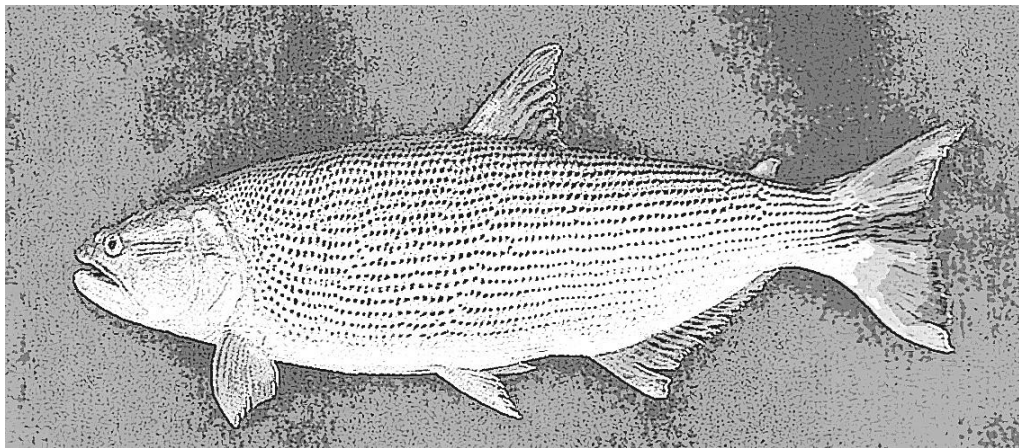


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS

LÍVIA ALICE DE CARVALHO MONDIN DE FREITAS

**Diversidade genética em Dourado (*Salminus  
brasilensis*, Curvier, 1816), uma espécie  
de grande interesse comercial no Pantanal  
Mato-grossense**



SÃO CARLOS, SP  
2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS**

**TESE DE DOUTORADO**

**Diversidade genética em Dourado (*Salminus brasiliensis*  
Curvier, 1816), uma espécie de grande interesse comercial no  
Pantanal Mato-grossense**

**Lívia Alice de Carvalho Mondin de Freitas**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas) área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior**

**SÃO CARLOS, SP**

**2010**

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

F866dg

Freitas, Livia Alice de Carvalho Mondin de.

Diversidade genética em Dourado (*Salminus brasiliensis* Curvier, 1816), uma espécie de grande interesse comercial no Pantanal Mato-grossense / Livia Alice de Carvalho Mondin de Freitas. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
129 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2010.

1. Conservação. 2. Dourado (Peixe). 3. DNA mitocondrial. 4. Diversidade genética. 5. Filogeografia. 6. Bacia Platina. I. Título.

CDD: 574.5247 (20<sup>a</sup>)

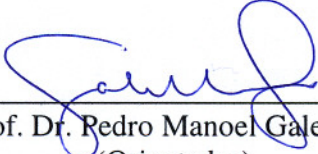
**Lívia Alice de Carvalho Mondin de Freitas**

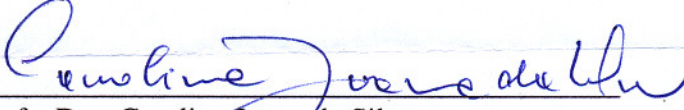
**Diversidade genética em Dourado (*Salminus brasiliensis*, Curvier, 1816), uma espécie de grande interesse comercial no Pantanal Mato-grossense**

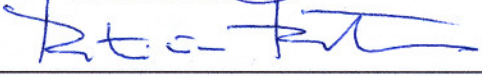
Tese apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências.

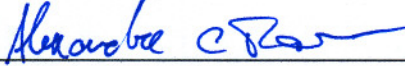
**Aprovada** em 18 de junho de 2010

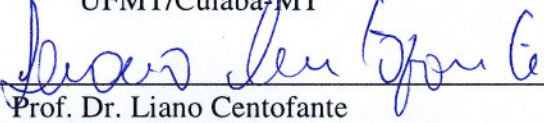
**BANCA EXAMINADORA**

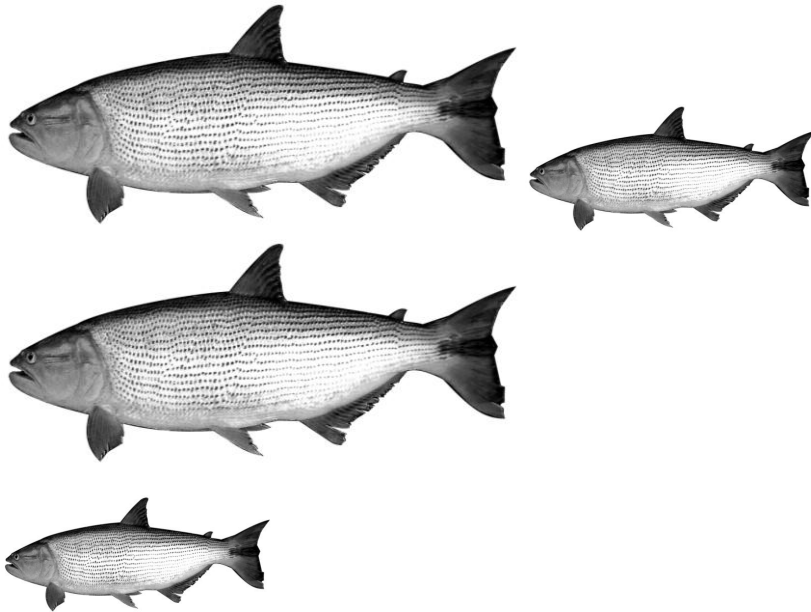
Presidente,   
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Júnior  
(Orientador)

1º Examinador   
Profa. Dra. Carolina Joana da Silva  
PPGERN/UFSCar

2º Examinador   
Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas  
PPGGEV/UFSCar

3º Examinador   
Prof. Dr. Alexandre Cunha Ribeiro  
UFMT/Cuiabá-MT

4º Examinador   
Prof. Dr. Liano Centofante  
UFMT/Cuiabá-MT



*Dedico esta tese ao meu esposo Gianni e minha amada filha Giulia, que a cada momento me apoiaram incondicionalmente. Sem eles meus dias se tornariam cinzentos diante do imenso compromisso e da distância que nos separou por alguns meses. Ao mais novo membro dessa amada família, Lucas, que hoje nada vai entender dessas palavras, mas no amanhã perceberás que desde o ventre sempre foi amado. A minha mãe e ao meu pai que jamais mediram esforços para me ajudar durante essa caminhada.*

**AMO IMENSAMENTE TODOS VOCÊS!**

## AGRADECIMENTOS

*Primeiramente agradeço a Tí Senhor, que guiou meus passos e esteve ao meu lado a todo o momento não deixando que eu me esmorecesse no caminho, pelo contrário, me fortaleceu a cada dificuldade encontrada mostrando-me que era possível vencer. Obrigada!*

*Agradeço as Universidades UFSCar e UNEMAT pela oportunidade de qualificação através do convênio firmado para a realização desse doutorado, e também a FAPEMAT que propiciou o financiamento de parte desse projeto de capacitação docente.*

*Ao CNPq e a FAPESP que financiam projetos de pesquisas que possibilitam as atividades do laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética da UFSCar onde foi desenvolvida toda a parte prática desse trabalho.*

*Ao meu orientador, Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr pela atenção, confiança e apoio durante todo esse processo. Pela oportunidade de trabalhar com uma equipe maravilhosa e poder fazer parte de sua grande “família científica”.*

*Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais/UFSCar, na pessoa do Prof. Dr. José Eduardo e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Joana da Silva que foram os verdadeiros responsáveis por esse convênio de doutorado entre as IES. Coordenando todo o grupo durante os 4 anos de caminhada, promovendo nossos encontros periódicos e impulsionando-nos à seguir em frente.*

*Aos professores membros do Programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais e aos professores membros do Programa de pós-graduação em Genética e Evolução pelo aprendizado oportunizado nas disciplinas ofertadas.*

*Aos amigos do laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética da UFSCar que foram muuuuuuuuito importantes para a realização desse trabalho. Cada um do seu jeito, sempre dispostos e prontos a me ajudar e ensinar naquilo que fosse preciso. Pelo carinho, pela companhia nos almoços, por tudo... Sou muito grata e feliz por terem feito parte dessa história comigo.*

*A grande amiga Sandra Mariotto, uma gaucha de fibra, na qual procuro me espelhar principalmente na capacidade de organizar seu tempo e conseguir fazer tudo que planeja. Obrigada! Amiga, por sempre me apoiar, por estar comigo em momentos importantes da minha vida, pelas copanhinhas nos congressos, por trabalharmos juntas à tantos anos.*

*A amiga Michelli “MI” que tantas vezes me acolheu em sua casa, me fez companhia nos finais de semana, não deixando que os momentos de saudades de casa fossem maiores e mais tristes.*

*A amiga Elizangela que me abriu as portas de sua casa onde por vários meses morei em um dos quartos. Obrigada pelo carinho de sua amizade sincera.*

*Ao amigo Luís Fernando "Fefê", que muito me ajudou neste trabalho, me explicando sobre os programas de análise, ensinando-me a usá-los, entre outras atividades de laboratório e de leitura dos artigos. Acabei dando a ele a denominação de "Co" coordenador. Valeu!!! sua grande ajuda, Co.*

*Aos amigos e companheiros de estrada Mara e Josué, pela amizade, companherismo e perseverança. Junto enfrentamos inúmeras barreiras neste período de qualificação dentro do nosso campus de trabalho, mas nenhuma delas foi suficiente para nos fazer desistir, e quando um desanimava o outro sempre estava ali presente pra levantar o astral e não deixar a peteca cair. Quem tem verdadeiros amigos nunca está sozinho !!! Estaremos juntos em muitas outras lutas... Aguardem!*

*As companheiras da "kit-mansão" Tangará, Lina e Adélise, pela amizade, pelas viagens Cuiabá-Tangará-Cuiabá, pelas conversas animadoras e momentos agradáveis que passamos juntas.*

*A amiga Darcí Bezerra pelo contato com os pescadores de Cáceres e obtenção de alguns materiais para realização desta pesquisa. Pela sua amizade e auxílio na época em que estive dando aulas na UNEMAT-Cáceres. Valeu!!! Darcizinha!*

*Aos colegas da turma de doutorado, que mesmo diante inúmeros obstáculos encontrados todos conseguiram o almejado no final. Pena! Que acabaram os churrascos de encerramento dos encontros, e disciplinas... Aléx! Acho que merecíamos um em comemoração às 25 defesas, hein!!!!*

*Ao Fernando testa, pela ajuda inicial nos trabalhos de laboratório. Pela conversa divertida e paciência em ensinar-me.*

*Ao Técnico e amigo Assis Rondon pelos dias de coleta de material, sua ajuda foi fundamental, Obrigada!*

*Aos amigos Waldó e Claumir pela ajuda na coleta do rio Paraguá e Sepotuba que acabaram virando pescarias divertidas. Por me ensinar a pesca de rodada, tirando que, quase caí do barco, tudo bem!!!!*

*Ao professor e pesquisador Dr. Evoí Zaniboni-Filho e Josiene pelas amostras de dourado cedidas para análise da sub-bacia do Uruguai.*

*A EMBRAPA-Pantanal na pessoa das pesquisadoras Dr<sup>a</sup> Emiko Kawakami de Resende e Dr<sup>a</sup> Débora Karla Marques pelas amostras de dourado do pantanal de MS.*

*Aos alunos da UNEMAT que fizeram parte das minhas disciplinas nas turmas de 2007/2 e 2008/1 e 2 que abraçaram minha causa e até exemplares de dourados do Sepotuba coletaram pra mim. Compreenderam o semestre de aula condensada e até hoje me procuram demonstrando carinho e interesse pelo trabalho concluído. Encontramos poucos alunos como vocês hoje!! Obrigada!*

*Agradeço ao PG Kairós pela força espiritual e as orações que me deixaram mais confiante na presença da mão Divina em minha vida. Obrigada queridos irmãos pelo apoio e carinho de todos vocês.*

*Agradeço a minha família por ter acreditado em mim e me apoiado durante esses quatro anos em tudo que precisei. Por ter agüentado meus dias de stress, mau humor, nervosismo, ausência em datas comemorativas, por terem compreendido o momento vivido. Vocês são minha fortaleza, se tudo agüentei, superei e seguí em frente foi pela certeza de que sempre estariam comigo.*

*Em especial quero agradecer ao meu marido, companheiro, confidente, amigo. Não tem palavras que possam expressar minha gratidão a você "coração", pois se tem alguém que foi fundamental para que eu pudesse estar hoje escrevendo esta tese, essa pessoa é você. Agradeço a Deus por ter me dado jóia tão rara de presente. Obrigada pela sua compreensão, seu amor imenso, sua paciência extrema, sua dedicação a nossa filha e ao nosso lar durante a minha ausência. Suas queixas foram mínimas, como um grão de areia, comparada a ajuda que sempre me deu. EU TÊ AMO MUITÍSSIMO!!!!*

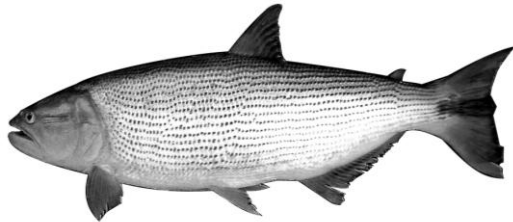
*Não podia deixar de agradecer a você minha pequenina Giulia, que com seus 3-4 aninhos surpreendeu a todos na bravura de um adulto, compreendendo a distância e a ausência da mamãe por alguns meses. Meu coração partido se agrarrava na esperança de que aquele era um momento passageiro. E quando ele olhava seu rostinho sereno na figura de um anjo que parecia dizer: saudade existe mamãe, mas estou bem, fique tranqüila! E volte logo. Ele se debruçava no laboratório e atividades para poder voltar para seu lado e do papai. Obrigada, linda! Amo você!!!*

*Obrigada, Mãe e Pai, por todo apoio dado a Giulia, ao Gianni e a mim durante os meses que fiquei fora trabalhando na tese. Obrigada por cuidarem de mim até hoje,rsrsrsr pelo carinho e amor. Amo Vocês.*

*Peço desculpas se me esqueci de colocar o nome de alguém, na verdade se fosse listar o nome de todos e todas que foram importantes durante esses anos em minha vida, esses agradecimentos ficariam maiores que o corpo da tese em si. Sou grata a todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desta tese de doutorado, que passaram por minha vida e fizeram parte deste período da minha história. Todos vocês são importantes e ocuparam o seu espaço e eu agradeço por isso.*

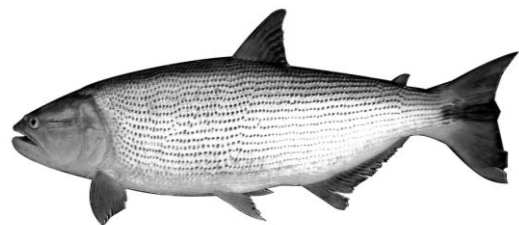
*A todos o meu MUITÍSSIMO Obrigada!!!!*





**“É imoral pretender que uma coisa desejada se realize magicamente, simplesmente por que a desejamos. Só é moral o desejo acompanhado da severa vontade de prover os meios da sua execução”**

**(Ortega e Gasset)**



**“ ...Dois pontos de vista? Há uma dúzia de pontos de vista até que a resposta correta seja conhecida”.**

**C.S.Lewis (1945).**

## RESUMO

*Salminus brasiliensis* é um peixe migrador distribuído em toda bacia do Prata. Denominado “rei do rio”, o dourado está entre os mais almejados na pesca esportiva e/ou profissional. Porém, em algumas regiões está sendo considerada uma espécie vulnerável. Relatos recentes demonstraram a existência de algumas populações de peixes migradores geneticamente estruturadas dentro de uma mesma bacia. Considerando que a avaliação da variabilidade e estrutura genética em populações naturais é de grande importância para conservação dessa espécie, este estudo objetivou primeiramente abordar esta questão em populações de *S. brasiliensis* na região do Pantanal Mato-grossense, verificando a existência de estruturação ou não nessa região, por meio de marcadores de DNA mitocondrial. Depois foi realizada uma abordagem filogeográfica para discutir aspectos referentes à genética evolutiva desse grupo de peixes, sua distribuição por toda bacia e sua relação com a história de formação das bacias; uma relação entre o pantanal e a bacia do Paraná e do Uruguai. Os resultados mostraram alta diversidade genética e ausência de estruturação, sugerindo fluxo gênico entre populações das localidades norte e sul do Pantanal, provavelmente facilitada pela habilidade migratória da espécie e pelas características ecológicas da região. A presença de haplótipos raros compartilhados evidencia esse padrão, embora variantes exclusivos ocorram em cada rio estudado. Quanto aos aspectos filogeográficos do grupo nas limitações da bacia do rio da Prata, foi verificado um contato histórico antigo entre a sub-bacia do Paraná e o Alto Paraguai, provavelmente ocorrido no momento da formação do Pantanal. No entanto, análises revelaram um distanciamento genético atual entre as populações de dourado nessas duas áreas. Estruturação genética só foi observada para o Paraná, sendo que Uruguai e Pantanal demonstraram similaridade genética. Entretanto, é importante continuar a avaliação e o monitoramento da diversidade genética das populações naturais do dourado para confirmar se com outros marcadores moleculares ocorrerá o mesmo padrão ora encontrado no Pantanal e nas demais regiões analisadas.

**Palavras-Chave:** Dourado. DNAm. diversidade genética. Filogeografia. Bacia Platina.

## ABSTRACT

*Salminus brasiliensis* is a migratory fish which is distributed in all parts of the rio de la Plata Basin. The “Dourado” is called “the king of the river”. It’s one of the most sought after fish by amateur and/or professional fishermen. However, in some regions it is considered to be a vulnerable species. Recent reports have shown the existence of some populations of migratory fish that are genetically structured in the same basin. Considering that the evaluation of variability and genetic structure in natural populations is of great importance for conservation of this species, this study has the objective of examining this question in the populations of *S. brasilienses* in the region of the Pantanal in Mato Grosso by verifying the existence or not of the genetic structure by means of markers of mitochondrial DNA. Later a phylogeographic approach was carried out to investigate the aspect of genetic evolution of this group of fish, its distribution in all the basin and its relation with the history of the formation of the basins- the relation between the Pantanal, the Parana and Uruguay Rivers Basins. The results shown high genetic diversity and absence of genetic structure, suggesting gene flow between populations of north and south of the Pantanal, probably facilitated by the migratory ability of the species and by the structural characteristics of the region. The presence of shared rare haplotypes evidences this pattern even though exclusive variants occur in each river studied. In relation to the phylogeographic aspects of the group in the limits of the basin of the Rio de la Plata, an old historical contact was verified between the sub-basin of the Parana and Upper Paraguay Rivers, probably occurring at the moment of the formation of the Pantanal. However, analyses has disclosed a current genetic distance between the populations of “Dourado” in these two areas. Genetic structure was only observed in the Parana River Basin. The Uruguay River Basin and the Pantanal demonstrate genetic similarity. However, it is important to continue evaluation and monitoring of genetic diversity of the natural populations of “Dourado” to confirm if with other molecular markers if the same pattern will occur as the on in the Pantanal and in the other regions that have been analyzed.

Word-Key: “Dourado, DNAMt, genetic diversity, Phylogeography, Platina Basin

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b> – Distribuição das espécies de <i>Salminus</i> na América do Sul.....	18
<b>Figura 02</b> – <i>Salminus brasiliensis</i> (Cuvier, 1816).....	19
<b>Figura 03</b> – Bacia hidrográfica estudada e seus respectivos locais de coleta.....	38
<b>Figura 04</b> - Rede de haplótipos de <i>S.brasiliensis</i> referente ao marcador molecular Cit b. <b>Em A:</b> Análise evidenciando o relacionamento entre norte e sul do pantanal. <b>Em B:</b> Análise evidenciando o relacionamento entre os rios.....	53
<b>Figura 05</b> – Gráfico da curva de distribuição das diferenças “ <i>mismatch distribution</i> ” obtidos para as seqüências do fragmento do Cit de <i>S.brasiliensis</i> do Pantanal Mato-grossense.....	54
<b>Figura 06</b> – Rede de haplótipos de <i>S.brasiliensis</i> referente à região controle (D-loop). <b>Em A:</b> Análise evidenciando o relacionamento entre pantanal norte e sul. <b>Em B:</b> Análise evidenciando o relacionamento entre os rios.....	60
<b>Figura 07</b> – Gráfico da curva de distribuição das diferenças “ <i>mismatch distribution</i> ” obtidos para as seqüências do fragmento da região controle (D-loop) de <i>S.brasiliensis</i> do Pantanal Mato-grossense.....	61
<b>Figura 08</b> – Rede de haplótipos de <i>S.brasiliensis</i> referente ao marcador molecular Cit b evidenciando o relacionamento entre três as sub-bacias.....	73
<b>Figura 09</b> – Gráficos da distribuição das diferenças (“ <i>mismatch distribution</i> ”) obtidos para as seqüências do fragmento do Cit b de <i>S.brasiliensis</i> . Em: <b>A</b> Padrão de curva apresentado na análise conjunta das sub-bacias (Pantanal, Paraná e Uruguai); <b>B</b> Sub-bacia do Uruguai; <b>C</b> Sub-bacia do Pantanal e <b>D</b> Sub-bacia do Paraná.....	75
<b>Figura 10</b> – Árvore gênica utilizando <i>neighbor joining</i> para as seqüências do fragmento do Cit b de <i>S. brasiliensis</i> das diferentes localidades estudadas.....	76
<b>Figura 11</b> – Rede de haplótipos de <i>S.brasiliensis</i> referente à região controle (D-loop), evidenciando o relacionamento entre as três sub-bacias.....	82
<b>Figura 12</b> – Gráficos da distribuição das diferenças (“ <i>mismatch distribution</i> ”) obtidos para as seqüências do fragmento da região controle de <i>S.brasiliensis</i> . Em: <b>A-</b> Padrão de curva apresentado na análise conjunta das sub-bacias (Pantanal, Paraná e Uruguai); <b>B-</b> Sub-bacia do Uruguai; <b>C-</b> Sub-bacia do Pantanal e <b>D-</b> Sub-bacia do Paraná.....	83
<b>Figura 13</b> – Árvore gênica utilizando <i>neighbor- joining</i> para o fragmento da região controle de <i>S.brasiliensis</i> das diferentes localidades estudadas.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 01</b> – Relação dos <i>primers</i> universais que foram utilizados na amplificação do <i>loci</i> mitocondriais.....	41
<b>Tabela 02</b> – Haplótipos de <i>S.brasiliensis</i> do Pantanal Mato-grossense e suas frequências, encontrados com o marcador Cit b.....	49
<b>Tabela 03</b> – Mudanças sinônimas e não sinônimas de aminoácidos no fragmento do gene Cit b de <i>S.brasiliensis</i> do Pantanal Mato-grossense.....	49
<b>Tabela 04</b> – Diversidade genética de <i>S.brasiliensis</i> referente à análise do gene Cit b.....	51
<b>Tabela 05</b> – Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de <i>S. brasiliensis</i> no Pantanal, para o gene Cit b.....	51
<b>Tabela 06</b> – Análise da variância molecular (AMOVA), $F_{ST}$ , entre as populações de <i>S. brasiliensis</i> coletados no Pantanal Norte e Sul, para o gene Cit b.....	52
<b>Tabela 07</b> – Valores de $F_{ST}$ par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene Cit b de <i>S. brasiliensis</i> .....	52
<b>Tabela 08</b> – Haplótipos de <i>S.brasiliensis</i> do Pantanal Mato-grossense e suas frequências, encontrados com o marcador da região controle (D-loop).....	55
<b>Tabela 09</b> – Diversidade genética de <i>S. brasiliensis</i> referente à análise da Região Controle (D-loop).....	57
<b>Tabela 10</b> – Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de <i>S. brasiliensis</i> no Pantanal (D-loop).....	58
<b>Tabela 11</b> – Análise da variância molecular (AMOVA), $F_{ST}$ , entre as populações de <i>S. brasiliensis</i> coletados no Pantanal Norte e Sul.....	59
<b>Tabela 12</b> – Valores de $F_{ST}$ par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências da região controle (D-loop) de <i>S. brasiliensis</i> .....	59
<b>Tabela 13</b> – Variações encontradas no fragmento seqüenciado do Cit b para <i>S. brasiliensis</i> , número e frequência de haplótipos em cada sub-bacia.....	70
<b>Tabela 14</b> – Diversidade genética observada nas populações de <i>S.brasiliensis</i> para cada sub-bacia.....	71
<b>Tabela 15</b> – Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de <i>S. brasiliensis</i> nas sub-bacias do Prata.....	71
<b>Tabela 16</b> – Análise da variância molecular (AMOVA), $F_{ST}$ , entre as populações de <i>S.brasiliensis</i> no Pantanal, Paraná e Uruguai.....	72
<b>Tabela 17</b> – Testes de neutralidade aplicados as seqüências do fragmento do Cit b de <i>S. brasiliensis</i> em cada uma das sub-bacias amostradas.....	73
<b>Tabela 18</b> – Variações encontradas no fragmento seqüenciado da região controle para <i>S. brasiliensis</i> , número e frequência de haplótipos em cada sub-bacia.....	78
<b>Tabela 19</b> – Diversidade genética observada nas populações de <i>S.brasiliensis</i> de cada sub-bacia.....	80

<b>Tabela 20</b> – Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de <i>S. brasiliensis</i> de cada sub-bacia.....	80
<b>Tabela 21</b> – Análise da variância molecular (AMOVA), $F_{ST}$ , entre as populações de <i>S. brasiliensis</i> no Pantanal, Paraná e Uruguai.....	81
<b>Tabela 22</b> – Testes de neutralidade aplicados a cada uma das populações de <i>S. brasiliensis</i> amostradas referentes à região controle (D-loop).....	82

## SUMÁRIO

<b>I – APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>II – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
II.1- O grupo <i>Salminus</i> e a espécie <i>S. brasiliensis</i> .....	18
II.1.a. - <i>Salminus brasiliensis</i> (Cuvier, 1816).....	19
II.2- O Pantanal Mato-grossense e um resumo de sua história geomorfológica.....	22
II.2.a- Contexto geomorfológico do pantanal.....	27
II.3- Contexto geral das bacias, do Paraná e do Uruguai.....	29
II.4 – Análises genéticas na resolução de problemas populacionais em peixes.....	31
<b>III – OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
III. 1 - Objetivo geral .....	36
III.2 - Objetivos específicos.....	36
<b>IV - MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
IV.1- Caracterização da área de estudo.....	37
<b>IV.2- Material.....</b>	<b>37</b>
IV.2.a-Coleta das amostras.....	37
<b>IV.3- Métodos.....</b>	<b>39</b>
IV.3.1- Protocolo de extração de DNA por Tampão Salino (Aljanabi & Martinez, 1997) com algumas modificações.....	39
IV.3.2- Protocolo de extração de DNA por Fenol Clorofórmio proposto por Bardakdi & Skibinski, (1994) adaptado por Povh <i>et.al.</i> , (2005).....	40
IV. 3.3- Eletroforese em gel de Agarose.....	41
IV. 3.4 - Amplificação das seqüências de DNA mitocondrial.....	41
IV.3.4.a - Reações de PCR para o gene Citocromo b.....	42
IV.3.4.b.- Reações de PCR para a região controle – D-loop.....	42
IV. 3.5- Purificação dos fragmentos de PCR.....	42
IV.3.5.a – Purificação dos produtos de PCR mediante kit de purificação específico.....	43
IV.3.5.b - Purificação dos produtos de PCR mediante PEG – polietilenoglicol 8000.....	43
IV. 3.6 - Análise estatística dos dados.....	45
<b>V – RESULTADOS:.....</b>	<b>47</b>
<b>V.1- Análise da variabilidade e estrutura genética populacional de <i>Salminus brasiliensis</i> no Pantanal Mato-grossense.....</b>	<b>48</b>
V.1.2 - Citocromo b (Cit b).....	48
V.1.3 - Região Controle (D-loop).....	54
V.1.4 – Discussão.....	61
<b>V.2- Análise filogeográfica e variabilidade genética de <i>Salminus brasiliensis</i> na bacia do Prata: Uma comparação entre o Pantanal e as sub-bacias do Paraná e Uruguai....</b>	<b>69</b>
V.2.1-Citocromo b (Cit b).....	69
V.2.1.a – Estimativas de variabilidade genética.....	69
V.2.1.b – Estimativas de estruturação populacional e inferência filogeográfica....	72

V.2.2- Região Controle (D-loop).....	77
V.2.2.a – Estimativas de variabilidade genética.....	77
V.2.2.b – Estimativas de estruturação populacional e inferência filogeográfica....	81
V.2.3 – Discussão.....	85
<b>VI- CONCLUSÕES.....</b>	<b>95</b>
<b>VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>96</b>
<b>VIII – ANEXOS.....</b>	<b>121</b>



## I – APRESENTAÇÃO

A região Neotropical possui a fauna de peixes de água doce mais diversificada do mundo em número de espécies (Nakatani *et.al.*, 2001; Buckup, 2007), são cerca de 6.000 espécies só para essa região (Nirchio e Oliveira, 2006). A distribuição dos peixes está intimamente ligada à gênese dos sistemas fluviais e apresenta uma longa e complexa história temporal de dispersão dos grupos (Lundberg, 1998; Lundberg *et.al.*, 1998; Buckup, 2007).

A separação dos continentes, Sul Americano e Africano, aliada à imensa variedade de ambientes ecológicos existentes (lagos, baías, riachos, corredeiras, planícies inundadas), podem ter proporcionado às espécies de Characiformes e Siluriformes o desenvolvimento de espetaculares irradiações adaptativas, além das variadas formas e estratégias de vida (Böhlke, 1978; Lowe-McConnell, 1999; Agostinho *et.al.*, 2007).

As inúmeras bacias hidrográficas da América do Sul fazem do grupo dos peixes uma fonte de recurso explorável altamente variada, porém, o conhecimento sobre essa ictiofauna ainda tem muitas lacunas nos aspectos: biológico, genético, ecológico, biogeográfico e outros. Para se compreender questões de diversificação de peixes é também necessário conhecer suas relações taxonômicas e sua distribuição no tempo e no espaço.

Em uma bacia hidrográfica os peixes podem estar distribuídos em grandes populações panmíticas ou podem constituir populações genéticas diferenciadas mantidas por fluxo gênico (Revaldaves *et.al.*, 1997; Wasko e Galetti, 2002). Mesmo peixes migradores que possuem a capacidade de deslocamento a grandes distâncias, tem revelado populações geneticamente diferenciadas (Wasko e Galetti, 2002; Hatanaka e Galetti, 2003; Hatanaka *et.al.*, 2006).

Um das formas modernas de acessar informações e assegurar o conhecimento sobre populações naturais é o estudo genético molecular. O uso de técnicas moleculares vem sendo crescentemente empregado em análises genéticas populacionais ampliando o horizonte do conhecimento sobre os recursos genéticos existentes, bem como, sua distribuição geográfica embasada em componentes históricos e/ou filogenéticos da estrutura populacional, como ferramentas geradoras de informações imprescindíveis para a conservação desses recursos de diferentes espécies (Frankham *et.al.* 2008).

A redução no tamanho populacional das espécies leva a perda da diversidade genética e limita seu potencial de adaptação em resposta às mudanças ambientais (Frankham

*et.al.*, 2008). A IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) pontua a conservação da diversidade genética como uma das três prioridades global necessária à manutenção da biodiversidade (Frankham *et.al.*2008).

Desta forma, este estudo aborda a análise genética da população natural de dourado (*Salminus brasiliensis*, Curvier,1816), uma espécie de peixe da fauna Sul-Americana, de ampla distribuição geográfica e grande interesse econômico, apresentando algumas informações a respeito do seu comportamento genético e variabilidade dentro de uma das grandes áreas alagáveis da biosfera “o Pantanal Mato-grossense”; além de, iniciar a construção de um conhecimento a cerca da história genética evolutiva dessa espécie na bacia do rio da Prata.

## II – INTRODUÇÃO

### II. 1 – O grupo *Salminus* e a espécie *S. brasiliensis*

*Salminus* é um grupo de peixes bastante popular e muito apreciado na pesca e gastronomia, conhecidos por dourados, dourada branca e tabarana. Apesar da popularidade e importância das espécies esse gênero ainda apresenta lacunas taxonômicas, embora dois aspectos têm sido evidenciados no grupo, o monofiletismo muito bem sustentado (Lima, 2006) e a relação de proximidade com o gênero *Brycon* registrada em análises filogenéticas do gênero com os demais Characiformes (Orti e Meyer, 1997; Calcagnotto *et.al.*, 2005) e em estudos osteológicos (Malabarba, 1998).

Pertencem à ordem Characiformes e estão incluídos na família Characidae *Incertae sedis* (sensu Lima *et.al.*, 2003). Possui uma enorme sinonímia, porém apenas cinco espécies são consideradas válidas hoje e amplamente distribuídas na América do Sul (Figura 1) (Lima, 2006):

# *Salminus affinis* (Steindachner, 1988) – presente nas bacias transandinas dos rios Magdalena, Rancheria e Sinú, Colômbia;

# *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816) – sinônimo sênior de *Salminus maxillosus* (Valenciennes) - presente nos sistemas dos rios Paraná, Paraguai e Uruguai, sistema do rio Jacuí no estado do Rio Grande do Sul e bacia do alto rio Madeira;

# *Salminus hilarii* (Valenciennes, 1850) – presente nas bacias dos rios São Francisco e Alto Paraná, além do rio Jaguaribe, no nordeste brasileiro;

# *Salminus iquitensis* (Nakashima, 1941) – presente nos sistemas dos rios Araguaia e Tocantins, Alto Amazonas e rio Orinoco;

# *Salminus franciscanus* (nova espécie) - endêmica da bacia do rio São Francisco (Lima e Britiski, 2007).

Por tanto, a taxonomia de *Salminus* pode ser apresentada da seguinte forma:

Super Classe: Pisces

Classe: Osteichthyes

Sub Classe: Actinopterygii

Ordem: Characiformes

Subordem: Characoidea

Família: Characidae (*Incertae Sedis*)

Gênero: *Salminus* (Agassiz, 1829)

Espécie: *Salminus affinis* (Steindachner, 1988)

*Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816)  
*Salminus hilarii* (Valenciennes, 1850)  
*Salminus iquitensis* (Nakashima, 1941)  
*Salminus franciscanus* (nova espécie, 2007)

Nome comum: dourado, dourado branco, tabarana (Brasil); pira-yu, pirayú, dorado (Argentina, Uruguai, Paraguai); sábalo dorado (Perú)



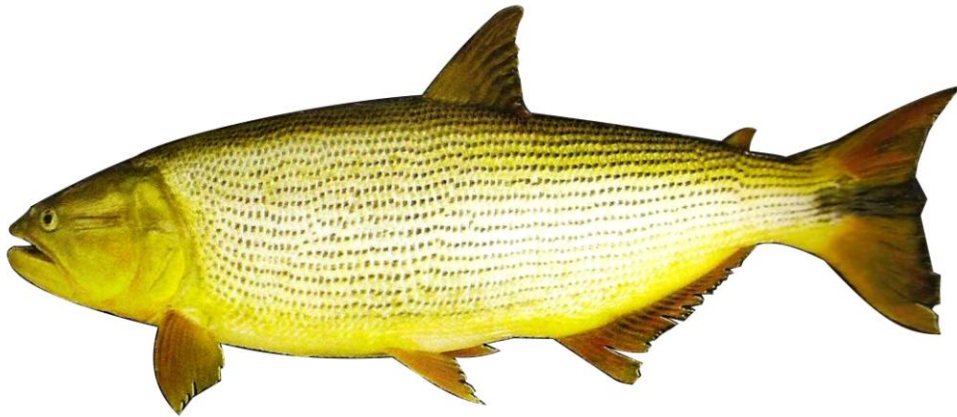
Fonte: mapa retirado de : [www.america-sul.com/mapa-america-sul.htm](http://www.america-sul.com/mapa-america-sul.htm), com alterações.

**Figura 1** – Distribuição das espécies de *Salminus* na América do Sul. Em ● *Salminus affinis*; ● *Salminus iquitensis*; ● *Salminus hilarii*; ● *Salminus franciscanus*; 🐟 *Salminus brasiliensis*.

São peixes predadores, principalmente ictiófagos, habitam principalmente os grandes rios, e realizam migrações reprodutivas durante o período de chuvas (Godoy, 1975; Esteves e Pinto Lôbo, 2001).

### II.3.a. - *Salminus brasiliensis* (Cuvier, 1816)

Denominado pelos pescadores como “o rei do rio”, o dourado está entre as espécies mais populares e desejadas na pesca esportiva e profissional (Zaniboni-Filho e Schulz, 2003). Apresenta potencial viável para piscicultura, tendo alto valor de mercado (Fracalossi *et.al.*, 2002) e sendo bastante apreciado na gastronomia (Figura 2).



**Figura 2-** *Salminus brasiliensis* (Curvier, 1816).

Estes peixes têm sofrido acentuada redução de suas populações devido à construção de barragens, destruição de habitats, pesca predatória, introdução de peixes exóticos e a poluição (Agostinho *et.al.*, 1999; Agostinho, 2007). Já estando vulnerável na bacia do Paraná (Abilhoa e Duboc, 2004), vulnerável à extinção na lista de espécies ameaçadas do Rio Grande do Sul (Marques *et.al.*, 2002), vulnerável de máxima prioridade na bacia do rio da Prata, Argentina (Zayas e Cordiviola, 2007) e virtualmente extintos nos sistemas dos rios Grande, Tietê e Paranapanema (Rosa e Lima, 2008). Na Bacia do Paraguai não existe relato de vulnerabilidade do dourado, mas ele está entre as espécies mais pescadas, representando 3,2% do pescado (Mateus *et.al.*, 2004).

*S.brasiliensis* apresenta uma excelente atividade migratória possuindo capacidade biológica de se dispersar a longas distâncias; percorrendo de 100-500 km (Bonetto *et. al.* 1971) a 1440 km (Sverlij e Espinach Ros, 1986), sendo essas distâncias relatadas em

referência ao ponto de captura inicial. A migração exerce papel fundamental no sucesso reprodutivo desses peixes, pois permite a busca de ambientes adequados para a fertilização dos seus ovos (Agostinho, 2007).

O aspecto reprodutivo de *S.brasiliensis* é bastante conhecido, é um peixe de piracema que se reproduz nos trechos altos dos rios no período das cheias, coincidentemente com os meses mais quentes, de outubro a março (Godoy, 1975; Lima *et.al.*, 1986; Vazzoler e Menezes, 1992; Isaac-Júnior, 1999; Sverlij e Ros, 1986; Machado, 2003). Essa sazonalidade reprodutiva resulta da interação de fatores endógenos e fatores abióticos, como temperatura da água, fotoperíodo e precipitação atmosférica, que relacionados com o aumento do nível da água, atuam na maturação das gônadas, preparando-os para reprodução (Barbieri *et.al.*, 2000; Carolsfeld *et.al.*, 2003).

Durante a migração rio acima, grandes cardumes de dourado reúnem-se abaixo de obstáculos naturais aguardando a elevação do nível da água, pois após o aquecimento da água o seu nível é o único requisito limítrofe à continuidade do movimento migratório ascendente (Carolsfeld *et.al.*, 2003). Ao longo do rio Uruguai apenas três barreiras naturais bloqueiam o dourado durante períodos de águas baixas, nomeadas: Salto grande, Salto do Yucumã e Augusto César Gorge; as demais barreiras são facilmente transponíveis por que o dourado consegue perfeitamente saltar pequenas cachoeiras (Carolsfeld *et.al.*, 2003).

A capacidade reprodutiva nos machos inicia-se a partir do segundo ano de vida, quando os indivíduos apresentam tamanhos aproximados de 24 a 26cm e nas fêmeas inicia-se no terceiro ano de vida, quando o comprimento varia entre 30 a 38cm (Godoy, 1975).

Alguns trabalhos têm relatado adaptações desses peixes para contornar condições adversas a reprodução como as barragens (Agostinho *et.al.*, 1993; Machado, 2003). Por outro lado, as barragens podem levar ao desaparecimento da espécie ao longo do tempo, como verificado em Três Marias e Sobradinho (Sato, 1999).

Além da migração reprodutiva rio acima o dourado realiza migrações tróficas rio abaixo. Sua alimentação é bastante variável dependendo da fase de vida e da disponibilidade de presas no ambiente, sendo predominantemente piscívoro na fase adulta e tendo sua atividade alimentar intensificada nos meses quentes e chuvosos. As presas ingeridas são peixes menores dos mais diversos, alguns mais freqüentes que outros (Esteves e Pinto Lobo, 2001; Ribeiro e Nuñez, 2008). Além de peixes, podem completar sua dieta com insetos e crutáceos (Almeida *et.al.*, 1997). Na fase larval, ocorre inicialmente uma total absorção do

saco vitelínico e depois de três dias de idade as larvas começam a alimentar-se de plâncton, microcrustáceos, cladoceros, clopepodos e larvas de Odonata e Chironomidae (Morais Filho e Schubart, 1955; Zaniboni-Filho *et.al.*, 2004). O tipo e o tamanho do alimento ingerido pela larva dependem da fase do desenvolvimento (Ribeiro e Nuñez, 2008).

Embora a biologia, ecologia, migração e reprodução desses peixes já tenham merecido a atenção de muitos pesquisadores, poucos estudos estão disponíveis no que se refere à caracterização genética de *Salminus*. Tais pesquisas limitam-se à descrição do número cromossômico ( $2n=50$ ), ao padrão de distribuição de bandas C e análises de localização do rDNA 5S e 18S (Margarido e Galetti, 1999; Wasco e Galetti, 2000; Souza *et.al.*, 2008) e análises filogenéticas moleculares (Orti e Meyer, 1997; Calcagnotto *et.al.*, 2005). Estas juntamente com análises osteológicas (Malabarba, 1998) evidenciaram uma proximidade com o gênero *Brycon*, sugerindo-os como grupos irmãos.

Mais recentemente, análises da variabilidade genética e estruturação populacional realizadas em populações de *S. brasiliensis* da bacia do Uruguai e do Paraná (Machado *et.al.*, 2005; Ramella *et.al.*, 2006; Lopes *et.al.*, 2007) revelaram baixa diversidade e estruturação genética no grupo analisado, essa última condição, já é relatada também para outras espécies de peixes, em diferentes sistemas hidrográficos (Sivasundar *et.al.*, 2001; Wasco e Galetti, 2002; Hatanaka e Galetti, 2003; Sanches e Galetti, 2007; Calcagnotto e DeSalli, 2009).

## II. 2- O Pantanal Mato-grossense e um resumo de sua história geomorfológica

O Pantanal é considerado uma grande depressão aluvial sazonalmente alagável localizada no centro do continente sul-americano, extremo norte da bacia Platina; encontra-se totalmente contido na Bacia do Alto curso do rio Paraguai (Brasil, 1982b; Da Silva, 1990; Ab'Saber, 2007).

A Bacia do Alto Paraguai (BAP) ocupa uma área de aproximadamente 600.000 km na América do Sul (Harris *et.al.*, 2005). No Brasil foi delimitada e quantificada em 361.666 km, sendo que 38,24% são ocupados pela porção do Pantanal (Da Silva e Abdon, 1998). Encontra-se bordejada por um sistema de serras e chapadões, limitada ao norte pela Chapada dos Parecis e pela Serra de Cuiabá; ao sul pelo rio Apa; a leste pelas Serras da Bodoquena, Maracaju, São Domingos e pelo Pantanal; e a oeste pelo rio Paraguai e Repúblicas do Paraguai e da Bolívia (Valverde, 1972; Ab'Saber, 1988).

Apresenta regiões de planalto (59% da bacia) com altitudes acima de 250m, tendo um desnível altimétrico de cerca de 400-600m em relação à calha do rio Paraguai, sendo estas áreas de nascentes e de divisores geográficos com outras bacias brasileiras (Paraná, Araguaia- Tocantins e Amazonas). Apresenta também regiões de planície (41% da bacia), com altitudes abaixo de 250m cujo nível de base está entre 80 a 190m, sendo estas áreas de terras inundáveis conhecidas como Pantanal Mato-grossense (Valverde, 1972; Ab'Saber, 1988; Assine, 2003; Brasil, 2006c).

A área intermediária entre o planalto e a planície é denominada de Depressão do Alto Paraguai, e corresponde aos terrenos melhor drenados do norte da bacia sedimentar, bastante aplainados, com altitudes entre 150-250m, planícies fluviais que se desenvolvem nas margens dos rios Paraguai, Sepotuba e afluentes (PCBAP, 1997). O Pantanal depende sobremaneira das inter-relações entre essas diferentes áreas (Brasil, 2006c).

A extensa planície pantaneira está inserida na BAP entre as latitudes 15° 30' e 22 ° 30' Sul e longitudes 54 ° 45'e 58 ° 30' Oeste. A estimativa de sua área varia de 133.465 a 168.000 km, sendo em média reconhecida em 140.000 km (Ab'Saber, 1988; Da Silva e Abdon, 1998). Dessa área calculada, 48.865 km pertence ao estado de Mato Grosso abrangendo os municípios de Poconé, Santo Antonio do Leverger, Cáceres, Barão de Melgaço e Nossa Senhora do Livramento; e 89.318 km encontram-se no estado de Mato Grosso do Sul, englobando os municípios de Corumbá, Ladário, Rio Verde de Mato Grosso, Coxim, Miranda



e Aquidauana (Da Silva e Abdon, 1998). É formada por uma gigantesca rede hidrográfica que irriga as áreas situadas na depressão pantaneira, tendo como principal canal de escoamento o rio Paraguai que percorre toda sua extensão de norte a sul coletando águas dos vários leques aluviais que constituem seus afluentes e subafluentes (Povoas, 1977; Da Silva, 1990; Assine, 2003; Facincani, *et.al.*, 2006). Devido a diferentes características morfológicas e processos geológicos atuantes apresentados ao longo de seu trecho, o rio Paraguai foi subdividido por Almeida (1945) em quatro segmentos: Paraguai Superior; Alto Paraguai; Médio Paraguai e Paraguai Inferior. Posteriormente adotados e referenciados pelo IBGE (1977).

Os principais tributários do Rio Paraguai são, em sua margem direita, os Rios Jauru, Cabaçal e Sepotuba, na margem esquerda, os Rios Cuiabá (seus afluentes São Lourenço e Piquiri), Taquari, Negro, Miranda (com seu afluente Aquidauana) e Apa (Calheiros e Oliveira, 1999).

A drenagem da Planície Pantaneira é considerada um tanto complexa possuindo além de seus cursos principais outras vias de fluxo das águas como córregos; vazantes (linhas de drenagem sem canal bem definido); corixos e coixões (canais naturais pouco profundos de escoamento temporário, importante no desenvolvimento e migração dos peixes); sangradouros (córregos que apresentam diques marginais pouco desenvolvidos e cobertos por mata ciliar, ligam baías a rios e rios a rios, funcionam como corredores ecológicos na migração de peixes) e baías (lagoas de variadas formas, tamanhos e profundidade podendo ser perenes ou temporárias, isoladas ou conectadas, lagos e antigos meandros) (Da Silva e Silva, 1995; Da Silva, 1990; Calheiros e Oliveira, 1999; Da Silva, Abdo e Nunes, 2009).

Apresenta inundações periódicas que estão relacionadas às chuvas locais e aos mecanismos de drenagem da própria planície pantaneira que reduzem e atenuam o escoamento das águas, provocando a inundação prolongada em quase toda sua extensão (Alvarenga *et.al.*, 1984; Ponce, 1995), gerando períodos alternados de secas e enchentes (Segovia 2000).

A área de inundação dos leques aluviais que compõe a planície pantaneira apresenta em média 50.000 km, porém a duração da submersão é bastante variável podendo alcançar até seis meses em algumas áreas (PAE, 2004). O fluxo lento das águas do Pantanal, bem como, a permanência das enchentes está relacionado com a pequena declividade e a baixa capacidade de escoamento, cerca de 1 a 15cm/km no sentido norte-sul e de 30 a

50cm/km no sentido leste-oeste (Tucci, 1997; Brasil, 1974a), além da composição do solo distribuído nas diferentes áreas que compõe a planície.

Esta característica da região também proporciona ao Pantanal diferentes fisionomias, subdividindo-o em cerca de 9 a 10 pantanais com base nas características de inundação: Pantanal de Cáceres (inundação moderada oscilando entre três a cinco meses); Pantanal de Poconé (inundação de 3 a 5 meses); Pantanal do São Lourenço (inundação de 3 a 4 meses com algumas áreas mais elevadas de inundação curta); Pantanal do Paraguai (inundação estendida por mais de 6 meses); Pantanal do Taquari (ocupa a maior área do âmbito da bacia do alto Paraguai e é considerado o maior leque fluvial do mundo, inundação entre 3 a 4 meses); Pantanal do Abobral/Negro (permanece até 6 meses inundado); Pantanal do Aquidauana (inundado por até 6 meses); Pantanal do Miranda (inundação oscilante entre 4 a 6 meses); Pantanal do Nabileque (inundações persistem até 6 meses) e Pantanal de Porto Murtinho/Apa (inundação de 4 a 6 meses) (PCBAP,1997; Assine, 2003).

O rio Paraguai e seus afluentes escoam do Planalto para uma região muito plana onde sofrem uma redução drástica de velocidade devido à diferença de declividade em relação ao Pantanal, com isso durante as cheias ocorre o extravasamento do volume de água para além dos leitos dos rios. Como a planície pantaneira apresenta um grande número de depressões formadora de pequenos lagos, durante a cheia, quando o nível de água está alto, essas regiões se interligam criando uma única paisagem, represando novamente sua água depois que o nível do rio principal baixa (Tucci,1997; Tucci e Genz, 1997).

Essa dinâmica das águas, intercalando períodos de seca e enchentes, resulta em mudanças abruptas das condições ambientais nos habitats pantaneiros, atuando como um importante recurso para a renovação da vida na região. Associada aos conceitos de pulso de inundação, conectividade hidrológica e de corredor ecológico e cultural leva a entender toda a estrutura e funcionamento do Pantanal (Da Silva, Abdo e Nunes, 2009).

Além disso, exerce grande importância sobre a comunidade de peixes, principalmente no que se refere à disponibilidade de alimento e às fases da reprodução, especialmente para aquelas espécies de piracema que dependem do pulso de inundação para a realização de migrações e de desova (Da Silva e Silva, 1995; Moura, 2000), composta por indivíduos que investem seus recursos em uma única postura anual.

O movimento dos peixes acompanha o ritmo das águas, podendo realizar migrações ascendentes ou descendentes dependendo da espécie, raramente envolvem formações de grandes cardumes (Resende e Palmeira, 1999). Na estação das chuvas (de

outubro a abril) algumas espécies se deslocam desde o leito dos rios até as áreas inundadas, se reproduzindo durante a cheia. Outras, como as de grande porte e de interesse comercial e esportivo, nadam rio acima com a mesma finalidade, indo desovar na cabeceira do rio. Após a reprodução os adultos rodam rio abaixo se espalhando na planície inundada para se alimentar e recuperar as energias gastas na migração. As larvas e alevinos são carreados para esses mesmos locais (lagoas, vazantes, corixos) onde encontram abrigo e alimento abundante (Resende *et.al.*, 1996, PAE, 2004). Na vazante, período em que as águas estão baixando, coincidente com o fim da cheia (de abril a maio), os peixes saem das áreas alagadas e voltam em direção ao leito dos rios por meio dos canais de drenagem. Na estação de seca, por volta de junho a outubro, as espécies que não migraram enfrentam baixos níveis de oxigênio em águas rasas e mornas de algumas baías. Essas espécies retidas durante as secas nesses ambientes constituem a principal fonte de alimento para muitos componentes da fauna pantaneira como aves e jacarés (PAE, 2004). Resende *et.al.* (1996) ressaltam que os primeiros a se reproduzirem são os characídeos e os últimos os grandes bagres.

No Pantanal o pulso de inundação corresponde a um ciclo hidrológico anual relativamente previsível de forma que organismos adaptados a essa sazonalidade podem se sobressair no desenvolvimento de suas populações (Junk e Da Silva, 1999). A periodicidade do pulso produz um ambiente físico e químico que leva a biota a responder com adaptações morfológicas, anatômicas, fisiológicas, fenológicas e/ou etológicas (Junk *et.al.*, 1989). O seu atrelamento ao pulso pode ser fenotípico ou genotípico como demonstrado pela ictiofauna nos fenômenos ecológicos da Piracema e da Lufada (retorno dos peixes para a calha principal do rio) que propiciam a conectividade entre as áreas e as populações. A seleção de fenótipos é um passo importante para o aumento da diversidade genética e a formação de novas espécies (West-Eberhard, 1989).

No entanto, o Pantanal apresenta uma notável escassez de espécies endêmicas que pode estar relacionada ao desenvolvimento geológico relativamente recente que modificou o clima regional em úmido e seco. Aparentemente o número de espécies aumenta num gradiente de norte a sul, podendo-se atrelar a diferença na riqueza de espécies aos mesmos fatores químicos e físicos das diferentes áreas do Pantanal (Heckman, 1999). Na verdade inúmeros fatores se combinam e interagem para produzir os padrões encontrados na natureza que influenciam o limite de distribuição das espécies (Hall *et.al.*, 1992).

Existem atualmente descritas no Pantanal 269 espécies de peixes incluídas em cinco grupos dos quais os Otophysi representam 86% de toda ictiofauna da região, e estão

divididos entre: (1) Characiformes, com 11 famílias registradas sendo a mais complexa a família Characidae que agrupa peixes de grande interesse econômico, usados na aquarofilia, alimentação e criação em cativeiro; (2) Gymnotiformes, com cinco famílias e (3) Siluriformes, a grande massa de peixes do Pantanal, distribuídos em 10 famílias. Futuramente esse número pode ser superado já que várias áreas de difícil acesso para coletas ainda não foram exploradas e pesquisadas em toda extensão do Pantanal Mato-grossense, principalmente para aquelas regiões de planaltos que apresentam condições mais peculiares às espécies, capazes de abrigar organismos não descritos até o momento (Britski, 2007).

Como todo ambiente natural, o Pantanal também está exposto às ações perturbadoras que podem alterar sobremaneira seu ciclo natural, levando a descaracterizações de suas peculiaridades e aumentando a possibilidade do desaparecimento de espécies antes mesmo que sejam descobertas.

A força reguladora do ecossistema pantaneiro encontra-se no pulso de inundação e irregularidades no ciclo das águas podem representar um estress adicional aos organismos que já são adaptados a esse sistema (Junk e Da Silva, 1999; Junk, 1999), por tanto, ele é vulnerável as alterações provocadas por um conjunto de ações sociais como: a lixiviação de produtos agrícolas durante a enchente, a navegação no rio Paraguai, rodovias e construção de diques dentro do Pantanal, além de desmatamento, agropecuária sobre as veredas, garimpo, construção de hidrelétricas, queimadas, erosão e alterações nas cabeceiras dos rios que alimentam a planície pantaneira (Eberhard, 2000; Swarts, 2000; Da Silva *et. al.*, 2001; Seidl, *et.al.*, 2001; Casarin, 2007).

Toda a peculiaridade, riqueza e dinâmica própria tem tornado o Pantanal alvo de pesquisadores, agentes sociais e políticos de todo o mundo na busca de conhecimentos que possam mediar ações para um manejo adequado da região a fim de se manter e conservar a biodiversidade local. Tanto é que a porção brasileira do Pantanal foi declarada Patrimônio Nacional pela Constituição Federal Brasileira de 1988 (Capítulo VI- Do meio ambiente, Art 225, §4º) e reconhecida e aprovada pela UNESCO como reserva da biosfera e patrimônio natural da humanidade em 2000.

Contudo, o interesse por essa região é bem mais antigo. Desde a sua descoberta o Pantanal já despertava mitos e curiosidades, recebeu sua primeira denominação castelhana de “*Laguna de los Xarayes*” por volta de 1600, dos Jesuítas e outros religiosos que acreditavam ser a nascente das águas do Paraguai. Somente em meados de 1700 a região passou a ser conhecida como Pantanal, denominada pelos viajantes mamelucos paulistas em

suas expedições fluviais que definiram pantanais como campos alagados com várias lagoas e sangradouros (Costa, 2007). As duas denominações, a castelhana “*Laguna de los Xarayes*” com a luso-brasileira “Pantanal”, conviveram juntas por muitos anos, somente em 1750 e 1777, através das primeiras observações científicas determinadas pelo Tratado de Madrid e pelo Santo Ildefonso, respectivamente, ficou demonstrado que a afamada “*Laguna de los Xarayes*” nada mais era que o rio Paraguai espreado, em tempo de suas cheias. Deste então aquele lugar passou a receber o nome: Pantanal (Costa, 2007).

## **II.2.a- Contexto geomorfológico do Pantanal**

Em relação à história geomorfológica do Pantanal pode se verificar que toda sua dinâmica de funcionamento e características biológicas originou de uma seqüência evolutiva de eventos paleogeográficos condicionados por mudanças climáticas e tectônicas que permearam por milhares de anos intercalando-se entre períodos de estabilidade tectônica e intensos processos de atividade geológica.

O Pantanal Mato-grossense como o conhecemos hoje começou a se formar durante o Quaternário (Ab’Saber, 2007), mas precisamente na transição Pleistoceno/Holoceno (Assine, 2003). Evoluiu de forma subsequente à bacia sedimentar do Paraná como uma imensa depressão escavada em terrenos pré-cambrianos à margem dessa bacia. Sofreu notável processo de esvaziamento erosivo durante o soerguimento pós-cretáceo, atraindo toda drenagem da orla ocidental da bacia do Paraná (Almeida, 1949; Ab’Saber, 2007). Antes de iniciarem os processos de sua formação, o Pantanal era uma região dômica, elevada, que funcionava como barreira entre a “Zona Sub Andina” e a bacia do Paraná (Almeida, 1949; Ab’ Saber, 2007; Ribeiro, 2007).

Sua formação é resultado da reativação tectônica pós-pediaplano cuiabano que se desenvolveu como episódio de tectônica quebrável residual originada por falhas geomorfologicamente contrárias. À medida que essa tectônica se ampliou, a sedimentação espessou e coalesceu ao longo do espaço atualmente correspondente à bacia (Ab’Saber, 2007). Durante esta fase enfrentou variações climáticas agressivas, oriundas do processo de deglaciação que promoveu grandes mudanças no paleoclima em todo mundo, passando por uma modificação climato-hidrológica de condições subtropicais semi-áridas para condições tropicais úmidas; que contribuíram sobremaneira com processos de erosão, deposição e

sedimentação do substrato da bacia (Assine, 2003, Ab'Saber, 2007). Desde então a paisagem do Pantanal tem mudado numa adaptação ao clima do Holoceno.

No Pleistoceno Terminal, durante a fase mais seca, foram desenvolvidos os grandes leques aluviais arenosos, essenciais a configuração fisiográfica atual da região. Eram drenagens raquíticas, de canais anastomosados, rios de leitos trançados contidos entre bordos de grandes leques aluviais rasos. Com a mudança climática rápida no início do Holoceno formaram-se rios meândricos de diferentes padrões e potenciais e os sistemas de drenagens foram reorganizados, canais temporários se tornaram permanentes (Assine, 2003, Ab'Saber, 2007). À medida que o clima regional ganhou espaços quentes e úmidos novos cursos de água foram estabelecidos por entre os leques aluviais, os afluentes ocidentais do rio Paraguai. Essas planícies meândricas e os pantanais (wetlands), as terras sazonalmente inundáveis, se desenvolveram nos últimos 12 e 13 mil anos atrás, tempo necessário para se recompor a tropicalidade na depressão pantaneira de forma progressiva, penerizando rios, criando pantanais e enriquecendo a ictiofauna (Assine, 2003; Ab'Saber, 2007).

Em relação ao revestimento fitogeográfico a depressão pantaneira apresenta um mosaico de comunidades muito diferentes correlacionadas geralmente com a topografia (Britski, 2007), onde cada um possui espaço próprio no interior e no entorno da grande planície, a qual funciona como uma imensa depressão-aluvial-tampão e como receptáculo de componentes bióticos circunvizinhos; se comportando dessa forma como um delicado espaço de tensão ecológica (Ab'Saber, 2007).

### II.3 – Contexto geral das bacias, do Paraná e do Uruguai.

O Brasil, pela sua rica hidrografia, é o país de maior variedade de peixes, possuindo 2.122 espécies catalogadas, cerca de 21% das espécies do mundo (Menezes *et.al.*, 2003), e esse número pode ser superado. Só da região Centro-Oeste do país partem rios para quase todas as principais bacias hidrográficas brasileiras, tornando esta região conhecida como “o grande dispersor de águas”, tanto para o norte quanto para o sul do País (Souza, 1984). Uma das bacias de grande importância na região é a bacia Paraná-Paraguai, formada por rios de planície sendo os principais: o Paraná e o Paraguai que unidos aos rios Uruguai e Prata constituem a bacia Platina (Souza, 1984). Juntos, eles drenam uma área correspondente a 10,5% do território brasileiro e compreendem o 2º maior sistema de drenagem da América do Sul, com 3,2 milhões de km (Lowe-McConnell, 1999). Entretanto, o conhecimento dos peixes do grande sistema Paraná-Paraguai é muito limitado em relação ao tamanho e a complexidade de sua fauna (Böhlke, 1978).

É neste sistema que está inserido o Pantanal Mato-grossense, uma das maiores áreas alagáveis da América do Sul formada pela coalescência dos cursos d'água da bacia do Alto Rio Paraguai e detentora de grande biodiversidade. De acordo com Britski (2007) no Pantanal existem 269 espécies de peixes e todos podem ser incluídos em apenas cinco grupos: Otophysi, Cyprinodontiformes, Cichlidae, invasores marinhos e relitos.

O rio Paraná é o principal formador da bacia Platina e o segundo em extensão da América do Sul tendo aproximadamente 3.809 km (Agostinho e Júlio Júnior, 1999; Lowe-McConnell, 1999), drena uma imensa área do sul do escudo brasileiro onde ao longo do seu curso recebe na margem esquerda o rio Uruguai seguindo para o extremo sul do escudo (Lundberg *et.al.*, 1998). A porção do Alto Paraná inclui o norte do estado do Paraná, sul do Mato Grosso do Sul e a maioria do estado de São Paulo, sul de Minas Gerais e sul de Goiás, além de uma pequena área do Paraguai oriental (Castro *et.al.*, 2003).

Até a década de 80 existia um divisor natural na bacia “o Salto de Sete Quedas”, que a separava em duas províncias ictiofaunísticas distintas: o Alto Paraná (da confluência dos rios Paranaíba e Grande até as antigas Sete Quedas) e o Parano-Platense (das antigas Sete Quedas até a foz do rio Iguaçu) também chamado médio Paraná (Lowe-McConnell, 1999; Graça e Pavanelli, 2007). Com a construção da usina de Itaipú em 1982, essa barreira natural tornou-se transponível a algumas espécies de peixes do Médio Paraná

que se estabeleceram acima do divisor de bacias (Graça e Pavanelli, 2007). Como por exemplo, cardumes de dourado e curimba que passaram a utilizar o rio Piquiri (localizado acima dos antigos Saltos) como área de desova, e antes não eram vistos na área (Agostinho *et.al.*, 1993).

A ictiofauna do Paraná é estimada em 600 espécies. No entanto, só para a porção do Alto Paraná (considerada área de grande endemismo) foram listadas 221 espécies podendo chegar a 310 (Agostinho *et.al.*, 2007; Langeani *et.al.*, 2007). Entre o reservatório de Itaipú e a foz do rio Paranapanema foram registradas 182 espécies (Graça e Pavanelli, 2007). Não obstante das outras bacias da América do Sul o número de espécies dessa sub-bacia não é completamente conhecido.

O rio Uruguai nasce na Serra Geral com o rio Pelotas e segue uma extensão de 939 km até a foz do rio Peperi, da confluência deste continua mais 1.324 km para o sul marcando fronteira entre o Brasil e Argentina até se encontrar com o Paraná e formar o estuário do Rio da Prata, que por fim deságua no Atlântico. É considerado o rio mais novo da bacia Platina repousando sobre rochas sedimentares e vulcânicas que compõe a bacia do Paraná (Carolsfeld *et.al.*, 2003).

Sua fauna de peixes é similar a do rio Paraná, porém foram identificadas apenas 251 espécies (Hahn e Câmara, 2000). A espécie mais abundante e intensamente pescada na região é o *Prochilodus linatus* (curimbatá), seguido de *Schizodon nasutus* (ximborê) e *Pterodoras granulosus* (abotodado), podendo se destacar também outras espécies migratórias de interesse comercial e esportivo como o *Salminus brasiliensis* e *Luciopmenlodus pati* (pati). As espécies migradoras presentes no baixo rio Uruguai parecem adaptadas a usar a boca dos afluentes como áreas de criação em virtude da ausência de ambientes de várzea ideais ao crescimento das larvas (Carolsfeld *et. al.*, 2003). A fauna de peixes na região do médio Uruguai limita-se a descrição feita por Bertoletti *et. al.*(1989), onde foram encontradas 71 espécies intermediárias as regiões do alto e baixo Uruguai. Apesar de sua ictiofauna ser semelhante a do rio Paraná o processo migratório realizado por alguns peixes como o dourado e a piracanjuba é bastante diferente, esses peixes podem executar os dois movimentos migratórios de subida e descida, ao mesmo tempo. Nas regiões ao sul os principais migradores tem-se reproduzido mais no médio rio Paraná que no Uruguai (Carolsfeld *et. al.*, 2003).



#### II.4- Análises genéticas na resolução de problemas populacionais em peixes

No âmbito da crise pela qual a biodiversidade passa atualmente, inúmeras áreas das ciências naturais e sociais têm se unido num esforço mútuo para utilizar a investigação científica como ferramenta de conhecimento aplicada à conservação dos recursos naturais e resoluções de problemas. Nos últimos anos, cresceu a importância do uso de estudos genéticos na conservação das espécies. A genética tornou-se uma ferramenta importante na determinação de aspectos básicos da conservação como: **o que** conservar (com análises de **sistemática molecular** é possível identificar populações geneticamente vulneráveis); **onde** focalizar os esforços de conservação (por meio da **filogeografia** é possível identificar áreas de prioridade para determinadas espécies, envolvendo ancestralidade, ocupações anteriores entre outras coisas); e **como** conservar a maior quantidade de diversidade genética nas populações mantendo-se o potencial evolutivo (**genética de populações** que revelam o comportamento genético entre os grupos e indica o tamanho genético efetivo das populações) (Perez-Sweeney *et.al.*, 2004).

Na área da ictiologia análises genética são ferramentas muito úteis na caracterização da diversidade biológica, genética e evolutiva de populações naturais e cativas. Tem revigorado a sistemática oferecendo um novo conjunto de caracteres para analisar o relacionamento entre populações de peixes (Stepien e Kocher, 1997). Além de possibilitar resoluções de incertezas taxonômicas, manejo, reprodução e reintroduções, permite também o estudo da biologia, conservação e identificação de espécies crípticas (Frankham *et.al.*, 2008).

O desenvolvimento de técnicas moleculares poderosas de alta resolução permitiu a identificação de diferenças genéticas entre indivíduos que não são observadas fenotipicamente, tornando ilimitado o potencial de mensuração de polimorfismo entre indivíduos de uma população (Ferreira, 2001).

Vários marcadores genéticos estão disponíveis para serem usados em diferentes abordagens metodológicas para detecção de dados genéticos, conforme o interesse de estudo (Frankham *et.al.*, 2002, Perez-Sweeney *et.al.*, 2004):

- \* Os marcadores morfogenéticos (usados para associação de caracteres fenotípicos na detecção de características de altos níveis de herdabilidade).

- \* Marcadores cromossômicos (muito empregado em estudos de peixes, utiliza métodos citogenéticos na caracterização cromossômica e evolutiva de espécies, na prevenção

de insucessos reprodutivos, identificação de níveis de poliploidia, monitoramento em piscicultura como tem sido feito em Truta arco-íris (Martins *et.al.*, 2002);

\* Marcadores enzimáticos (eficientes na identificação de bancos genéticos de peixes (Utter, 1991). Vários estudos com peixes foram realizados usando eletroforese para distinguir características genéticas de espécies de interesse comercial como pacu, tambaqui e curimatá (Toledo-Filho *et.al.*, 1992a; 1994b; Calcagnotto, 1993).

\* Marcadores de seqüências-DNA nuclear e mitocondrial (são amplamente usados em estudos populacionais de peixes, importantes na detecção de polimorfismo e fornecimento de informações sobre níveis de variabilidade e similaridade entre distintas populações, relações históricas) (Emerson *et.al.*, 2001).

Os marcadores moleculares mais utilizados em estudos populacionais e filogeográficos são os loci de microsátélites e o DNA mitocondrial (DNAMt) por serem altamente polimórficos e possuir elevadas taxas de mutação. Embora o último seja indicado como mais adequado para essas análises, por que possibilita traçar histórias evolutivas e estimar a estrutura genética (Avisé, 1986a; 2000b; Clabaut *et.al.*, 2005), além de ser quatro vezes mais suscetível às conseqüências da deriva genética e efeito fundador, e por ter maior parte de sua variabilidade distribuída entre estoques ao invés de intra estoques (Birky *et.al.* 1983; Avisé *et.al.*, 1979; Brown, 1979).

Outras vantagens podem ser ressaltadas para o uso do DNAMt, como o fato de ser uma molécula haplóide e aparentemente não recombinante; ser transmitido via herança materna (Avisé, 2000; Beaumont e Hoare, 2003); sua evolução corresponder exatamente ao modelo bifurcado de árvores evolutivas e a possibilidade de suas substituições não se acumularem por processo de neutralidade estrita, uma vez que varreduras seletivas podem ser comum (Stepien e Kocher, 1997). Contudo, é consenso, que este marcador é mais informativo em escalas de tempo relativamente recentes entre 10 -15M.a. devido a rápida saturação na terceira base do códon (Irwin *et.al.*, 1991; Meyer, 1994; Griffiths, 1997).

Todas essas vantagens mais o fato da estrutura do gene mitocondrial ser bem conservada em peixes gerou a construção de muitos *primers* universais para diferentes regiões do DNAMt, os quais tem conferido sucesso em estudos de diversos grupos e níveis taxonômicos (Kocher *et al.*, 1989; Simon *et.al.*, 1994; Palumbi *et.al.*, 2002). Dos 37 genes que apresenta, o Citocromo b (Cit b) é provavelmente o mais bem estudado gene mitocondrial entre os peixes, permitindo inferências tanto em história evolutiva (filogeográfica e filogenética) quanto em estruturas populacionais.

A história evolutiva de linhagem gênica pode ser inferida com a análise do polimorfismo de seqüências de DNA, porque elas permitem captar padrões de variação genética em populações contemporâneas que podem ser usados para compreender processos históricos que deixaram marcas evolutivas na característica genética atualmente distribuída (Adams e Hudson, 2004; Lowe *et.al.*, 2006). Comumente denominada filogeografia, esta abordagem relaciona a distribuição geográfica das populações com processos que governam a evolução (deriva genética, fluxo gênico, migração, seleção e fragmentação) no tempo e espaço, para mapear a genealogia dos genes de interesse (Avice, 2000b; Templeton, 2006).

Vários estudos filogeográficos foram realizados em diferentes taxas de peixes de água doce da América do Sul para a compreensão de relacionamentos taxonômicos e história evolutiva (Orti e Meyer, 1996; Dergam *et.al.*, 1998; Farias *et.al.*, 1999; Hrbek e Larson, 1999; López-Fernández *et.al.*, 2005; Lovejoy e de Araújo, 2000; Sivasundar *et.al.*, 2001; Turner *et.al.*, 2004; Calcagnotto *et.al.*, 2005; Renno *et. al.*, 2006).

Já, as avaliações da estrutura populacional genética, buscam definir o número de populações distintas de uma espécie, quantificando a divergência genética entre elas e sugerindo suas relações. Populações geneticamente distintas são definidas baseando-se nos valores de heterogeneidade estatisticamente significantes e nas diferenças de frequências de alelos entre as amostras. A variabilidade das seqüências depende das taxas com que as mutações são incorporadas e das condições de seletividade ou não, além de sua posterior passagem às seguintes gerações (Tessier e Bernatchez, 2000; Nei e Kumar, 2000).

Uma população com baixa diversidade genética possui menor poder de adaptação as alterações ambientais, ampliando a possibilidade de extinção (Frankham *et.al.*, 2008). Esse fato impulsiona estudos em espécies de interesse econômico pela assistência que proporciona tanto na manutenção da diversidade genética e ecológica como na definição de estratégias de manejo conservacionista e de domesticação de espécie alvo (Eizirik, 1996).

Assim, análises da variabilidade genética e estruturação populacional de peixes têm auxiliado questões relativas a conservação, identificação de espécies (Parson *et.al.*, 2000), diferenciação entre populações, estruturação genética e fragmentação populacional (Sivasundar *et. al.*, 2001; Moysés e Almeida-Toledo, 2002; Prioli *et.al.*, 2002; Matsumoto e Hilsdorf, 2009).

Uma importante contribuição em estudos populacionais de peixes é a análise e avaliação genética dos grandes peixes migradores, que têm demonstrado duas situações vigentes diferente, encontradas em bacias hidrográficas sul-americanas, um espécie pode-se

apresentar em grandes e únicas populações genéticas (Revaldaves *et.al.*, 1997) ou em populações geneticamente diferenciadas (Wasko e Galetti, 2002; Hatanaka e Galetti, 2003; Hatanaka *et. al.*, 2006; Sanches e Galetti, 2007; Calcagnotto e DeSalli, 2009). Embora os peixes tenham um comportamento migratório bem conhecido, que lhes confere a capacidade de percorrer longas distâncias e até mesmo fazer conexões com outras bacias, a estruturação genética de populações migradoras é um fato identificado entre esse grupo, os quais representam mais de 15% da ictiofauna neotropical (Carolsfeld *et.al.*, 2003).

Muitas outras problemáticas relacionadas ao estudo de peixes são investigadas e solucionadas com o uso dessas ferramentas genéticas. Podemos destacar alguns exemplos como a resolução de complexos de espécies em *Hoplias malabaricus* (traíra) e uma espécie comum de piranha do Amazonas, *Serraslamus rhombeus*; a existência de *homing* em algumas espécies como verificado em *Prochilodus scrofa* (curimba) no rio Mogi Guaçu (Godoy, 1975), em *S. brasiliensis* no rio Sinos da bacia do Uruguai (Schulz *et.al.*, 2003), e *Brachyplatystoma rousseauxii* na bacia Amazônica (Batista e Alves Gomes, 2006); e também de ondas reprodutivas estarem propiciando estruturação (Frankham *et.al.*, 2008).

Análises da variabilidade genética e estruturação populacional realizadas em *S. brasiliensis* da bacia do Uruguai e do Paraná (Machado *et.al.*, 2005, Lopes *et.al.*, 2007) registraram baixa diversidade e estruturação genética populacional. Essa última condição, é relatada também para outras espécies de peixes, em diferentes sistemas hidrográficos: *Piaractus mesopotamus* (Povh *et.al.*, 2008); *Prochilodus lineatus* (Revaldaves *et.al.*, 1997; Sivasundar *et.al.*, 2001); *Prochilodus costatus* (Carvalho-Costa *et.al.*, 2008) entre outras (Wasco e Galetti, 2002; Moysés e Almeida-Toledo, 2002; Prioli *et.al.*, 2002; Hatanaka e Galetti, 2003).

No Pantanal, a estruturação genética em populações de algumas espécies migradoras já é realidade, como em *Brycon hilarii* (piraputanga) (Sanches e Galetti, 2007), *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) (Pereira, 2007), *Pseudoplatystoma reticulatum* (cachara) (Abreu, 2008), *Piaractus mesopotamicus* (pacu) (Suganuma, 2008; Calcagnotto e DeSalli, 2009), em contraste com a ausência de estruturação em outras espécies, como *Zungaro jahu* (jaú) (Carrillo-Avila, 2009).

Ponderando-se os fatos de que em grandes peixes migradores exista estruturação de populações e que divergências genéticas significativas entre sub-bacias já foram documentadas, e adicionando-se a importância ecológica e econômica de *S.brasiliensis*, além, da pressão antrópica negativa sofrida em seus habitats, consideramos que é muito

importante reconhecer as unidades genéticas e/ou populações existentes dessa espécie na região do Pantanal Mato-grossense, bem como, em outras bacias de sua ocorrência. A fim de tentarmos responder alguns questionamentos: (1) as populações dessa espécie estariam geneticamente estruturadas no Pantanal? (2) Existem diferenças genéticas populacionais mensuráveis entre rios mais ao norte do Pantanal e rios mais ao sul? (3) *S. brasiliense* do Pantanal apresenta diferenças genéticas em relação às populações das outras bacias que compõe o grande sistema Platino? e (4) Teriam essas bacias alguma relação ancestral histórica?

### **III – OBJETIVOS**

#### **III.1 - Objetivo geral**

\* Analisar a estrutura genética da espécie *Salminus brasiliensis* da região do Pantanal Mato-grossense e inferir sobre os padrões filogeográficos dos grupos analisados nas diferentes bacias, Uruguai, Paraguai e Paraná. Contribuindo para o conhecimento genético e historia evolutiva desse grupo de peixes e disponibilizando essas informações para auxiliar no manejo e conservação desta espécie.

#### **III.2 - Objetivos específicos**

\*Avaliar a variabilidade genética das populações de *S.brasiliensis* por meio da detecção de polimorfismos inter e intrapopulacionais.

\*Verificar se *S.brasiliensis* no Pantanal Mato-grossense forma uma única unidade genética ou está fragmentada em populações estruturadas entre os rios localizados nas porções ao norte e ao sul da bacia do Alto Paraguai.

\*Compreender se as populações do Pantanal formam uma unidade genética separada das populações dos rios: Paraná e Uruguai e as relações entre elas.

## **IV - MATERIAL E MÉTODOS**

### **IV.1- Caracterização da área de estudo**

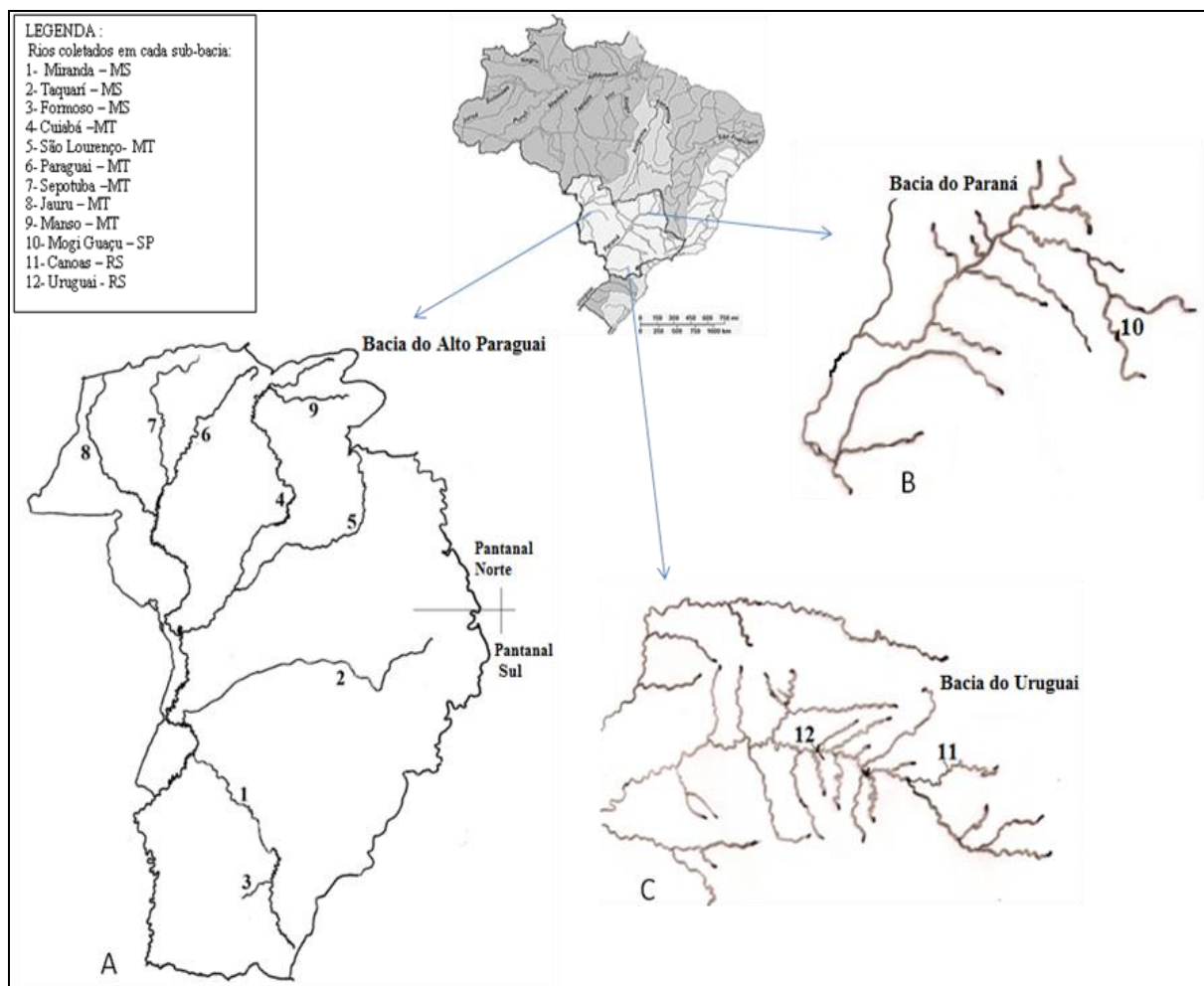
Este trabalho teve como área primordial de estudo rios do Pantanal Mato-grossense totalmente contido na bacia do Alto Paraguai situada na região centro-oeste do Brasil e parte integrante da bacia do Paraná-Paraguai. O sistema hidrográfico Paraná-Paraguai é o 2º maior sistema de drenagem da América do Sul, com 3,2 milhões de km, formado por rios de planície sendo os principais: o Prata, o Paraná, o Uruguai e o Paraguai (Souza, 1984; Lowe-McConnell, 1999). Juntos, eles drenam uma área correspondente a 10,5% do território brasileiro, fazendo parte da grande bacia do rio da Prata.

Além da bacia do Alto Paraguai foram incluídas duas outras áreas neste trabalho, o rio Mogi Guaçu pertencente à bacia do Paraná, e os rios Canoas e Uruguai da bacia do Uruguai.

### **IV.2- Material**

#### **IV.2.a. - Coleta das amostras**

Foram analisados 109 exemplares de *S.brasiliensis* coletados em 12 localidades distintas. Na bacia hidrográfica do Alto Paraguai no Pantanal Mato-grossense foram coletados no estado de MT nos seguintes rios: Cuiabá (n=16), São Lourenço (n=8), Paraguai (n=22), Sepotuba (n=10), Manso (n=7) e Jauru (n=2) e no estado de MS nos rios: Miranda (n=11), Formoso (n=8) e Taquari (n=13) (Figura 3). Foram analisados mais 12 exemplares coletados nas sub-bacias do Paraná e Uruguai, no rio Mogi Guaçu (n=6) e nos rios Canoas (n=1) e Uruguai-(n=5) respectivamente (Figura 3).



Fonte: Os mapas foram modificados de PAE, 2004; WWW.geografiaparato/05/2010.

**Figura 3** – Bacia hidrográfica estudada e seus respectivos locais de coleta. Em A- Bacia do Alto Paraguai e os rios do Pantanal Mato-grossense; Em B- Bacia do Paraná; em C- Bacia do Uruguai.

Os peixes foram capturados com anzol e linha (pesca convencional) e com tarrafas e rede de malha específica, devidamente autorizada pelos órgãos fiscalizadores. Alguns exemplares foram adquiridos de pescadores profissionais e amadores, evitando desta forma que outros exemplares fossem retirados desnecessariamente do mesmo rio. Para as análises de DNA foi retirado apenas um fragmento pequeno da nadadeira dorsal ou caudal de cada espécime, possibilitando sua devolução ao rio, exceto quando o material era retirado dos indivíduos coletados pelos pescadores. Todas as amostras de tecido coletadas foram imediatamente preservadas em álcool absoluto e armazenadas em freezer (- 20C) até sua utilização.



### IV.3- Métodos

A extração de DNA genômico a partir de amostras de tecidos sólidos seguiram dois protocolos: Tampão Salino ou Fenol/clorofórmio.

#### IV.3.1- Protocolo de extração de DNA por Tampão Salino (Aljanabi & Martinez, 1997) com algumas modificações:

- 1- Para cerca de 50-100mg do tecido foi acrescentado 600  $\mu$ L de tampão salino (NaCl 0,4M; Tris-HCl 100mM pH8,0 e EDTA 2mM pH8,0).
- 2- Posteriormente foi adicionado 60 $\mu$ L de SDS 20% (Cf = 2%) e 16 $\mu$ L de Proteinase K 20mg/mL (Cf = 400 $\mu$ g/ml) misturando a seguir no vortex.
- 3-As amostras foram incubadas a 55-65°C durante o tempo (1- 4h) necessário para completa digestão, e homogeneização da mistura. Durante esse período as amostras eram misturadas a cada 30min para garantir ação enzimática em todo material. Algumas vezes foi necessário que as amostras pernoitassem incubadas para ideal digestão.
- 4- Em seguida foi adicionado 300 $\mu$ L de NaCl 6M, misturando bem as amostras em vórtex por 30s à velocidade máxima e centrifugando por 45 min. a 13000 rpm em microcentrífuga.
- 5- Após centrifugação o sobrenadante foi retirado e transferido para um novo tubo onde foi adicionado igual volume de isopropanol, invertendo os tubos para precipitação do DNA.
- 6- Foi centrifugado por 20 min. a 13.000 rpm e em seguida o sobrenadante foi descartado com cuidado. Foi adicionado 300 $\mu$ L de etanol 70% para lavar o *pellet*, centrifugando em seguida por mais 5 min. a 13.000 rpm.
- 7- O sobrenadante foi descartado e as amostras foram levadas para secar em estufa a 37 °C por 1 ou 2h.
- 8- Após a secagem o *pellet* foi ressuscitado em 150-200 $\mu$ L de TE, de acordo com o tamanho do mesmo;
- 9- Por fim foi adicionado de 10-20  $\mu$ L Rnase (20mg/mL) deixando por 30minutos o material sobre a bancada em temperatura ambiente. Em seguida foi armazenado em geladeira por cerca de 24h ou mais.
- 10- Após o processo de quantificação do DNA do material e separação de alíquotas o mesmo foi então armazenado em freezer a -20 °C.

#### **IV.3.2- Protocolo de extração de DNA por Fenol Clorofórmio proposto por Bardakdi & Skibinski, (1994) adaptado por Povh *et.al.*, (2005) :**

- 1- Para cerca de 0,05g do tecido foi acrescentado 550µl de tampão de lise (50mM de Tris-HCl, 50mM de EDTA, 100mM de NaCl e 1% de SDS), 30µl de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e 5 µl de proteinase K (200 µg/ml).
- 2- Em seguida incubado em banho-maria a 55°C “*overnight*”.
- 3- Após esse período foi adicionado 550µl de fenol/clorofórmio (sendo 275µl de fenol e 275µl de clorofórmio) e realizado movimentos de inversão dos tubos até que as fases ficassem bem misturadas. Posteriormente o material foi levado a centrífuga por 3 min a 12000 rpm.
- 4- O sobrenadante foi retirado e transferido para outro tubo (tomando-se o cuidado para não misturar novamente as fases: orgânica e aquosa).
- 5- Para purificar o material foi adicionado clorofórmio (o volume adicionado dependeu do volume recuperado no passo anterior, quando recuperado 400µl adicionou-se então 400 µl de clorofórmio). Misturou-se novamente as fases por inversão dos tubos, levando em seguida a centrífuga por 3 min a 12000 rpm.
- 6- O sobrenadante foi transferido para um novo tubo.
- 7- Para precipitar o DNA foi adicionado 1/10 de acetato de sódio 3M (pH 7,0) e 2,5X de etanol absoluto gelado (quando recuperado 300µl, adicionou-se 30µl de NaCl e 750µl de etanol). Misturando as fases por inversão dos tubos cuidadosamente para visualização do *pellet*.
- 8- As amostras foram incubadas em freezer a -20°C por 1 hora, centrifugando em seguida por 4 min a 12000 rpm.
- 9- Os tubos foram vertidos cuidadosamente para retirada do etanol ;
- 10- Foi adicionado em seguida 500µl de etanol 70% e centrifugado por 5 min a 12000 rpm, descartando-se novamente o etanol com cuidado.
- 11- O material foi levado para secar a temperatura ambiente por aproximadamente 40 min ou na estufa a 37°C até que o *pellet* estivesse seco.
- 12- Em seguida foi adicionado 45µl de TE (10mM de Tris pH 8,0 e 1mM de EDTA) e posteriormente tratado com RNase (100 µg/ml) a 37°C por 1 hora;
- 13- As amostras foram por fim armazenadas a 4°C até a sua utilização.

### IV. 3.3 – Eletroforese em gel de Agarose

As quantificações das extrações de DNA e verificações de qualidade do DNA das amostras foram analisadas, após eletroforese em gel de agarose 1% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

As amplificações após cada reação de PCR e as quantificações dos produtos de PCR purificados também foram analisadas igualmente por essa técnica. Sendo que nas quantificações foram usados: 4µl do marcador *Low DNA mass ladder*<sup>TM</sup> (Invitrogen Life Technologies) para a comparação entre as bandas dos fragmentos e 1µl de cada amostrada de DNA e nas amplificações dos produtos de PCR usou-se: 3µl do marcador *1kbplus ladder*<sup>TM</sup> (Invitrogen Life Technologies) e 3µl de cada amostra de DNA. Em seguida foram aplicados em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio (1 mg/ml), e submetidos à eletroforese (80 Volts por 25 minutos). Posteriormente, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e foto-documentado (Kodak 1D 3.5), tendo como referência de tamanho para os amplicons um marcador de 1 Kb (Kilobase, Invitrogen Life Technologies).

### IV. 3.4 - Amplificação das seqüências de DNA mitocondrial.

O estudo de genética populacional empregou dois marcadores de DNA mitocondrial: um gene codificador de proteína (Citocromo b) e a porção hipervariável da região controladora (não codificante). Esses marcadores foram amplificados, via PCR, utilizando uma combinação de *primers* já descritos na literatura para peixes: para o gene citocromo b (Cit b) (Irwin *et.al.*, 1991; Kocher *et.al.*, 1989) e para a região controle, em sua porção hipervariável- primeiro domínio, (Sivasundar *et.al.*, 2001; Cronin *et.al.*, 1993; Meyer, 1990) conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Relação dos *primers* universais que foram utilizados na amplificação do *loci* mitocondriais.

<i>Primer</i>	Orientação	Seqüência
L14841(Cit b)	<i>Forward</i>	5`AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3`
H15915(Cit b)	<i>Reverse</i>	5`AAC TGC CAG TCA TCT CCG GTT TAC AAG AC 3`
DloopL(D-loop)	<i>Forward</i>	5`AGA GCG TCG GTC TTG TAA ACC3`
H16498 (D-loop)	<i>Reverse</i>	5`CCT GAA GTA GGA ACC AGA TG3`

#### **IV.3.4.a - Reações de PCR para o gene Citocromo b**

As reações ocorreram em volume final de 30µl contendo 50ng de DNA, 150µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200mM, pH 8,4, e KCl 500mM), 0,2µM de cada primer, 1,25mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5U da enzima Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies). Todas as reações foram realizadas em termocicladores PTC100 (MJ Research), Mastercycler (Eppendorf®) e Veriti® 96-Well Thermal Cycler. O programa para amplificação do gene consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguido de 35 ciclos de 30s a 95°C, 45s a 53°C, 1min e 30s a 72°C; finalizando a temperatura de extensão de 72°C por 7min.

#### **IV.3.4.b.- Reações de PCR para a Região Controle – D-loop**

Já para a região controle as reações foram realizadas com o uso da Go Taq® (Promega), onde para um volume final de 30µl contendo 50ng de DNA, foi utilizado 15µl de Go Taq® (mix pronto com cloreto, dNTPs, Taq nas concentrações do fabricante), 1µl de DNA, 1µl de cada *primer* e 12µl de água deionizada estéril. Todas as reações foram realizadas em termocicladores PTC100 (MJ Research), Mastercycler (Eppendorf®) e Veriti® 96-Well Thermal Cycler. O programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 2min, seguido de 35 ciclos de 15s a 94°C, 15s a 54°C, 30s a 72°C; finalizando a temperatura de extensão de 72°C por 5min.

#### **IV. 3.5 - Purificação dos fragmentos de PCR**

Os produtos de PCR de ambos os fragmentos mitocondriais foram purificados com o kit GFX PCR DNA & Gel band (GE inc.) ou através do protocolo de Polietilenoglicol-PEG8000 (Lis,1980). Com a finalidade de retirar os reagentes que restaram da PCR, deixando apenas o fragmento de DNA a ser seqüenciado.

#### **IV. 3.5.a – Purificação dos produtos de PCR mediante kit de purificação específico :**

- 1- Os tubos foram montados colocando-se uma coluna GFX nova para cada purificação a ser feita;
- 2- Foi adicionado 250µl de *capture buffer* à coluna GFX, para otimizar o uso do kit;
- 3- Logo após, o produto da PCR (até 100µl) foi transferido para a coluna GFX misturando-se as soluções com micropipeta;
- 4- Em seguida as amostras foram centrifugadas na velocidade máxima (13.000 rpm) por 30s;
- 5- O sobrenadante do tubo foi descartado e a coluna GFX recolocada no mesmo;
- 6- Foi adicionado 250µl de *wash buffer* à coluna; e novamente centrifugado em velocidade máxima por 30s;
- 7- O tubo foi então descartado e a coluna GFX transferida para um microtubo de 1,5ml;
- 8- Sendo adicionado 10-50µl de tampão de eluição (Tris-HCl 10mM, pH 8,0; TE pH 8,0; ou água milliQ autoclavada) diretamente em cima da matriz de fibra de vidro da coluna GFX;
- 9- A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1min;
- 10- Logo após centrifugou-se as amostras, em velocidade máxima, por 1 min para recuperar o DNA purificado;
- 11- Em seguida as amostras purificadas foram condicionadas em geladeira até serem seqüenciadas.

#### **IV.3.5.b – Purificação dos produtos de PCR mediante PEG – polietilenoglicol 8000 (Lis, 1980)**

Primeiramente foi preparada a solução de Peg em seguida se iniciou o protocolo:

- 1- Foi colocada em um microtubo de 2ml a solução de PEG e em igual volume a amostra, homogeneizando imediatamente o conteúdo;
- 2- Em seguida o tubo foi incubado em banho seco a 37°C - 38 °C por 15 min. (adicionou-se 0,2 µl glicogênio azul);
- 3- Após incubação foi centrifugado a 13.000 rpm (ou qualquer velocidade acima de 8000 rpm) por 15 min, descartando o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta;
- 4- Foi adicionado levemente 125 µl de etanol 80% gelado e novamente centrifugado por 2min.
- 5- Os passos 3e 4 foram repetidos por mais uma vez;

8- Em seguida o material foi levado para estufa a 37°C por aproximadamente 40 min ou em banho seco à 50°C por 5 min para secagem.

9- Após secagem foi adicionado o volume desejado de água ou tampão (15 ou 20 µl).

10- Em seguida as amostras purificadas permaneceram na bancada à temperatura ambiente por 24h para eluição completa do material purificado na solução e depois armazenadas em geladeira até serem seqüenciadas.

OBS.: Na última repetição dos passos de 3 e 4, não era aspirado todo o sobrenadante, deixando-se aproximadamente 20 µl do etanol. Nesta fase o *pellet* está muito solto e pode ser aspirado acidentalmente.

- Para solução de PCR com volume final (VF) 30 µl costuma-se adicionar 0,2 µl de azul

- Para solução de PCR com volume final (VF) 50 µl costuma-se adicionar 0,6 µl de azul

Essa adição do corante azul de glicogênio é opcionalmente utilizada para auxiliar na visualização do *pellet* e não altera o material purificado.

Os fragmentos foram seqüenciados pela empresa prestadora de serviços Macrogen Inc. pelo método enzimático de terminação de cadeia, usando os *primers* da PCR.

Utilizou-se o programa Phred (Ewing *et.al.*, 1998) para acessar a confiabilidade das bases assinaladas pelo seqüenciamento. Verificada a confiabilidade, as seqüências obtidas foram contrastadas com aquelas disponíveis no National Center for Biotechnology of Information-NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), para confirmar que se tratavam das regiões do DNAm de interesse. Uma vez que cada indivíduo foi seqüenciado com ambos os *primers forward* e *reverse*, posteriormente foi feita uma seqüência consenso no programa BIOEDIT (Hall, 1999), alinhadas em seguida no software ClustalW (Thompson *et. al.*, 1994), incluído no Bioedit e analisadas visualmente para confirmação das mutações.

### III. 3.6 - Análises estatísticas dos dados

A caracterização do polimorfismo por meio das análises de: identificação dos haplótipos, frequências relativas, número de sítios polimórficos, distâncias genéticas ( $p$ ) não corrigidas foram conduzidas por meio dos programas MEGA versão 4.0 (Tamura *et.al.*, 2007), DNASP 5.10 (Librado e Rozas, 2009) e/ou ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et.al.*, 2005).

Os dados referentes a desvios da premissa de neutralidade seletiva foram estimados pelo teste D de Tajima (Tajima, 1989) que distingue entre uma sequência de DNA que evolui aleatória (neutra) contra uma que evolui por processos não aleatórios por meio de dois estimadores de teta (um que utiliza os sítios segregantes (S) e outro que utiliza o número médio de diferenças nucleotídicas (k). De forma que valores de D menores que zero (negativos) sugerem expansão populacional ou seleção purificadora e valores maiores que zero (positivos) sugerem um recente bottleneck na população ou seleção balanceadora (Holsinger, 2008). Além deste também foram realizados os testes  $F^*$  e  $D^*$  (Fu e Li, 1993) e  $F_s$  (Fu, 1997), presentes no programa DNASP 5.10 (Librado e Rozas, 2009) e no MEGA 4.0 (Tamura *et.al.*, 2007). Como os testes de neutralidade de  $D^*$  e  $F^*$  são mais sensíveis à seleção ao serem comparados com os valores de  $F_s$ , podem auxiliar na distinção entre expansão populacional e “background selection”. O teste Codon-Z foi realizado para as sequências codificadoras para verificar a neutralidade das mutações ou ação de seleção purificadora, feito no MEGA 4.0 (Tamura *et.al.*, 2007).

Também foi calculada para auxiliar na inferência de expansão populacional a distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos, “mismatch distribution” (Rogers e Harpending, 1992) utilizando o programa DNASP 5.10 (Librado e Rozas, 2009). A soma do desvio dos quadrados (SSD), que verifica a existência de desvio entre as curvas observadas e esperadas da “*mismatch distribution*” dentro do modelo de expansão populacional foi calculada usando o programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et. al.*, 2005).

As análises de variância molecular AMOVA (*Analysis of Molecular Variance*) (Excoffier *et.al.*, 1992), implementada no ARLEQUIN 3.1 (Excoffier *et.al.*, 2005), foram realizadas para verificar a variação genética inter e intra populacional, por meio de frequências haplotípicas e diferenças par-a-par entre as sequências. A análise hierárquica foi realizada estimando-se os índices de fixação  $F_{st}$ ,  $F_{ct}$  e  $F_{sc}$  para avaliar a proporção de variação entre os grupos e entre as populações dentro dos grupos, respectivamente. E para testar a hipótese de estrutura genética entre as populações os valores de  $F_{ST}$  foram calculados para cada par de populações e sua significância ( $p < 0.05$ ) testada por meio de permutações dos

haplótipos (1023 permutações) entre as populações, considerando como valor de significância (P) as proporções de permutações que têm um valor de  $F_{ST}$  maior ou igual ao observado (Excoffier *et.al.*, 1992).

O teste exato de diferenciação de amostras (Raymond e Rousset, 1995) baseado na frequência de haplótipos também foi aplicado através do programa ARLEQUIN 3.1 (Comprimento da Cadeia de Markov = 100.000 passos) (Excoffier *et.al.*, 2005).

As interações filogenéticas e relações evolutivas entre os haplótipos foram inferidas por meio de redes de haplótipos construídas com o auxílio do programa Network 4.5.1.6 (Fluxus Technology Ltda, 2009). Para limpar as redes e resolver problemas de homoplasia foi utilizada a opção do programa de MPcalculations, um procedimento opcional pós processamento do cálculo da rede.

A história evolutiva foi inferida por meio de uma árvore de neighbor-joining calculada pelo programa MEGA versão 4.0 (Tamura *et. al.*, 2007). O suporte para os nós foi avaliado por bootstrap (1000 pseudo-réplicas) (Felsenstein, 1985), para a significância dos valores levou-se em consideração os valores: bootstrap  $\geq 75\%$  são fortemente suportados; bootstrap 50 -74% são fracamente suportados e bootstrap  $< 50\%$  não são suportados (Lowe *et al.*, 2006).



## **V – RESULTADOS:**

Os resultados estão organizados em duas partes. Na primeira, são apresentados os resultados referentes às análises de diversidade genética de *S. brasiliensis* da região do pantanal onde se buscou entender como esse grupo de peixes se comporta geneticamente em uma área de grandes redes hídricas, com ciclos de inundações periódicas que provocam a coalescência das águas gerando uma gigantesca área alagada.

Na segunda, é apresentada uma análise com abordagem mais filogeográfica da variabilidade genética da espécie na bacia do Rio da Prata, onde se procurou discutir aspectos referentes à genética evolutiva desse grupo de peixes, sua distribuição por toda bacia e sua relação com a história da formação das bacias; uma relação entre o Pantanal e a bacia do Paraná e do Uruguai.

**V.1- Análise da variabilidade e estrutura genética populacional de *Salminus brasiliensis* no Pantanal Mato-grossense.**

**V.2- Análise filogeográfica e variabilidade genética de *Salminus brasiliensis* na bacia do Rio da Prata: Uma comparação entre o Pantanal e as sub-bacias do Paraná e Uruguai.**

**V.1 - ANÁLISE DA VARIABILIDADE E DA ESTRUTURA GENÉTICA  
POPULACIONAL DE *Salminus brasiliensis* NO PANTANAL MATO-GROSSENSE.**

### **V.1 - Resultados**

Foram analisados 97 indivíduos do Pantanal Mato-grossense, sendo que para, 65 foram obtidas seqüências do gene Citocromo b e para 81 indivíduos, seqüências da região controle. Os resultados de cada marcador são apresentados separadamente.

#### **V.1.2 - Citocromo b (Cit b):**

O alinhamento das 65 seqüências obtidas gerou um fragmento de 710pb com 21 sítios polimórficos, dos quais 10 foram parcimoniosamente informativos; resultando em 25 haplótipos (Tabela 2).

Dos sítios polimórficos, 17 apresentaram mudanças sinônimas e apenas quatro caracterizaram-se como não sinônimas, sendo decorrentes de transições e transversões que levaram às alterações nos códons de leitura e seus respectivos aminoácidos. Na maioria dos segmentos de DNA, substituições de nucleotídeos por transição ocorrem mais freqüentemente que por transversões (Nei e Kumar, 2000).

Das alterações não sinônimas encontradas, três foram trocas entre aminoácidos que pertencem ao mesmo agrupamento químico (polares ou apolares), chamada substituição silenciosa, e uma foi entre aminoácidos quimicamente diferentes (apolar para polar: Fenilalanina para Serina) como mostra a Tabela 3.

Uma das substituições silenciosas foi compartilhada por três haplótipos diferentes (Cb14, Cb15 e Cb16), essa alteração de bases é representada na rede haplotípica pelo passo mutacional (221) que acabou separando esse grupo de haplótipos dos demais (Figura4). As outras trocas se limitaram cada uma a um haplótipo: Cb23 e Cb25 (Tabela 3).

Mutações sinônimas provavelmente não provocam mudanças funcionais nas proteínas, enquanto as não sinônimas podem provocar mudança de aminoácidos quimicamente diferente, alterando a composição original da proteína.

**Tabela 2-** Haplótipos de *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense e suas frequências, encontradas com o marcador Cit b. Em negrito são as bases nucleotídicas mutadas. Os números correspondem a posição da base na sequência gênica.

Haplótipo	Sequência de bases mutadas 7 13 31 40 106 169 178 221 277 289 358 364 414 514 604 621 648 661 679 694 709	Localidade	
		Rios de MS	Rios de MT
Cb1	A T A T G T G G C A G T T C A A C A T A C	Miranda (1)	Cuiabá (2)
		Formoso (2)	Paraguai (2) Sepotuba (1)
Cb2	A T A T G T A G C A G T T C A A C A T A C	Miranda (2)	Cuiabá (4)
		Taquari (1)	Sepotuba (2) Jau (1) Manso (1)
Cb3	A T A T G T A G C A G T T C A A C A T A T	Taquari (1)	Cuiabá (2)
		Formoso (1)	SLourenço(1)
Cb4	A T A T G T A G C A G T T C G A C A T A T	-	Paraguai (1)
Cb5	A T A T G C A G C A G T T C A A C A T A T	-	Cuiabá (1)
Cb6	G T A T A T A G C A G T T C A A C A T A C	-	SLourenço(1)
Cb7	A T A T A C A G C A G C T C A A C A T A C	-	SLourenço(1)
Cb8	A T A T A T A G C A G T T C A A C A T A C	Formoso (2)	Cuiabá (2)
		Taquari (1)	Paraguai (2)
		Miranda (1)	
Cb9	A C A T G T A G C A G T T C A A C A T A C	-	Cuiabá (1)
Cb10	A T A C G T A G C A G T T C A A C A T A C	-	Sepotuba (1)
Cb11	A T G C G T A G C A G T T C A A C A T A C	-	Cuiabá (1)
Cb12	A T A T G T A G C A G T T C A A C A T G C		SLourenço(1)
			Paraguai (1)
Cb13	A T A T G T G G C A G T T C A A C G T A C		SLourenço(1)
			Paraguai (4) Jau (1) Cuiabá (1)
			Manso (1)
Cb14	A T A T G T G A C A G T T T A A C A T A C		
Cb15	A T A T G T G A C A G T T C A A C A T A C	Miranda (1)	
Cb16	A T A T G T G A T A G T T C A A C A T A C	-	Cuiabá (1)
Cb17	G T A T G T G G C A G T T C A A C A T A C	-	Paraguai (1)
Cb18	G T A T G T G G C G A T T C A A C A T A C	-	SLourenço(1)
Cb19	G T A T G T G G C A A T T C A A C A T A C	Miranda (1)	Sepotuba (1) Paraguai (3)
Cb20	G T A T G C G G C A A T T C A A C A T A C		Paraguai (1) Sepotuba (1)
Cb21	G T A T G T G G C A A T C C A A C A T A C	Miranda (1)	
Cb22	G T A T G T G G C A A T T C A A C A C A C	Taquari (1)	
Cb23	G T A T G T G G C A A T T C A A A A T A C	Miranda (1)	
Cb24	A T A T G T G G C A A T T C A A C A T A C	Taquari (1)	
Cb25	A T A T G T G G C A G T T C A G C A T A C	-	Cuiabá (1)

**Tabela 3.** Mudanças sinônimas e não sinônimas de aminoácidos no fragmento do gene Cit b de *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense.

Aminoácido correto	Propriedade química do aminoácido	Base nucleotídica mutada	Aminoácido alterado	Propriedade química do aminoácido	Nº de indivíduos que apresentaram a troca de bases
Valina	Apolar	GTT/ ATT	Isoleusina	Apolar	3 (Cb14,Cb15,Cb16)
Threonina	polar	ACC/AAC	Aspargina	Polar	1 (Cb23)
Aspargina	Polar	AAC/AGC	Serina	Polar	1 (Cb25)
*Fenilalanina	Apolar	TTT/TCT	Serina	Polar	1 (Cb21)

\*alteração na composição química do aminoácido / em vermelho destaca-se a base alterada por mutação.

Foi possível verificar também que as mutações não se concentraram em uma região específica da seqüência, ficando dispersas ao longo da mesma (Anexo1).

A taxa de transição/transversão total (R) estimada a partir do conjunto de dados foi de 76,435 sendo a média das frequências de nucleotídeos A (25,6%), T(29,9%), G(14,9%) e C(29,7%).

Embora as 65 seqüências tenham definido 25 haplótipos, não foi observado um haplótipo comum presente em todas as populações amostradas. Cinco haplótipos foram compartilhados entre as populações do Pantanal Sul e do Norte e três haplótipos foram compartilhados apenas por populações do Pantanal Norte. Haplótipos idênticos foram observados em localidades distantes geograficamente, separadas a vários km de distância. Como por exemplo, os haplótipos Cb19 que esteve presente nos rios Sepotuba e Miranda e Cb2 que esteve presente nos rios Miranda e Manso (Figura 3 e 4; Tabela 2). Esses haplótipos foram igualmente encontrados em outras localidades como ilustrado na Figura 4.

Também foram evidenciados um total de 17 haplótipos únicos, presentes em apenas uma localidade sendo, 12 no Pantanal Norte e 5 no Pantanal Sul (Tabela 2 e Figura 4). O haplótipo mais freqüente foi o Cb2 que na rede haplotípica foi inferido como sendo o ancestral, estando presente em seis das nove localidades analisadas e em algumas delas encontrados mais de uma vez (Figura 4 e Tabela 2). A presença desses haplótipos únicos pode ser vista em muitas espécies principalmente quando a diversidade genética está sendo analisadas em nível de seqüências de DNA, além disso, esses haplótipos são criados por mutações mais recentes e tornam-se cada vez mais raros na espécie como um todo, ficando mais restritos geograficamente nas populações locais (Templeton, 2006).

O número médio de diferenças nucleotídicas (k) entre os haplótipos de Citocromo b foi de 2,46, sua diversidade haplotípica variou de 0,800 – 1,000, com um valor (Hd) médio igual 0,93 e diversidade nucleotídica geral ( $\pi$ ) igual a 0,0035 (Tabela 4). Nas populações do norte do Pantanal a diversidade nucleotídica variou de 0,0028- 0,0055 e de 0,0022- 0,0039 nas populações do sul (Tabela 4).

**Tabela 4**– Diversidade genética de *S.brasiliensis* referente à análise do gene Cit b. N= tamanho da amostra; h= número de haplótipos; k=média do número de diferenças; Hd= diversidade haplotípica; Pi= diversidade nucleotídica. Em negrito os haplótipos exclusivos de cada localidade. \* Em asterisco, a análise feita no geral entre as duas grandes áreas.

<i>Localidade</i>	<i>N</i>	<i>H</i>	<i>Haplótipos e (freqüência)</i>	<i>k</i>	<i>Hd</i>	<i>Pi (π)</i>
Pantanal Sul	Miranda 8	7	Cb1(1),Cb2(2),Cb8(1), <b>Cb15</b> (1),Cb19(1), <b>Cb21</b> (1), <b>Cb23</b> (1)	2,07	0,96	0,0037
	Formoso 5	3	Cb1(2),Cb3(1),Cb8(2)	1,60	0,80	0,0022
	Taquari 5	5	Cb2(1),Cb3(1),Cb8(1), <b>Cb22</b> (1), <b>Cb24</b> (1)	2,80	1,00	0,0039
	Cuiabá 16	10	Cb1(2),Cb2(4),Cb3(2), <b>Cb5</b> (1),Cb8(2), <b>Cb9</b> (1), <b>Cb11</b> (1),Cb13(1), <b>Cb16</b> (1), <b>Cb25</b> (1)	2,02	0,92	0,0028
Pantanal Norte	S.Lourenço 6	6	Cb3(1), <b>Cb6</b> (1), <b>Cb7</b> (1),Cb12(1),Cb13(1), <b>Cb18</b> (1)	3,93	1,00	0,0055
	Paraguai 15	8	Cb1(2), <b>Cb4</b> (1),Cb8(2),Cb12(1),Cb13(4), <b>Cb17</b> (1),Cb19(3),Cb20(1)	2,51	0,89	0,0035
	Seputuba 6	5	Cb1(1),Cb2(2), <b>Cb10</b> (1),Cb19(1),Cb20(1)	2,33	0,93	0,0033
	Jaurú 2	2	Cb2(1), Cb13(1)	2,00	1,00	0,0028
	Manso 2	2	Cb2(1), <b>Cb14</b> (1)	3,00	1,00	0,0042
<b>Total / Media</b>	<b>65</b>	<b>25</b>	-	<b>2,46</b>	<b>0,93</b>	<b>0,0035</b>

* Análise de polimorfismo genético entre demes maiores – Cit b						
Pantanal Norte	47	20	-	2,52	0,93	0,0035
Pantanal Sul	18	10	-	2,34	0,91	0,0033

Os resultados referentes às distâncias genéticas  $p$  não corrigidas mostraram que os valores médios de divergência entre os grupos Norte e Sul foram de 0,3% e a distância dentro de cada grupo foi de 0,4% no Norte e 0,3% no Sul. Os resultados referentes às distâncias genéticas calculadas para cada rio estão na Tabela 5.

No geral as populações de dourado analisadas apresentaram baixos índices de distância genética tanto intra quanto inter grupos no Pantanal Mato-grossense. Os baixos valores encontrados para distância genética podem indicar a existência de fluxo gênico entre as populações. Isso pode ser reforçado com os dados revelados pela Amova e Fst.

**Tabela 5**- Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de *S. brasiliensis* no Pantanal para o gene Cit b. d (média): distância genética intra populacional. Os valores das distâncias estão em porcentagem (%).

	Miranda	Formoso	Taquari	Cuiabá	Paraguai	SLourenço	Seputuba	Manso	d (media)
Miranda									0,4%
Formoso	0,3								0,2%
Taquari	0,3	0,3							0,4%
Cuiabá	0,4	0,2	0,3						0,3%
Paraguai	0,3	0,3	0,4	0,4					0,4%
SLourenço	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4				0,6%
Seputuba	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,4			0,3%
Manso	0,4	0,3	0,4	0,3	0,4	0,5	0,4		0,4%
Jaurú	0,3	0,2	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,3	0,3%

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) considerando os dois grandes grupos (Pantanal norte e sul) mostrou que as maiores variações ocorreram dentro dos grupos do que entre os grupos (Tabela 6). O valor estimado do  $F_{ST}$  ( $-0,00287$ ;  $p = 0,53959 \pm 0,01344$ ) não foi significativo, demonstrando que não existem diferenças genéticas entre as populações do norte e sul do pantanal. Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par demonstraram a não ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as populações do dourado (Tabela 7). O teste exato da diferenciação de amostras também não foi significativo quanto à diferenciação entre as populações, apresentando valores exatos de  $p = 0,37863 \pm 0,04273$  (comprimento da Cadeia de Markov 100000 steps e nível de significância = 0,05).

**Tabela 6-** Análise da variância molecular (AMOVA),  $F_{ST}$ , entre as populações de *S.brasiliensis* coletados no Pantanal Norte e Sul, para o gene Cit b. Significância do teste (1023 permutações).

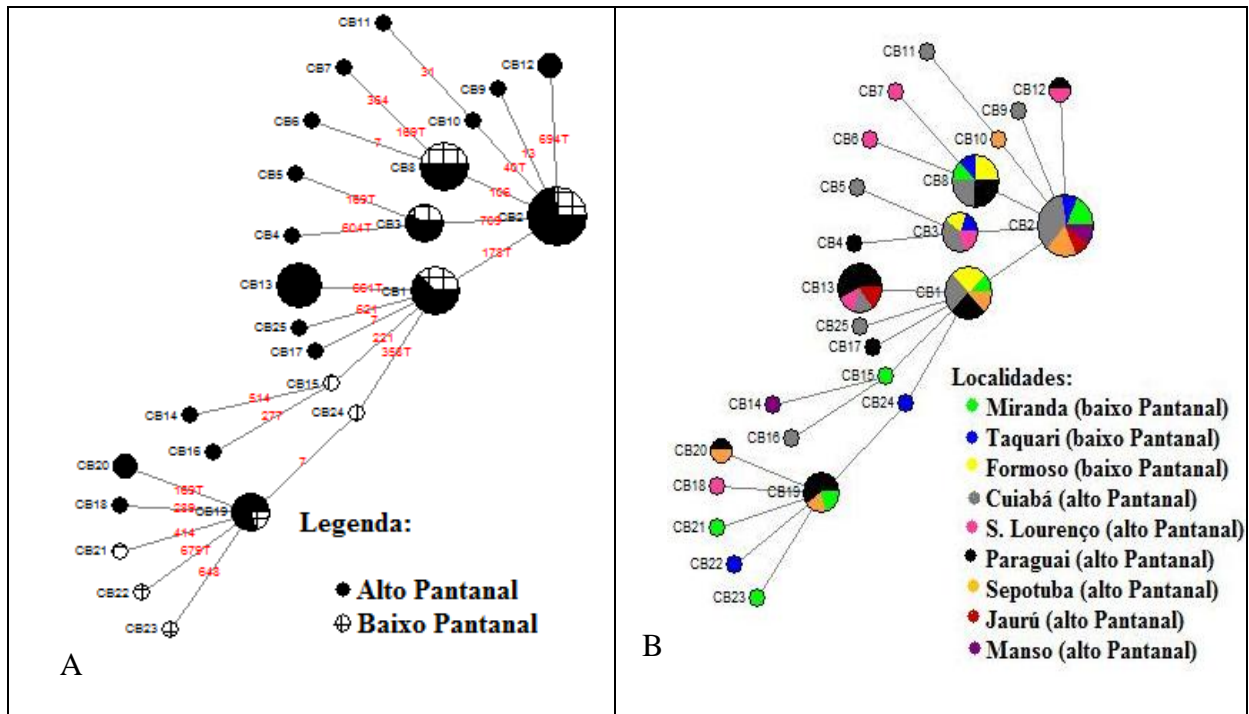
Análises	Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Pantanal Norte	Entre os grupos	1	0.470	0.00088 Va	<b>0,19</b>
	Entre as populações dentro dos grupos	7	3.148	0.00221 Vb	0,48
Pantanal Sul	Dentro das populações	56	26.012	0.46451 Vc	<b>100,29</b>
	<b>Total</b>	64	29.631	0.46318	-
	Índices de Fixação	FSC:-0.00478	<b>FST:-0.00287</b>	FCT:0.00190	-
	Valores de p	0.56207±0.01466	<b>0.53959±0.01344</b>	0.49658±0.01613	-

**Tabela 7-** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene Cit b de *S.brasiliensis*. \* $P < 0,05$ .

	Miranda	Formoso	Taquari	Cuiabá	Paraguai	SLourenço	Seputuba	Manso	Jaurú
Miranda	0,00000								
Formoso	0,01216	0,00000							
Taquari	-0,06042	-0,02273	0,00000						
Cuiabá	-0,04121	0,00383	-0,06458	0,00000					
Paraguai	0,01503	0,04273	0,03477	0,04189	0,00000				
SLourenço	0,01870	0,06464	-0,03448	0,01085	0,00253	0,00000			
Seputuba	-0,08497	0,06842	-0,03448	-0,03677	0,02273	0,03333	0,00000		
Manso	-0,11461	0,13934	-0,11111	-0,08151	0,07825	0,00000	-0,14607	0,00000	
Jaurú	-0,11461	0,13934	-0,11111	-0,12231	-0,06711	-0,09091	-0,14607	-0,33333	0,00000

A relação filogenética entre os haplótipos encontrados no Pantanal Mato-grossense foi observada na rede haplotípica, que mostra tanto as relações entre os dois grandes demes (Pantanal Norte e Pantanal Sul) como as relações entre as populações inseridas nestes demes (os nove rios amostrados), conforme mostra a figura 4a e 4b, respectivamente. A rede haplotípica apresentou um formato estrelado tendo como eixo central o haplótipo mais

freqüente (Cb2) presente em seis das nove localidades amostradas e do qual partiram os demais haplótipos da rede. Sua maior ocorrência foi nas áreas referentes ao pantanal norte, porém também esteve presente no pantanal sul (Figura 4).



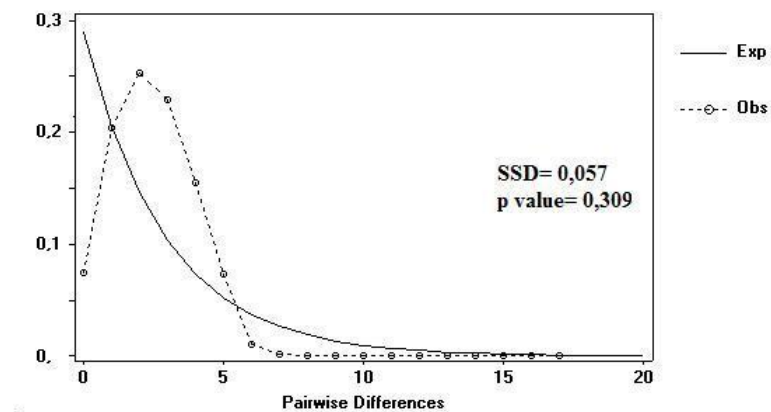
**Figura 4-** Rede de haplótipos de *S.brasiliensis* referente ao marcador molecular Citocromo b. **Em A:** Análise evidenciando o relacionamento entre norte e sul do pantanal. **Em B:** Análise evidenciando o relacionamento entre os rios. Os círculos representam os haplótipos identificados por letras e números (Cb1,Cb2...). O tamanho do círculo indica a freqüência do haplótipo na amostra. Cada linha representa os passos mutacionais. As redes foram desenhadas pelo programa Network.

Esta configuração estrelada da rede de haplótipos indica a ocorrência de uma expansão genética populacional, embora não tenha deixado claro uma relação entre os haplótipos e o local de amostragem. É possível observar ainda que a cada momento de crescimento (expansão) apresentado na rede encontra-se a ocorrência de haplótipos compartilhados entre norte e sul do pantanal, reforçando a idéia de ligação entre as áreas (unidade genética) e/ou tempo curto para separação em populações.

A idéia de expansão populacional é corroborada pelos resultados negativos dos testes de neutralidade: (Tajima'D= -1,371168 e Fs de Fu= -18,337) que não rejeitam a hipótese nula ( $p > 0,10$ ). Já os outros testes de neutralidade:  $D^* = -2,50528^*$ ;  $F^* = -2,49674^*$  apresentaram valores significativos para rejeitar a hipótese nula ( $*p < 0,05$ ). Valores abaixo de zero (negativos) para D sugerem expansão populacional e/ou seleção purificadora (Holsinger, 2006); podendo esse padrão ser ainda devido ao crescimento populacional, um *bottleneck*

menos recente ou migração (Schmidt *et.al.*, 2002). Segundo esses autores esta estatística pode ser influenciada tanto pela história populacional como pela seleção natural.

O gráfico da curva de distribuição das diferenças (“*mismatch distribution*”) encontrado para *S.brasiliensis* no Pantanal apresentou um padrão de curva unimodal representando uma população em expansão (não desviaram significativamente ( $p > 0.05$ ) do modelo de expansão) (Figura 5). Esse resultado reforça a idéia formulada pelos testes anteriormente comentados. Gráfico com padrões de curvas bi- ou multimodais geralmente são apresentados por populações estáveis, enquanto que, em populações que sofreram expansão demográfica recente são freqüentemente observadas curvas unimodais (Rogers e Harpending, 1992; Harpending, 1994).



**Figura 5** - Gráfico da curva de distribuição das diferenças “*mismatch distribution*” obtidos para as seqüências do fragmento do Cit de *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense. A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas pelo modelo de expansão populacional foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

### V.1.3 - Região Controle (D-loop)

Para este marcador molecular foram seqüenciadas 633pb para 81 indivíduos (44 sítios polimórficos), resultando em 42 haplótipos (Tabela 8).

Embora tenham sido definidos 42 haplótipos, nenhum esteve presente em todas as populações. Apenas 10 haplótipos foram compartilhados entre as porções norte e sul do Pantanal e os 32 haplótipos restantes distribuíram-se em populações do norte ou do sul (Tabela 8 e 9).



**Tabela 8-** Haplótipos de *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense e suas freqüências, encontrados com o marcador da região controle (D-loop). Em negrito as bases mutadas. Os números correspondem à posição da base na sequência gênica.

Haplótipo	Sequências de bases mutadas 13.14.59.81.83.84.102.123.127.129.145.151.172.174.176.183.190.246.261.273.284.301.302.306.320.336.337.341.348.349.352.353.363.366.373.387.394.395.398.399.413.416.464.519	Localidade	
		Rios de MS	Rios de MT
D1	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCATTTCGATTCTTTTCTTAGA	Miranda (1) Formoso (1) Taquari (1)	Cuiabá (1) SLourenço(1)
D2	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGATTTCCTTTCTTAGA	Formoso (1)	Cuiabá (1) Paraguai (1)
D3	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGATTCTTTCCTTAGA	Miranda (1)	-
D4	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGATTCTTTTCTTAGA	Miranda (2) Taquari (2)	Paraguai (2) Cuiabá (2) SLourenço(1) Manso (1) Sepotuba (1)
D5	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGATTTTTTTCTTAGA	Taquari (1) Formoso (1)	Paraguai (1) SLourenço (1) Manso (2) Sepotuba (1)
D6	TACTTCGTTAAAGATGGTTAACAATACTCGACTCTTTTCTCCA	Formoso (1) Miranda (1)	-
D7	TACTTCGTTAAAGATGGTTAACAATACTTGACTCTTTTCTCGAA	-	Paraguai (1)
D8	TACTTCGTTAAAGATGGTTAACAATACTCGACTCTTTCCTCGAA	-	SLourenço (1)
D9	TACTCTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGACTTTTTCTCTAGA	-	Cuiabá (1) SLourenço (1) Manso (1)
D10	TACTCTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGACTCTTTCCTTAGA	-	Paraguai (1)
D11	TACTCTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGACTCTTTCCTTAGA	-	Paraguai (2)
D12	TACTCTGTTAAAGATGATTGACAACATTTCGACTCTTTCCTTAGA	-	Paraguai (1)
D13	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGATTCTTCCCTTAAA	Taquari (1)	Paraguai (1)
D14	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAGCATTTCGACTCTTTCCTTGAA	-	Manso (1) Cuiabá (1)

D15	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATCCGACTCTTTCCTTAA A	-	Paraguai (1) Jauru (1)
D16	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTCCTTAA A	-	SLourenço(1)
D17	TATTTTACTAGAGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTCCTTAA A	-	Cuiabá (1)
D18	TATTTTACTAGAGGTGATCAACAACATTTCGACTCTTTCCTTAA A	Formoso (1)	Paraguai (2)
D19	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTCCTTAA A	-	SLourenço (1)
D20	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTCCTTAA A	Taquari (1)	-
D21	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTTTTTTAA A	Formoso (2)	SLourenço (1) Cuiabá (1)
D22	TATCTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTTTTTTAA A	Miranda (1)	-
D23	TATCTTGCTAGGGGTGATTAACAACATTTCGACTCTTTTTTTTAA A	Taquari (1)	-
D24	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACATTTCGGCTCTTTCCTTAA A	-	Cuiabá (1)
D25	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAACGTTTCGACTCTTTCCTTAA A	Miranda (1)	Sepotuba (1)
D26	TACTTTGCTAGAGGTGATTAACAACGTTTCGTCTCTTTCCTTAA A	-	Sepotuba (2)
D27	TATTTTGCTAGAGGTGATTAACAATATTTGACCCTTTCCTTAA A	-	Cuiabá (1)
D28	TACTTTGTTAGAGATGACTAACAGCACTCGACTCTTTCCTTAA A	Taquari (2)	-
D29	TACTTCGTTAAAGATGGTTAACAATACTCGACTCTTTTCTCGAA	Taquari (1)	Cuiabá (2)
D30	TACTTCGTTAAAGATAGTTAACAATACTCAACTCTTTTCTCGAA	-	Cuiabá (1)
D31	TACTTTGTTGAAGACGATTAACAGCACTCGATTCTCTCCTTAGA	-	Cuiabá (1)
D32	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCATTTCGATTCTCTCCTTAGA	-	Sepotuba (1)
D33	TACTTTGTCAAAGATGATTAACAGCACTCGATTCTTTTCTTAGG	Miranda (1)	Paraguai (1)
D34	TACTTTGTTAAAAATGATTAACAGCACTCGATTCTTTTCTTAGA	Miranda (1)	-
D35	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACCCGATTCTTTTCTTAGA	-	Sepotuba (1)
D36	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGATTCTTTTCTTAGA	-	Sepotuba (1)
D37	TACTTTGTTAAAGATGATTAATAGCACTCGATTCTTTTCTTAGA	-	Sepotuba (1)
D38	TACTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGACTTTTTCTTAGA	-	Sepotuba (1)
D39	TACTCTGTTAAAGATGATTAACAGCACTTGACTCTTTCCTTAGA	-	Cuiabá (1)
D40	AGCTCTGTTAAAGATGATTAGCAGCACTCGATTCTTTCCTTAGA	-	Cuiabá (1)
D41	AGCTTTGTTAAAGATGATTAACGGCACTCGATTCTTTTCTTAGA	-	Paraguai (1)
D42	AGCTTTGTTAAAGATGATTAACAGCACTCGATTCTTTTCTTAGG	-	Cuiabá (1)

Através da análise das seqüências alinhadas observou-se que as bases alteradas se localizaram até 520pb, concentrando-se em maior número entre 305 a 420pb, permanecendo depois sem alterações até o final do fragmento (Anexo2).

A relação transição/ transversão total (R) estimada a partir do conjunto de dados foi 34,325 sendo a média das freqüências de nucleotídeos iguais a: A(31,1%), T(34,3%), G(17,4%) e C(17,2%), demonstrando um conteúdo AT superior ao GC. Isso também tem sido verificado para outros peixes (Martins *et.al.*, 2003, Nicod *et.al.*, 2004).

O haplótipo mais freqüente foi D4, que também ocupou a posição ancestral na rede haplotípica onde dele derivaram todos os demais haplótipos (Figura 6). Esteve presente em sete das nove localidades coletadas, em rios do alto e baixo pantanal (Tabela 8e 9).

O número médio de diferenças nucleotídicas (k) da região controle foi de 7,54630 resultando em uma diversidade de haplótipos, que variou de 0,900-1,000, com um valor (Hd) médio igual 0,97(Tabela 9). A diversidade nucleotídica geral (Pi) igual a 0,01192, variando de 0,0092 - 0,0190 nas populações do Pantanal norte e de 0,0100 - 0,0130 nas populações do Pantanal sul (Tabela 9).

**Tabela 9**– Diversidade genética de *S.brasiliensis* referente à análise da Região Controle (D-loop). N= tamanho da amostra; h= número de haplótipos; k=média do número de diferenças; Hd= diversidade haplotípica; Pi= diversidade nucleotídica. Em negrito os haplótipos exclusivos de cada localidade. \* Em asterisco, a análise feita no geral entre as duas grandes áreas.

<i>Localidade</i>		<i>N</i>	<i>H</i>	<i>Haplótipos e (freqüência)</i>	<i>K</i>	<i>Hd</i>	<i>Pi (π)</i>
Pantanal Sul	Miranda	9	8	D1(1),D3(1),D4(2),D6(1), <b>D22(1)</b> ,D25(1),D33(1), <b>D34(1)</b>	6,39	0,97	0,0100
	Formoso	7	6	D1(1),D2(1),D5(1),D6(1),D18(1), D21(2)	8,19	0,95	0,0130
	Taquari	10	8	D1(1),D4(2),D5(1),D13(1), <b>D20(1)</b> , <b>D23(1)</b> , <b>D28(2)</b> ,D29(1)	7,15	0,95	0,0113
Pantanal Norte	Cuiabá	14	13	D1(1),D2(1),D4(1),D14(1), <b>D17(1)</b> ,D21(1), <b>D24(1)</b> , <b>D27(1)</b> ,D29(2), <b>D30(1)</b> , <b>D39(1)</b> , <b>D40(1)</b> , <b>D42(1)</b>	9,60	0,99	0,0152
	São Lourenço	8	8	D1(1),D4(1),D5(1), <b>D8(1)</b> ,D9(1), <b>D16(1)</b> , <b>D19(1)</b> , D21(1),	7,93	1,00	0,0125
	Paraguai	16	13	D2(1),D4(2),D5(1), <b>D7(1)</b> , <b>D10(1)</b> , <b>D11(2)</b> , <b>D12(1)</b> ,D13(1),D15(1),D18(2), <b>D31(1)</b> ,D33(1), <b>D41(1)</b>	8,25	0,97	0,0130
	Sepotuba	10	9	D4(1),D5(1),D25(1), <b>D26(2)</b> , <b>D32(1)</b> , <b>D35(1)</b> , <b>D36(1)</b> , <b>D37(1)</b> , <b>D38(1)</b>	6,13	0,98	0,0097
	Jaurú	2	2	D9(1),D15(1)	12,0	1,00	0,0190
Manso	5	4	D4(1),D5(2),D9(1),D14(1)	5,80	0,90	0,0092	
<b>Total / Media</b>	-	<b>81</b>	<b>42</b>	-	<b>7,55</b>	<b>0,97</b>	<b>0,0119</b>
<b>* Análise de polimorfismo genético entre demes maiores – Região controle (D-loop)</b>							
Pantanal Norte		55	35	-	7,85	0,97	0,0124
Pantanal Sul		26	17	-	6,92	0,96	0,0109

Resultados referentes às inferências de distâncias genéticas (p distance) mostraram que os valores médios de divergência evolutiva entre as populações dentro dos grupos Pantanal norte e sul (entre os rios) variaram de 0,9% a 1,4% (Tabela 10). A média da distância genética entre os grupos norte e sul foi de 1,2%, a média dentro de cada grupo também pode ser observada na Tabela 10.

**Tabela 10-** Estimativas da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de *S. brasiliensis* no Pantanal (D-loop). d (média): distância genética intra populacional. Os valores das distâncias estão em porcentagem (%).

	Miranda	Formoso	Taquari	Cuiabá	Paraguai	SLourenço	Seputuba	Manso	d (media)
Miranda									1,0%
Formoso	1,1								1,3%
Taquari	1,0	1,1							1,1%
Cuiabá	1,3	1,3	1,3						1,5%
Paraguai	1,1	1,3	1,2	1,4					1,3%
SLourenço	1,1	1,1	1,1	1,3	1,2				1,3%
Seputuba	0,9	1,1	1,0	1,3	1,1	1,1			1,0%
Manso	0,9	1,1	1,0	1,3	1,1	1,1	0,9		0,9%
Jaurú	1,4	1,3	1,3	1,4	1,3	1,2	1,2	1,2	1,9%

Para este marcador os valores de distância genética entre as populações em todas as análises realizadas foram maiores que os apresentados na análise com o gene Cit b. Todavia, eles corroboram no sentido de não demonstrarem separação consistente entre as populações do Pantanal Mato-grossense.

Outra observação feita foi a respeito da análise evolutiva na diversidade das seqüências, onde constatou que a diferença maior é intra-populacional (média de 1,2%), sendo o coeficiente de diferenciação evolutiva das seqüências 2,1%.

Esses resultados sugerem a existência de trocas gênicas entre as populações do pantanal norte e sul, e podem ser reforçados com os dados apresentados na AMOVA e Fst.

Análises da Variância Molecular (AMOVA) para o Pantanal norte e sul mostrou que as variações ocorreram mais dentro dos grupos do que entre os grupos (Tabela 11), ou seja, existe um maior percentual de variação dentro do Pantanal Norte e dentro do Pantanal Sul, do que entre eles. O valor negativo do Fst estimado (-0,00650, p= 0,62072± 0,01369) demonstra que não existe diferenças genéticas significativas entre as populações do norte de do sul do pantanal intuindo a existência de fluxo gênico entre as localidades, assim como o encontrado com o marcador Cit b.

Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par demonstraram a não ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as populações do dourado, como pode ser conferido na Tabela 12 e sua significância ( $p < 0.05$ ) foi testada por meio de permutações dos haplótipos (1023

permutações). O teste exato da diferenciação de amostras também não foi significativo quanto à diferenciação entre as populações, apresentando valores exatos de  $p = 0,66198 \pm 0,02933$  (100000 réplicas, teste de Markov).

**Tabela 11-** Análise da variância molecular (AMOVA),  $F_{ST}$ , entre as populações de *S.brasiliensis* coletados no Pantanal Norte e Sul.

Análises	Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Pantanal Norte	Entre os grupos	1	0,401	0,00212 Va	0,44
	Entre as populações dentro dos grupos	7	3,340	0,00102 Vb	0,21
Pantanal Sul	Dentro das populações	72	34,987	0,48593 Vc	100,65
<b>Total</b>		80	38,728	0,48280	-
Índices de Fixação		FSC: -0,00209	FST: -0,00650	FCT: -0,00439	-
Valores de p		0,52688±0,01246	0,62072±0,01369	0,84946±0,01056	-

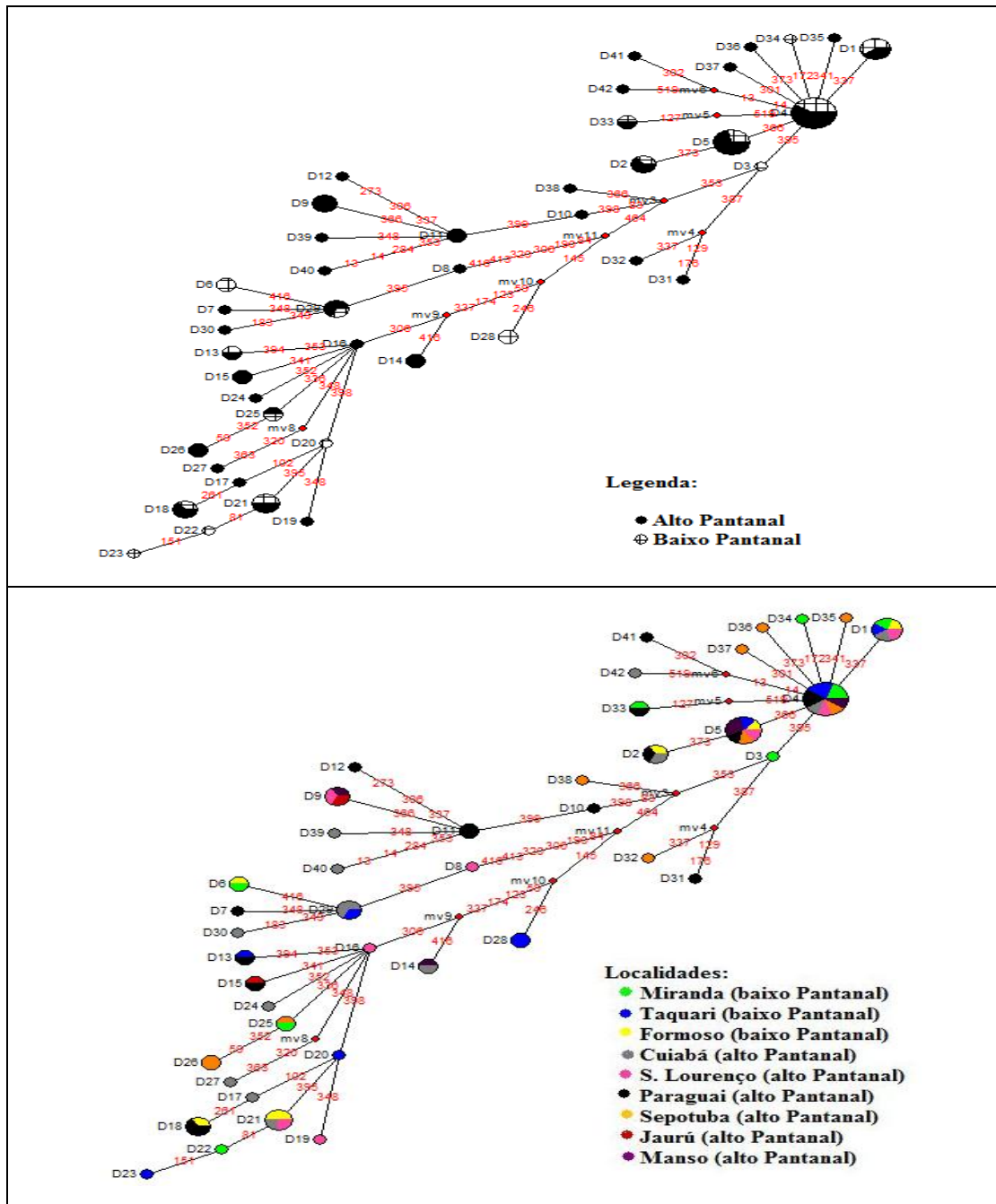
**Tabela 12-** Valores de  $F_{ST}$  par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências da região controle (D-loop) de *S.brasiliensis*. \* $P < 0,05$ .

	Miranda	Formoso	Taquari	Cuiabá	Paraguai	SLourenço	Sepotuba	Manso	Jaurú
Miranda	0,00000								
Formoso	0,00579	0,00000							
Taquari	-0,02049	0,01789	0,00000						
Cuiabá	-0,00488	-0,01336	-0,00879	0,00000					
Paraguai	-0,00870	-0,00037	-0,00327	0,00473	0,00000				
SLourenço	-0,02879	-0,05170	-0,02868	-0,02159	-0,01040	0,00000			
Sepotuba	0,00865	0,02030	0,00344	0,00935	0,00501	-0,01396	0,00000		
Manso	0,01656	0,01587	-0,01161	0,02110	0,00732	-0,05947	-0,00324	0,00000	
Jaurú	0,01999	0,03377	0,03226	0,00804	-0,01343	-0,06667	0,01606	-0,03604	0,00000

A rede haplotípica possibilitou a análise da relação filogenética entre os haplótipos encontrados na grande bacia do Pantanal. Foram feitas duas análises uma entre as duas grandes áreas Norte e Sul do pantanal e outra entre os rios coletados, os resultados foram coincidentes em ambas as análises (Figura 6a e 6b). Embora não tenham sido reveladas relações claras entre os agrupamentos de haplótipos e a sua distribuição geográfica o formato estrelado da rede sugere expansão geográfica para o grupo analisado.

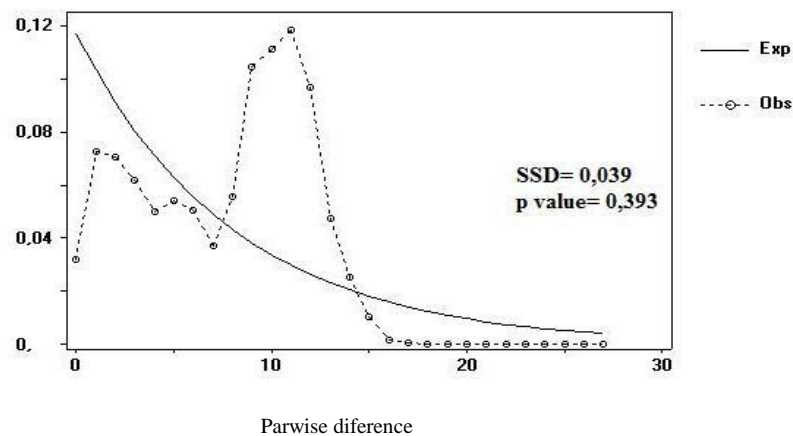
Os resultados adquiridos com as análises das redes haplotípicas foram similares entre os dois marcadores utilizados neste estudo demonstrando claramente momentos de expansão com ramificação mista de haplótipos do norte e sul do pantanal, reforçando a idéia de ligação entre as áreas (unidade genética) e/ou tempo curto para separação em populações mais restritas. A idéia de expansão populacional foi corroborada pelos resultados negativos

dos testes de neutralidade realizados pelo programa DNAsp: (Tajima'D= -0,59956; D\*= -0,58329; F\*= -0,70639) (não significante,  $p > 0.10$ ) e Fs de Fu= -1,50370 ( $p=0,22522$ ) que não rejeitam a hipótese nula.



**Figura 6-** Rede de haplótipos de *S.brasiliensis* referente à região controle (D-loop). **Em A:** Análise evidenciando o relacionamento entre pantanal norte e sul. **Em B:** Análise evidenciando o relacionamento entre os rios. Os círculos representam os haplótipos identificados por letras e números (D1,D2...). O tamanho do círculo indica a frequência do haplótipo na amostra. Os losangos vermelhos indicam os haplótipos intermediários inferidos que não foram encontrados nas amostras e cada linha representa os passos mutacionais. As redes foram desenhadas pelo programa Network.

Já a análise de distribuição das diferenças (“*mismatch distribution*”) indicou que as curvas de distribuição das amostras populacionais por meio do marcador D-loop apresentaram um padrão multimodal o qual coincide com as curvas esperadas para populações que se encontram em equilíbrio. Estes resultados são apoiados com os valores encontrados no teste da soma dos desvios dos quadrados (Figura 7), no entanto, eles diferem do resultado encontrado com o Cit b para as mesmas populações.



**Figura 7** - Gráfico da curva de distribuição das diferenças obtido para as seqüências do fragmento da região controle (D-loop) de dourado do Pantanal Mato-grossense. A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas pelo modelo de expansão populacional foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

#### V.1.4 – Discussão

De todos os trabalhos realizados até o momento, esse é o primeiro estudo em que diferentes populações de *S. brasiliensis* foram amostradas ao longo de toda extensão do Pantanal Mato-grossense e tiveram a variabilidade e estrutura genética populacional acessada por meio de dois marcadores mitocondriais, o Cit b (um gene mais conservado) e a região controle (uma região mais variável). O conhecimento da variabilidade genética e da estrutura populacional das espécies tem sido considerado um princípio fundamental para a manutenção dos estoques nativos (Frankham *et.al.* 2010), seja de espécies ameaçadas ou daquelas de interesse comercial. O DNAm é reconhecido como uma excelente ferramenta para se analisar diferenças genéticas em populações animais (Awise, 2000; Clabaut *et.al.*, 2005) e os nossos resultados com o Cit b e a Região controle (D-loop) corroboram essa afirmativa.

As populações de *S. brasiliensis* aqui estudadas apresentaram índices relativamente altos de variabilidade genética, embora não tenha sido evidenciada estruturação genética entre as populações. Esse resultado contrasta com o relatado em estudos anteriores com populações de outros sistemas hidrográficos, como o Alto Rio Paraná e Rio Uruguai (Machado *et.al.* 2005; Ramella *et.al.* 2006) e Rio Paranapanema (Lopes *et.al.* 2007), que registraram entre baixos e moderados níveis de variação genética, porém mostra evidências de estruturação populacional, nesse último.

A variabilidade encontrada nos dourados do Pantanal se reflete nos dados de diversidade e diferenciação genética apresentados tanto para o gene mais conservado (Cit b) quanto para a região mais variável (região controle). Ambos os marcadores, apesar de suas particularidades na detecção das diferenças genéticas entre organismos, corroboraram entre si com os índices de polimorfismo genético por eles encontrados, com sutis diferenças de valores devido à maior sensibilidade do marcador. Valores de diversidade nucleotídica relativamente altos foram mais sensivelmente detectados pelo D-loop, embora a diversidade haplotípica tenha sido detectada com valores altos para ambos os segmentos do DNAm. A variação desta diversidade foi pouca coisa maior entre os locais de coleta no Pantanal Norte comparados aos no Pantanal Sul.

As médias de diversidade haplotípica para Cit b de 0,93 e para região controle de 0,97 revelaram a presença de um grande número de haplótipos (haplótipos encontrados em apenas uma das localidades; haplótipos compartilhados por várias localidades do pantanal norte e pantanal sul; e nenhum haplótipo comum a todas as localidades).

Os haplótipos compartilhados entre as regiões geográficas distantes e os baixos valores encontrados para distância genética intra e intergrupos evidenciaram um significativo grau de paridade entre as populações das sub-bacias estudadas, demonstrando que o extravazamento dos rios durante a cheia no Pantanal, pode estar facilitando o contato da ictiofauna e promovendo a similaridade genética.

Já os resultados encontrados por Machado *et.al.* (2005) para a mesma espécie, em outro sistema hidrográfico, sugerem uma diferenciação genética entre as populações nos diferentes rios, enfatizando que as distâncias geográficas foram as responsáveis pelas diferenças, uma vez que, populações vizinhas como as dos rios Sinos e Jacuí não foram significativamente diferentes entre si, mas foram significativamente diferentes das populações mais distantes como as rio Uruguai e Corrientes.



A diferença entre esses dois trabalhos reflete a importância e a influência direta do habitat no comportamento genético da espécie, pois a estruturação ou não das populações estudadas em ambos os casos parece estar relacionadas mais com a geomorfologia de cada bacia hidrográfica e as condições ambientais diferenciadas, do que com alguma particularidade da espécie em si.

Ramella *et.al.* (2006) estudando a mesma espécie também na bacia do Rio Uruguai pôde perceber uma alta variabilidade genética entre indivíduos e verificou uma divisão bem definida entre dois grupos, demonstrando, como em Machado *et.al.* (2005), que a bacia do Rio Uruguai pode estar apresentando condições ambientais que remetem a uma maior diferenciação genética entre populações de dourados, levando-os a processos de estruturação. Como comentado pelos autores, esse fato pode estar diretamente relacionado às inúmeras barragens construídas na região. A problemática das hidrelétricas na ruptura do percurso migratório dos peixes, conseqüente redução de estoques e estruturação de populações tem sido relatada na bacia do Paraná para essa e outras espécies de dourado (Shibatta *et.al.*, 2007; Esguícero e Arcifa, 2009).

Na região do Pantanal, apesar dos inúmeros projetos de hidrelétricas que tramitam pelas instâncias responsáveis, poucas se encontram instaladas e em funcionamento nos arredores da planície pantaneira, não demonstrando estar influenciando até o momento, para a estruturação genética populacional da espécie estudada.

Os dados de diversidade genética até agora comentados nos leva ainda, a uma estimativa indireta da existência de fluxo gênico entre as populações das sub-bacias no Pantanal, considerando que o fluxo gênico pode ser inferido indiretamente pela análise da partição da variação genética entre populações (Lowe *et.al.* 2006). É reconhecido como a força de coesão que une as populações geograficamente separadas em uma única unidade evolutiva da espécie (Allendorf e Luikart, 2007), promovendo uma associação entre distância genética e geográfica. E isso pode ser identificado no presente estudo, onde a sugestiva presença de intenso fluxo gênico esteja proporcionando uma maior similaridade genética entre os indivíduos do Pantanal como um todo, independente de sua localidade mais ao norte ou ao sul da bacia.

Essa similaridade genética entre as populações pode estar sendo proporcionada também por um processo natural da região, a coalescência das águas, que promove a conectividade temporária entre áreas isoladas ou parcialmente isoladas, durante o período das enchentes e das cheias dos rios no Pantanal. Nesta época os rios transbordam do seu leito

principal e ligam-se às baías, a outros rios, a corixos e sangradouros rompendo possíveis limites (Alvarenga *et.al.*, 1984; Ponce, 1995; Segovia 2000; Assine, 2003; Ab'Saber, 2007), que aliado à imensa vagilidade e necessidade migratória reprodutiva do dourado auxiliam no fluxo gênico e a aproximação genética entre as localidades a despeito de suas distâncias geográficas. Populações que habitam ambientes similares, que ficam em comunicação, com contínua migração e fluxo gênico podem apresentar homogeneidades genéticas (Carvalho, 1993).

Essa observação é ainda reforçada com os dados revelados pela Amova e  $F_{st}$  calculados entre o Pantanal norte e sul, verificando-se que a variação genética ocorre em maior proporção dentro das populações do que entre as regiões do Pantanal. Resultados similares, ressaltando uma maior variação genética dentro dos grupos do que entre os grupos populacionais, já foram reportados para a mesma espécie em outras bacias hidrográficas (Machado *et.al.* 2005; Lopes *et.al.* 2007). Estudos anteriores com outras espécies de peixes migradores também verificaram esse padrão de variação genética. No Pantanal, podemos destacar o estudo com *Zungaro jahu* (Carillo-Avila, 2009) e em outras bacias hidrográficas, os estudos em *Piaractus mesopotamus* (Povh *et.al.*, 2008); *Prochilodus lineatus* (Revaldaves *et.al.*, 1997; Sivasundar *et.al.*, 2001); *Prochilodus costatus* (Carvalho-Costa *et.al.*, 2008).

A existência de fluxo gênico entre as sub-bacias que compõe a malha hídrica do Pantanal também foi reforçada pelos valores negativos e não significativos do índice de fixação ( $F_{st}$ ) apresentados pelos dois marcadores genéticos utilizados. Os dois efeitos primários apresentados pelo fluxo gênico são a redução das diferenças genéticas entre as populações e o aumento da variação genética dentro das populações (Allendorf e Luikart, 2007). Esses dois efeitos são claramente visíveis nas populações de *S. brasiliensis* estudadas no Pantanal Mato-grossense, demonstrando que estas populações não se encontram estruturadas e que existe fluxo de genes entre as localidades, norte e sul do Pantanal.

Saliente-se que a estrutura genética populacional refere-se à distribuição da variação genética entre e dentro de populações e é consequência das forças evolutivas que agiram nas populações ao longo do tempo (Nei e Kumar, 2000; Allendorf e Luikart, 2007), como migração, mutação, seleção e deriva. Considerando que essas forças estão, de certa forma, relacionadas ao tamanho populacional, podemos sugerir que para essa espécie o tamanho populacional efetivo pode ser bastante grande na bacia do Pantanal e que associado aos dados até agora apresentados, pode explicar a variação de haplótipos encontrada, bem como a presença de haplótipos únicos em quase todas as localidades. Nasquelas espécies que

apresentam populações de grandes tamanhos são esperados altos valores de polimorfismo genético, uma vez que as possibilidades de consangüinidade são reduzidas (Nei, 1977; Frankham *et.al.*, 2010).

Lima (2006) relatou ainda que apesar da ampla distribuição, *S. brasiliensis* apresenta uma variação geográfica muito pequena. Sua elevada capacidade migratória deve refletir um extenso contato histórico entre as populações da espécie na bacia Platina. A distância geográfica parece ser insignificante perante a atividade migratória da espécie, uma vez que também existem relatos de marcação e recaptura, onde se verifica que o dourado tem capacidade de dispersar a longas distâncias, percorrendo de 100-500 km (Bonetto *et.al.*, 1971) a 1440 km (Sverlij e Espinach Ros, 1986) do ponto de captura inicial.

No presente trabalho, também verificamos que a variação geográfica entre as populações estudadas se torna pequena em relação à variabilidade e a distância genética encontrada entre os grupos analisados. Essa reflexão nos ajuda a compreender o compartilhamento de haplótipos entre as distantes bacias.

Sivasundar *et.al.* (2001) também encontraram estreitas relações genealógicas entre haplótipos de DNAm entre localidades distantes a cerca de 2600 km, para a espécie *Prochilodus linetaus* no sistema Paraná-Paraguai e sugeriram que a vasta área drenada pela bacia do Paraná e a elevada vagilidade de *Prochilodus* dentro da bacia poderia ter impedido a separação de sub-populações por longos períodos evolutivos.

Tanto *Prochilodus* como *Salminus* são peixes migradores, principalmente em períodos reprodutivos quando nadam rio acima para dar fluência a um processo biológico natural. Nessa subida, acabam se misturando com cardumes ou populações originários de sub-bacias diferentes, gerando oportunidades de trocas genéticas entre diferentes populações geográficas.

Isso corrobora a idéia que a migração é muito mais efetiva em restaurar a diversidade genética do que a mutação (Frankham *et.al.*, 2010). Como apresentado por este trabalho, os dourados no Pantanal Mato-grossense revelam que as diferenças se encontram mais dentro das populações do que entre elas.

Os resultados referentes às análises das redes haplotípicas, sugeriram a presença de momentos de expansão nas populações do pantanal sendo sua validade confirmada por meios dos testes de neutralidade seletiva que com seus valores negativos (que não rejeitam a hipótese nula) corroboraram com a hipótese de expansão populacional. No

entanto, diferenças foram detectadas nas análises de distribuição das diferenças (“*mismatch distribution*”) entre os dois marcadores genéticos utilizados.

Para o gene *Cit b* foi observado um padrão unimodal da curva de diferenças, que é indicativo de uma recente expansão populacional (Slatkin e Hudson, 1991; Rogers e Harpending, 1992; Harpending *et.al.*, 1998) ou de um certo grau de expansão com altos níveis de migração entre demes vizinhos (Excoffier, 2004). Reforçando então os resultados das redes e testes de neutralidade realizados.

Mas o observado para a região controle, por essa mesma análise, foi contraditório aos dados de expansão, já que foi verificado para esse marcador um padrão de curva multimodal, sugerindo a ocorrência de populações estáveis. Padrões de curvas bi- ou multimodais geralmente são apresentados por populações estáveis, e curvas unimodais são frequentemente observadas em populações que sofreram expansão demográfica recente (Rogers e Harpending, 1992; Harpending, 1994).

Embora essa disparidade tenha sido encontrada nos distintos marcadores, acredita-se que ao associarmos os dados moleculares obtidos para *S.brasiliensis* em estudo, aos aspectos paleomorfoestruturais da bacia do Pantanal poderemos compreender melhor o comportamento genético das populações desse grupo de peixes no tempo e espaço.

Considerando que a presença dos haplótipos compartilhados entre o pantanal norte e o sul possa refletir algum polimorfismo ancestral enfatizando que não houve tempo suficiente para separação entre os grupos populacionais na região do Pantanal Mato-grossense, a presença de haplótipos únicos sugere que também pode estar em curso alguma diferenciação entre essas populações. A presença desses haplótipos únicos pode ser vista em muitas espécies principalmente quando a diversidade genética está sendo analisadas em nível de seqüências de DNA, além disso, esses haplótipos são criados por mutações mais recentes e tornam-se cada vez mais raros nas espécies, em geral, ficando mais restritos geograficamente (Templeton, 2006).

Vários autores revelam que o Pantanal Mato-grossense como nós o conhecemos hoje se originou de uma seqüência evolutiva de eventos paleogeográficos condicionados por mudanças climáticas e tectônicas que permearam por milhares de anos intercalando-se entre períodos de estabilidade tectônica e intensos processos de atividade geológica que perduram do Pleistoceno até os dias atuais (Almeida, 1949; Assine, 2003; Ab’Saber, 2007).

Seus leques aluviais foram desenvolvidos entre 23 e 13 mil anos atrás passando de drenagens raquíticas, canais anastomosados, leitos trançados a rios meândricos de diferentes padrões e potenciais (Ab'Saber, 2007), onde canais temporários se tornaram permanentes, penerizando rios, criando pantanais e enriquecendo a ictiofauna (Assine, 2003).

O desenvolvimento do Pantanal não foi um evento isolado, fez parte do processo geológico evolutivo do sistema hidrográfico da América do Sul, que ocorreu durante o Cretáceo e Cenozóico (Lundberg *et.al.*,1998).

A diversidade de peixes neotropical tem uma longa e complexa história temporal ligada à gênese dos sistemas fluviais. Iniciou-se antes da separação completa da América do Sul com a África, tornando-se essencialmente moderna no fim do Mioceno (23M.a). O padrão de drenagem sul americano durante um período de aproximadamente 90M.a foi submetido a três longos processos de desenvolvimento, sendo moldado por eventos tectônicos globais e orogenéticos (Lundberg *et.al.*,1998; Ribeiro, 2007)

Diante desses aspectos podemos perceber que tanto a formação da própria bacia quanto de sua ictiofauna ocorreram de forma oscilante, entre eventos de estabilidade e de alterações geoclimáticas extremas, ao longo do tempo geológico, e que esses eventos foram se desenvolvendo em um processo de cadeia evolutiva interligados entre toda a região Sul Americana.

Assim sendo, as relações de expansão demográfica recente, ilustradas pelas redes haplotípicas e corroboradas pelos testes estatísticos podem estar refletindo esse estágio de desenvolvimento da bacia hidrográfica do Pantanal e o estabelecimento de sua ictiofauna acompanhando as alterações geoclimáticas ocorridas em um passado recente, de aproximadamente 13 mil anos conforme Ab'Saber (2007). Além disso, ressalta-se que não houve tempo suficiente para uma separação genética das populações de dourado entre regiões mais ao norte e mais ao sul do Pantanal e que, com o evento da reprodução, um provável número alto de migrantes esteja proporcionando fluxo gênico suficiente para manter a variabilidade e a conectividade genética entre essas áreas.

O quadro de expansão demográfica recente para populações no Pantanal Mato-grossense também foi observado em componentes da avifauna pantaneira obtidos com análises da Região Controle (domínio I) (Lopes *et.al.*, 2007b). Eles associaram as respostas dessas populações de aves às mudanças climáticas ocorridas nas áreas alagáveis durante o último período de glaciação, hipotetizando um tempo médio de 30.843 e 14.233 anos atrás.

Ressalta-se com isso a importância que o desenvolvimento geomorfológico, as alterações paleoclimáticas e os eventos tectônicos propiciaram no estabelecimento e adaptação das espécies de animais na imensa área alagável que é o Pantanal. Independente do *taxa*, as espécies parecem apresentar, num contexto geral, padrões similares na sua história demográfica.

Em síntese, as análises com os marcadores mitocondriais revelam que as populações de *S.brasiliensis* em toda a bacia do Pantanal Mato-grossense não se encontram geneticamente estruturadas, mostrando variabilidade genética relativamente alta; apresentam expansão populacional; curtas distâncias genéticas e diferenças não significantes entre sub-bacias sugerindo a ocorrência de fluxo gênico entre elas. É possível que esse quadro se revele dessa forma devido as características biológica da espécie e as particularidades da região à qual ela parece estar adaptada.

## **V.2- Análise filogeográfica e variabilidade genética de *Salminus brasiliensis* na bacia do Rio da Prata: Uma comparação entre o Pantanal e as sub-bacias do Paraná e Uruguai.**

### **V. 2. - Resultados**

A coesão genética entre as populações naturais de *S.brasiliensis* na bacia do rio da Prata foi estimada por meio do seqüenciamento parcial do DNAm, com dois marcadores moleculares: Citocromo b (Cit b) e Região Controle (d-loop) primeiro domínio.

Foram analisados 109 indivíduos, coletados nas sub-bacias do Alto Paraguai/Pantanal (n=97), do Uruguai (n=6) e Paraná (n=6). Dos quais, 73 indivíduos obtiveram sucesso no seqüenciamento do gene codificador Cit b e 93 tiveram qualidade nos seqüenciamentos da região controle. Os resultados para cada um dos marcadores são apresentados separadamente.

#### **V.2.1-Citocromo b (Cit b)**

##### **V.2.1.a – Estimativas de variabilidade genética**

O seqüenciamento das 73 amostras obtidas gerou fragmentos de 710pb com 70 sítios polimórficos. A variação neste marcador resultou em 29 haplótipos distribuídos entre as localidades como apresentado na Tabela 13. Nenhum haplótipo esteve presente em todas as três sub-bacias, no entanto, haplótipos comuns foram compartilhados entre: Uruguai e Pantanal (Paraguai), Uruguai e Paraná (Tabela 13).

A relação transição/ transversão total (R) estimada a partir do conjunto de dados foi 64,955 sendo a média das frequências de nucleotídeos: A(26,5%), T(28,4%), G(15,5%) e C(28,1%). Em sua maioria as mutações ocorreram na terceira base do códon sendo do tipo transição (92%), como é o esperado para esse marcador. Foram registradas oito mutações em comum entre a sub-bacia do Pantanal e do Uruguai, entre Pantanal e Paraná não foram encontradas mutações compartilhadas, a sub-bacia do Paraná compartilhou duas mutações apenas com Uruguai (Tabela 13 e Anexo 3).

**Tabela13** – Variações encontradas no fragmento seqüenciado do Cit b para *S. brasiliensis*, número e freqüência de haplótipos em cada sub-bacia. Em negrito as bases nucleotídicas mutadas. Os números correspondem à posição da base na seqüência gênica. Pan (bacia Pantanal), Uru (bacia Uruguai), Par (bacia Paraná).

Haplótipo	Seqüências de bases mutadas	Pan	Uru	Par
Cb1	ACATCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	8		
Cb2	ACATCACTCATTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	11	1	-
Cb3	ACATCACTCATTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAT	5	-	-
Cb4	ACATCACTCATTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCA <b>G</b> ACACTCACTAT	1	-	-
Cb5	ACATCACTCATTGAC <b>CC</b> ACGCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAT	1	-	-
Cb6	AC <b>G</b> TCACTCATT <b>AA</b> ACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb7	ACATCACTCATT <b>AA</b> AC <b>CC</b> ACGCGCCTCAGCCCAACACTAG <b>C</b> ATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb8	ACATCACTCATT <b>AA</b> ACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	8	-	-
Cb9	AC <b>CC</b> ACTCATTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb10	ACATCA <b>CC</b> CATTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb11	ACAT <b>C</b> <b>G</b> CCCATTTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	1	-
Cb12	ACATCACTCATTGACCT <b>AC</b> GCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACT <b>G</b> C	2	-	-
Cb13	ACATCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACT <b>C</b> GCTAC	7	-	-
Cb14	ACATCACTCATTGACCTGCG <b>C</b> ACCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGG <b>C</b> TCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb15	ACATCACTCATTGACCTGCG <b>C</b> ACCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb16	ACATCACTCATTGACCTGCG <b>C</b> ACCTCAG <b>C</b> CTAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb17	AC <b>G</b> TCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb18	AC <b>G</b> TCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAG <b>CC</b> <b>G</b> ACACTAATATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb19	AC <b>G</b> TCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAATATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	5	-	-
Cb20	AC <b>G</b> TCACTCATTGAC <b>CC</b> GCGCGCCTCAGCCCAACACTAATATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	2	-	-
Cb21	AC <b>G</b> TCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAATATCT <b>C</b> TAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb22	AC <b>G</b> TCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAATATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTC <b>CC</b> CAC	1	-	-
Cb23	AC <b>G</b> TCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAATATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACT <b>AA</b> CTAC	1	-	-
Cb24	ACATCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAATATCTTTAAAGGCCCTTCAAACACTCACTAC	1	-	-
Cb25	ACATCACTCATTGACCTGCGCGCCTCAGCCCAACACTAGTATCTTTAAAGGCCCTTCA <b>A</b> GC <b>A</b> CTCACTAC	1	-	-
Cb26	<b>G</b> TATTATCT <b>G</b> CCGTT <b>C</b> ATATGTTATGATT <b>C</b> AGTT <b>C</b> GATGCTCTCAGGAATCTCTTGGATGTCCG <b>T</b> C <b>G</b> C		1	1
Cb27	<b>G</b> TATTATCT <b>G</b> CCGTT <b>C</b> ATATGTTATGATT <b>C</b> AA <b>T</b> TT <b>C</b> GATGCTCTC <b>G</b> GGAATCTCTTGGATGTCCG <b>T</b> C <b>G</b> C		-	2
Cb28	<b>A</b> TATTATCT <b>G</b> CCGTT <b>C</b> ATATGTTATGATT <b>C</b> AGTT <b>C</b> GATGCTCTCAGGAATCTCTTGGATGTCCG <b>T</b> C <b>G</b> C		-	1
Cb29	<b>A</b> TATTATCT <b>G</b> CCGTT <b>C</b> ATATGTTATGATT <b>C</b> AA <b>T</b> TT <b>C</b> GATGCTCTC <b>G</b> GGAATCT <b>C</b> CTGGATGTCCG <b>T</b> C <b>G</b> C		-	1



Considerando todos os indivíduos amostrados, o número médio de diferenças nucleotídicas (k) encontrado entre os haplótipos é de 10,4224, resultando em uma diversidade haplotípica média (Hd) de 0,936 e diversidade nucleotídica de 0,0147. Os níveis de variabilidade genética para cada uma das sub-bacias pode ser verificado na Tabela 14. A população do Uruguai apontou maior índice de diferença nucleotídica entre seus haplótipos e conseqüentemente uma maior diversidade nucleotídica comparada às populações do Pantanal e Paraná.

**Tabela 14** – Diversidade genética observada nas populações de *S.brasiliensis* para cada sub-bacia. N= tamanho da amostra; h= número de haplótipos; k=média do número de diferenças; Hd= diversidade haplotípica; Pi( $\pi$ ) = diversidade nucleotídica.

	<b>N</b>	<b>h</b>	<b>Hd</b>	<b>Pi (<math>\pi</math>)</b>	<b>K</b>	<b>S</b>
<b>Pantanal</b>	65	25	0,926	0,00346	2,459	21
<b>Paraná</b>	5	4	0,900	0,00310	2,200	4
<b>Uruguai</b>	3	3	1,000	0,05164	36,666	56

A estimativa das diferenças evolutivas entre as populações de *S.brasiliensis* inferida pela distância genética (p distance) mostrou que a média de distância genética geral é de 1,5%. A Tabela 15 traz as distâncias calculadas entre as sub-bacias, bem como, a média dentro de cada população.

**Tabela 15-** Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de *S. brasiliensis* nas sub-bacias do Prata. d (média): distância genética intra populacional. Os valores das distâncias estão em porcentagem (%).

	Pantanal	Paraná	Uruguai	d (media)
Pantanal				0,3
Paraná	7,7			0,3
Uruguai	2,8	5,1		5,2

A sub-bacia do Paraná apresentou maior distância genética entre Pantanal, seguido de Uruguai. Enquanto a distância entre Pantanal e Uruguai foi ligeiramente menor, apesar de ter um valor estimado considerável. Outro parâmetro analisado foi o Índice de disparidade por pb (ID) que também apresentou valores bem altos do Paraná em relação as duas outras localidades (valores não apresentados).

### V.2.1.b – Estimativas de estruturação populacional e inferência filogeográfica

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) obtida para o fragmento do gene Cit b indicou que as maiores variações ocorreram dentro das populações do que entre os grupos (Tabela 16). O valor estimado do  $F_{ST}$  na amova de 0,04588 ( $p= 0,32845\pm 0,01427$ ) não foi significativo, não demonstrando diferença entre as amostras.

**Tabela 16-** Análise da variância molecular (AMOVA),  $F_{ST}$ , entre as populações de *S.brasiliensis* no Pantanal, Paraná e Uruguai. Significância do teste (1023 permutações).

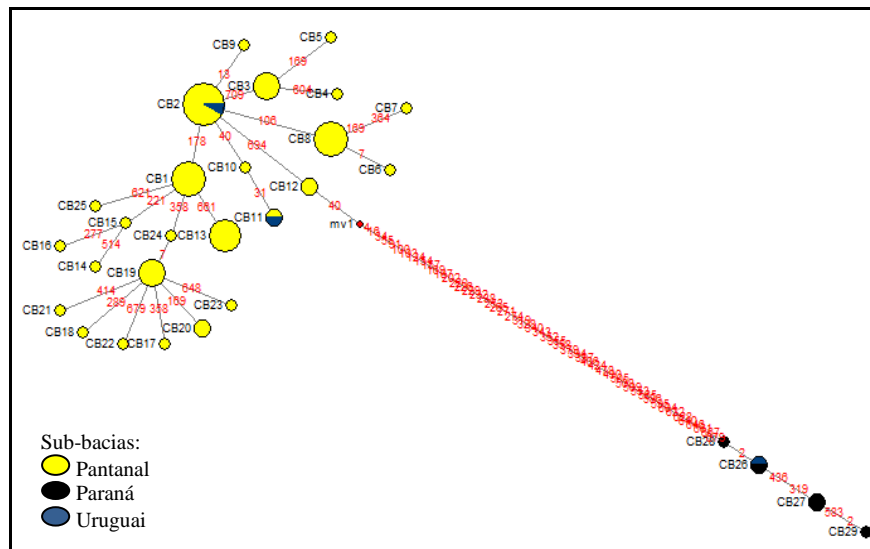
Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre os grupos	2	1,268	0,02417 Va	<b>4,96</b>
Entre as populações dentro dos grupos	8	3,618	-0,00182 Vb	- 0,37
Dentro das populaces	62	28,812	0,46472 Vc	<b>95,41</b>
<b>Total</b>	72	33,699	0,48706	-
Índices de Fixação	FSC: -0,00393	<b>FST: 0,04588</b>	FCT:0,04962	-
Valores de p	0,54839±0,01298	0,32845±0,01427	0,11144±0,01046	-

Já os valores de  $F_{ST}$  par-a-par demonstraram a ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as populações do dourado da sub-bacia do Pantanal e Paraná (0,08383\*). Pantanal e Uruguai não tiveram valores significantes (-0,01373) assim como Paraná e Uruguai (-0,00962). Considerando-se o valor de significância \* $P < 0,05$ .

A rede de relação filogenética entre os haplótipos observados nas sub-bacias é apresentada na Figura 8, mostrando uma separação entre dois conjuntos de haplótipos bem definidos por 51 passos mutacionais. Tais conjuntos correspondem as sub-bacias do Pantanal (na parte superior da rede) e Paraná (na parte inferior da rede), sendo que a sub-bacia do Uruguai compartilha haplótipos nos dois conjuntos ilustrados (Figura 8).

O haplótipo mais freqüente foi o Cb2 representado na rede como o ancestral de qual partem todos os demais ramos e suas derivações, inclusive o ramo maior que engloba os haplótipos encontrados na amostragem do Paraná.

A rede possui uma configuração estrelada demonstrando que as ramificações partem dos hapótipos mais freqüentes em direção aos haplótipos únicos (exclusivos). Este formato de rede é típico de populações em expansão.



**Figura 8** - Rede de haplótipos de *S. brasiliensis* referente ao marcador molecular Cit b evidenciando o relacionamento entre três sub-bacias. Os círculos representam os haplótipos identificados por letras e números (Cb1, Cb2...). O tamanho do círculo indica a frequência do haplótipo na amostra e os losangos vermelhos indicam os haplótipos intermediários inferidos que não foram encontrados nas amostras. Cada linha representa a distância por passos mutacionais (números em vermelho nas linhas). A rede foi desenhada pelo programa Network.

Os testes de neutralidade realizados (Tajima's D, Fu and Li's D\*, Fu and Li's F\* e Fu's de F) ajudaram a compreender a hipótese levantada na rede haplotípica. Na análise da população em geral os resultados dos testes (D= -0,92616; D\*= 0,84042 e F\*= 0,17044 ) não foram significantes ( $p > 0.10$ ), não rejeitando a hipótese nula de neutralidade. O teste D de Tajima apresentou valor negativo, indicativo de população em expansão.

Quando as sub-bacias foram analisadas separadamente foram observados valores negativos para alguns dos testes (Tabela 17), esses valores também não foram significantes ( $p > 0.10$ ). Devido o número amostral ser inferior ao mínimo exigido por estes testes (5amostras), não foi possível obter resultados para a sub-bacia do Uruguai.

**Tabela 17.** Testes de neutralidade aplicados as seqüências do fragmento do Cit b de *S. brasiliensis* em cada uma das sub-bacias amostradas.

	Pantanal	Paraná	Uruguai
Tajima's D	-1,37117	0,95707	-
Fu and Li's D*	-2,50528	0,95707	-
Fu and Li's F*	-2,49674	0,97418	-
Fu's de F	-18,337	-0.84824	-

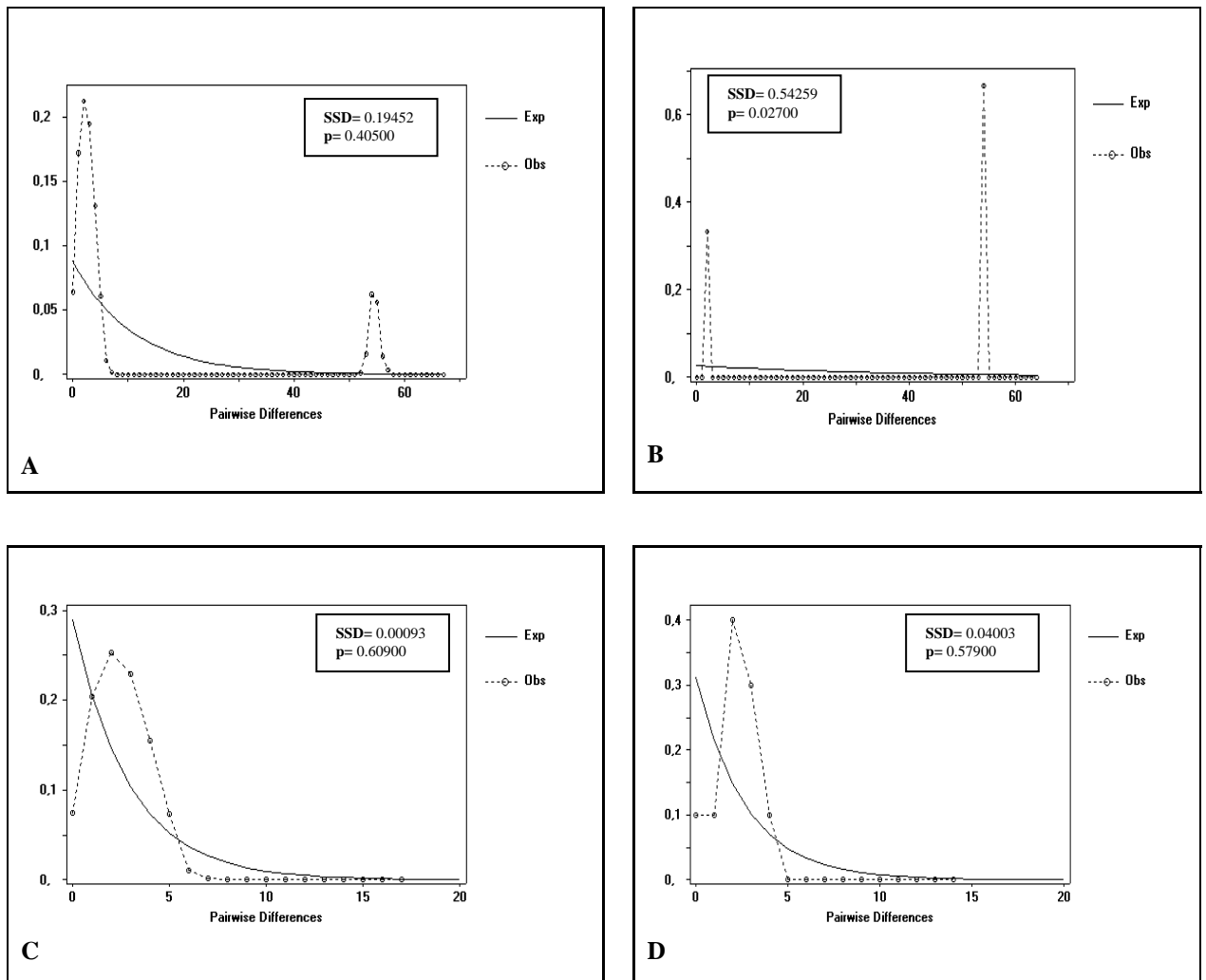
Tendo em vista as diferenças apresentadas em alguns testes de neutralidade entre Pantanal e Paraná, foram realizados outros dois: o teste exato de Fisher's e o Codon-Z.

Para verificar a possibilidade de rejeição da hipótese nula de neutralidade estrita em favor da hipótese alternativa de seleção positiva.

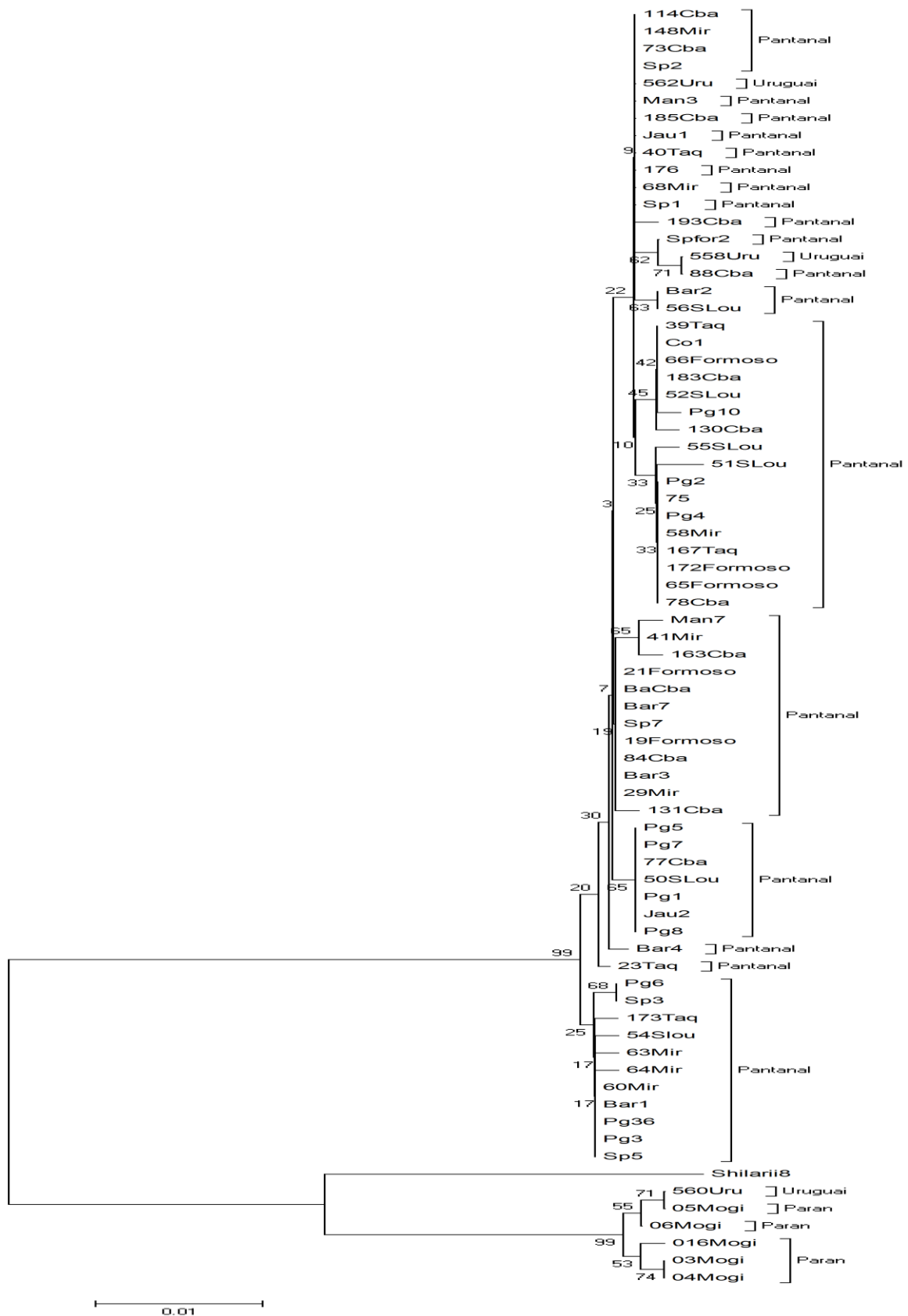
Os resultados obtidos no primeiro teste mostraram valores significantes ( $p < 0,05$ ) para a sub-bacia do Paraná e para um indivíduo do Uruguai em relação a todos os outros indivíduos amostrados. A análise do Codon-Z também revelou valores significantes para a bacia do Paraná; incluindo mais seis indivíduos da sub-bacia do Pantanal. Ambos os testes indicaram rejeição da hipótese nula de neutralidade para esse grupo amostral.

Nas curvas da análise de distribuição das diferenças, as sub-bacias não apresentaram padrões similares. Ao se analisar juntamente Pantanal, Paraná e Uruguai o padrão de curva encontrado foi do tipo multimodal, presente em populações que estão em certo equilíbrio (Figura 9a). No entanto, na análise individual de cada sub-bacia verificamos um padrão multimodal apenas na população do Uruguai (Figura 9b) enquanto que nas populações do Pantanal e do Paraná o constatado foi um padrão de curva unimodal, coincidente com o esperado para um modelo de expansão populacional (Figura 9d e 9c). Estes resultados são apoiados com os valores encontrados no teste da soma dos desvios dos quadrados SSD calculado no programa Arlequin.

Para compreensão da relação filogenética intra-específica desse grupo de peixe nas sub-bacias estudadas, foi realizada uma análise de agrupamento com a construção da árvore filogenética de *neighbor joining*. A topologia da árvore mostra agrupamentos com valores fortemente suportados por bootstrap ( $\geq 75\%$ ) separando a sub-bacia do Pantanal e a sub-bacia do Paraná (Figura 10). Para a significância dos valores de bootstrap levou-se em consideração que os valores: bootstrap  $\geq 75\%$  são fortemente suportados; bootstrap 50 -74% são fracamente suportados e bootstrap  $< 50\%$  não são suportados (Lowe *et al.*, 2006).



**Figura 9.** Gráficos da distribuição das diferenças (“mismatch distribution”) obtidos para as seqüências do fragmento do Cit b de *S.brasiliensis*. Em: **A** Padrão de curva apresentado na análise conjunta das sub-bacias (Pantanal, Paraná e Uruguai); **B** Sub-bacia do Uruguai; **C** Sub-bacia do Pantanal e **D** Sub-bacia do Paraná. A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas pelo modelo de expansão populacional foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).



**Figura 10** - Árvore gênica utilizando *neighbor joining* para as seqüências do fragmento do Cit b de *S. brasiliensis* das diferentes localidades estudadas. Indivíduos da sub-bacia do Pantanal, da sub-bacia do Paraná e da sub-bacia do Uruguai. Como grupo externo foi utilizado seqüência do Cit b de *Salminus hilarii* do rio Piuí-SP.

Um grupo monofilético reúne todos os indivíduos amostrados da sub-bacia do Pantanal e dois dos indivíduos da sub-bacia do Uruguai. Enquanto o segundo grupo, mais abaixo na árvore separa todos os indivíduos da sub-bacia do Paraná e um indivíduo do Uruguai. Esses dois “clados” apresentam um alto valor de suporte. O indivíduo de *S. hilarii* utilizado como grupo externo se separa dos dois grupos, entretanto ficando mais próximo do grupo do Paraná.

Nota-se que dentro do grupo da sub-bacia do Paraná ocorre outra divisão (intra-populacional), destacando um grupo com indivíduos só do rio Mogi Guaçu e outro grupo com membros do rio Mogi Guaçu mais um indivíduo do rio Uruguai.

## **V.2.2- Região Controle (D-loop)**

### **V.2.2.a – Estimativas de variabilidade genética**

Foram seqüenciados 93 indivíduos os quais geraram fragmentos de 633pb com 92 sítios polimórficos e quatro *gaps*. Essas variantes polimórficas originaram os 47 haplótipos distribuídos entre as sub-bacias do Pantanal, Paraná e Uruguai (Tabela18). Nenhum haplótipo esteve presente em todas as localidades, no entanto, haplótipos comuns foram compartilhados entre: Uruguai e Pantanal (Paraguai), Uruguai e Paraná (Tabela18).

A relação transição/ transversão total (R) estimada a partir do conjunto de dados foi 10,111 sendo a média das frequências de nucleotídeos: A(31,1%),T(34,2%), G(17,4%) e C(17,3%). Conferindo um conteúdo A-T maior que G-C, como já esperado para o marcador em questão. Muitas das alterações foram compartilhadas entre as distintas localidades (Tabela 18 e Anexo 4). Pantanal e Uruguai apresentaram o maior número de mutações comuns (22), diferentemente de Pantanal e Paraná que possuem apenas quatro mutações comuns; em contrapartida foram registradas 40 diferenças fixadas no grupo Paraná em comparação ao Pantanal. O Paraná e Uruguai partilharam seis mutações.

O haplótipo mais freqüente foi D4, que por essa razão também ocupou a posição ancestral na rede haplotípica, dele derivaram todos os demais haplótipos (Figura 11).

**Tabela 18** - Variações encontradas no fragmento seqüenciado da região controle. para *S. brasiliensis*, número e frequência de haplótipos em cada sub-bacia. Em negrito as bases nucleotídicas mutadas. Os números correspondem à posição da base na seqüência gênica. Pan (bacia Pantanal), Uru (bacia Uruguai), Par (bacia Paraná).

Haplótipo	Seqüências de bases mutadas	Pan	Uru	Par
	13 14 34 40 56 59 61 81 83 84 102 123 125 127 129 135 144 145 151 153 154 172 174 176 179 190 200 206 246 250 261 262 265 268 284 286 289 293 295 300 303 306 309 311 317 320 322 330 336 337 341 348 350 351 352 353 355 360 366 372 373 387 394 395 398 399 406 412 413 415 416 420 446 455 462 464 497 498 501 506 510 519 524 525			
D1	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTATTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	5	-	-
D2	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATTTCTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	3	-	-
D3	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D4	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	10	-	-
D5	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATTTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	7		
D6	TAAAACCTTCGTATATCAACTGATTGGCATTACGAAATTCTCACAGTCTTGTA <sup>T</sup> CTCGCTACAATCTTTTTCTAGCTCACATTAAGCTACCATTA	2	-	-
D7	TAAAACCTTCGTATATCAACTGATTGGCATTACGAAATTCTCACAGTCTTGTA <sup>T</sup> CTCGCTACAATCTTTTTCTAGCTGACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D8	TAAAACCTTCGTATATCAACTGATTGGCATTACGAAATTCTCACAGTCTTGTA <sup>T</sup> CTCGCTACAATCTTTTTCTAGCTGACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D9	TAAAACCTCTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTACAATTTTTTTCTCAGTTAACATTAGGCTACCATTA	3	-	-
D10	TAAAACCTCTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTACAATCTTTTTCTTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	1	-
D11	TAAAACCTