genetic variability and pedigree tracing of hatchery-reared stock of red sea bream (*Pagrus major*) used for stock enhancement, based on microsatellite DNA markers. *Aquaculture* 173: 413-423.
- Pesoa NA, Schulz UH. 2010. Diel and seasonal movements of grumatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River, Southern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 70: 1169–1177.
- Petrere Jr, M., (1978) - Pesca e esforço de pesca no estado do Amazonas. I. Esforço e captura por unidade de esforço. *Acta Amazonica*. 8: 439-454.
- Pignalberi, C , and E.C. Cordiviola de Yuan (1973). Biometria del "sabalo" (*Prochilodus platensis* Holmberg) de diversos ambientes del Parana medio (Pisces, Tetragonopteridae). *Physis*, series B, 32(84):29^M).
- Piorski, N. M. (2010). Diversidade genética e filogeografia das espécies *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) e *Prochilodus lacustris* Steindachner, 1907 no nordeste do Brasil.
- Poteaux, C., Bonhomme, F., Berrebi, P. (1999) Microsatellite polymorphism and genetic impact of restocking in mediterranean brown trout (*Salmo trutta* L.). *Heredity* 82: 645-653.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Räsänen, M; Neller, R; Salo, JS and Jungner, H . 1992. Recent and ancient fluvial deposition systems in the Amazonian foreland basin. Peru. *Geological Magazine*, 129, 293–306.
- Raymond, M., & Rousset, F. (1995). GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of heredity*, 86(3), 248-249.

- Reis, R.E.; Kullander, S.O. & Ferraris JR., C.J. (2003). Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America (CLOFFSCA), EDIPUCRS, Porto Alegre, 729 p.
- Renno, JF; Machordom, A; Blanquer, A and Boursot, P. 1991. Polymorphism of mitochondrial genes in populations of *Leporinus friderici* (Bloch, 1974): intraspecific structure and zoogeography of the Neotropical fish. *Genetica*, 84,137–142.
- Renno, J; García, C; Duponchelle, F and 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, JF; Berrebi, P; Boujard, T and Guyomard, R. 1990. Intraspecific genetic differentiation of *Leporinus friderici* (Anostomidae, Pisces) in FrenchGuiana and Brazil: a genetic approach to the refuge theory. *Journal of Fish Biology*, 36, 85–95.
- Revaldaves, E., Pereira, L.H.G., Foresti, F., Oliveira, C. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Mol. Ecol. Notes*.
- Revaldaves, E., Renesto, E., & Machado, M. F. (1997). Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(3).
- Ribeiro Filho RA (2006) *Relações Tróficas e Limnológicas no Reservatório de Itaipu: Uma Análise do Impacto da Biomassa Pesqueira nas Comunidades Planctônicas*. Tese (Doutorado) Universidade de São Paulo, São Carlos, 154 pp.
- Rice SP, Roy AG e Rhoads BL (2008) *River Confluences, Tributaries, and the Fluvial Network*. John Wiley & Sons, Hoboken, New York, 474 pp.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.
- Ridley, M. (2006). *Evolução*. Editora Artmed, Porto Alegre, 3 ed., 752 p.
- Rousset F (2007) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Notes*. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x
- Roy, MS; Silva, JMC; Arctander, P; García-Moreno J and Fjeldså J. 1997. The speciation of South American and African birds in montane regions. In: *Avian Molecular Evolution and Systematics* (ed. Mindell DP), pp. 325–343. AcademicPress, New York.

- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19(18), 2496-2497.
- Rueda, E. C., Carriquiriborde, P., Monzón, A. M., Somoza, G. M., & Ortí, G. (2013). Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. *Genetica*, 141(7-9), 401-407.
- Rueda, E. C., Sommer, J., Scarabotti, P., Markariani, R., & Ortí, G. (2011). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). *Conservation Genetics Resources*, 3(4), 681-684.
- Ryman, N. (1991). Conservation genetic considerations in fishery management. *J. Fish Biol.* 39: 211-224.
- Saint-Paul, U. & Bayley, P.B.(1979). Situação da pesca na Amazônia Central. *Acta Amazônica*. 9(4):109-114.
- Sanches, A. (2007). Estrutura genética populacional de *P. lineatus* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 113 f.
- Sanches, A., Galetti JR., P.M. (2007). Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon*. *Brazilian Journal of Biology*, 67 (4, Suppl.): 889-895..
- Sanches, A.; Galetti JR., P.M. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 1045-1046.
- Sanches, A., Galetti, P. M., Galzerani, F., Derazo, J., Cutilak-Bianchi, B., & Hatanaka, T. (2012). Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 40(1), 177.
- Schilling, Paulo R. (1981) *O expansionismo brasileiro: a geopolítica do General Golbery e a Diplomacia do Itamaraty*. São Paulo: Global, 288 p.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature America Inc*, 18: 233-234.
- Selkoe KA e Toonen RJ (2006) *Microsatellites for Ecologists: a Practical Guide to Using and Evaluating Microsatellite Markers*. *Ecol. Let.* 9:615–629. Smith, N.J.H. , (1979). *A pesca no Rio Amazonas*. Manaus: INPA.

- Shikano, T., & Taniguchi, N. (2002). Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model. *Aquaculture*, 204(3), 271-281.
- Sidlaukas, B. and R.P. Vari. (2008). Phylogenetic Relationships within the South American Characiform Fish Family Anostomidae (Teleostei, Ostariophysii). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154(1):70-210.
- 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
- Solé-Cava AJ (2001) Biodiversidade Molecular e Genética da Conservação. In: Matioli SR (Ed.) *Biologia Molecular e Evolução*. Editora Holos, Ribeirão Preto, 171-190 pp.
- Strecker, A. L., Cobb, T. P., & Vinebrooke, R. D. (2004). Effects of experimental greenhouse warming on phytoplankton and zooplankton communities in fishless alpine ponds. *Limnology and Oceanography*, 49(4), 1182-1190.
- Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Tree*, 15, 199-203.
- Sverlij, S., A. Ros, and G Orti (1993). Sinopsis de los datos biológicos y pesqueros del Sabalo *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1847). *FAO Sinopsis sobre la Pesca*, 154: 1-64.
- Tatarenkov, A., & Avise, J. C. (2007). Rapid concerted evolution in animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274(1619), 1795-1798.
- Tatarenkov, A., Healey, C. I. M., & Avise, J. C. (2010). Microgeographic population structure of green swordtail fish: genetic differentiation despite abundant migration. *Molecular ecology*, 19(2), 257-268.
- Taylor, M. I., Verheyen, E. (2001). Microsatellite data reveals weak population substructure in *Copadichrois* sp. 'virginalis kajose', a demersal cichlid from Laake Malawi, Africa. *J. Fish Biol.* 59: 593-604.
- Templeton, AR; Routman, E and Philips, CA .1995. Separating population structure from population history: a cladistic analysis of geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma trifurcatus*. *Genetics*, 140, 767-782.

- Tundisi, J.G., Tundisi, T.M., Rocha, O. (1999). Ecosistemas de águas interiores. Pp. 153-192. In: Rebouças, A.C., Braga, B., Tundisi, J.G. (Eds.). Águas doces do Brasil: capital ecológico, uso e conservação. São Paulo, Escrituras, 717 pp.
- Turner, T. F., McPhee, M. V., Campbell, P., & Winemiller, K. O. (2004). Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. *Journal of Fish Biology*, 64(1), 186-201.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535-538.
- Vidal, J.C. (1967). Contribution al estudio biologico del sabalo de los rios Parana y Uruguay. *Secretaria Est de Agricultura*. 1-51. [Not seen.]
- Wang, J. P., Lin, H. D., Huang, S., Pan, C. H., Chen, X. L., & Chiang, T. Y. (2004). Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(3), 1143-1156.
- Ward RD, Skibinski DOF, Woodwark M. 1992. Protein heterozygosity, protein structure and taxonomic differentiation. *Evolutionary Biology* 26: 73–159
- Ward, R. D., Woodwark, M., & Skibinski, D. O. F. (1994). A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *Journal of Fish Biology*, 44(2), 213-232.
- Was, A., Wenne, R. (2002). Genetic differentiation in hatchery and wild sea trout *Salmo trutta* in the Southern Baltic at microsatellite loci. *Aquaculture* 204: 493-506.
- Wasko, A.P.; 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 (1-3):131-137.
- Wasko, A.P.; Galetti Jr., P.M. (2003). PCR primed with minisatellite core sequences yields species-specific patterns and assessment of population variability in fishes of the genus *Brycon*. *Journal Applied of Ichthyology*, 19: 109-113.
- Waters, J. M., Epifanio, J. M., Gunter, T., Brown, B. L. (2000). Homing behaviour facilitates subtle genetic differentiation among river populations of *Alosa sapidissima*: microsatellites and mtDNA. *J. Fish Biol.* 56: 622-636
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations. Volume 4. Variability Within and Among Natural Populations.* The University of Chicago Press, Chicago, 9-103 pp.

- Wright, J. M., Bentzen, P. (1995). Microsatellites: genetic markers for the future. In: Molecular genetics in fisheries (Carvalho, G. R., Pitcher, T.J., eds). Chapman & Hall. TJ Press (Padstow) Ltd, Padstow, Cornwall, Great Britain.
- Yazbeck G.M., Kalapothakis E. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes). Genet. Mol. Res. 6 (4): 1026-1034

8. APÊNDICES

Apêndice 01: Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos de *P. lineatus*.

| Haplótipo: | Cuiabá | Coxim | Paraná I | Paranapanema | Paraná II | Tietê | Miranda | Uruguai | Grande | Paranaíba | Sucuriú |
|------------|--------|-------|----------|--------------|-----------|-------|---------|---------|--------|-----------|---------|
| | (11) | (22) | (28) | (29) | (30) | (26) | (26) | (29) | (30) | (28) | (17) |
| Hap_1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_4 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_6 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_7 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_8 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_9 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_10 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_13 | 0 | 2 | 0 | 0 | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hap_14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_16 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_17 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_18 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_19 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_20 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_21 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_22 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_23 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_24 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_25 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_26 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_27 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_28 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_29 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 4 | 3 | 0 | 0 | 0 | 1 |

| | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_30 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_31 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Hap_32 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_33 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_34 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_35 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_36 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| Hap_37 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_38 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_39 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_40 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_41 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 5 | 1 |
| Hap_42 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_43 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_44 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_45 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_46 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_47 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_48 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_49 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_50 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_51 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_52 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_53 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_54 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_55 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_56 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_57 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_58 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_59 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 |
| Hap_60 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_61 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_62 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_63 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_64 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_65 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_66 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_67 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_68 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_69 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_70 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_71 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_72 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_73 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hap_74 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 4 | 3 | 0 | 0 |
| Hap_75 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 | 0 |
| Hap_76 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_77 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_78 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_79 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_80 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_81 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_82 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_83 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_84 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_85 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_86 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_87 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_88 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_89 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_91 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_92 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_93 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_94 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_95 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_96 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_97 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_98 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_99 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_101 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_102 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_103 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_104 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_105 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_106 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_107 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_108 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_109 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_110 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_111 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_112 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Hap_113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_114 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_115 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_116 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_117 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_118 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 |
| Hap_119 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| Hap_120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_121 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_122 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_123 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_124 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| Hap_125 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_126 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_127 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_128 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_129 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_130 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_131 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|----------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Hap_132 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| Hap_133 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |

Apêndice 02: Número de indivíduos por haplótipo e sua distribuição dentro dos grupos de *P. nigricans*.

| Haplótipo: | Araguaia | Iquitos | Madeira M | Madeira J | Manaus | Purus | Tapajos |
|------------|----------|---------|-----------|-----------|--------|-------|---------|
| | (7) | (29) | (22) | (28) | (30) | (32) | (7) |
| Hap_1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_3 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_4 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_5 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_6 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_7 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_9 | 0 | 15 | 3 | 12 | 18 | 0 | 0 |
| Hap_10 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_11 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_12 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_13 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_14 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_15 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_16 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_17 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_18 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_19 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_20 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_21 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_22 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_23 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_24 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_25 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_26 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_27 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_28 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_29 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_30 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_31 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_32 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_33 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_34 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_35 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_36 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_37 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_38 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_39 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_40 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_41 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_42 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_43 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_44 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 |
| Hap_45 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_46 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_47 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | |
|---------------|---|---|---|---|---|----|---|
| Hap_48 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 |
| Hap_49 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_50 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_51 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_52 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| Hap_53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 |
| Hap_54 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Hap_55 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| Hap_56 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 |
| Hap_57 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_58 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_59 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 0 |
| Hap_60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_61 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Hap_62 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| Hap_63 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Hap_64 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| Hap_65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |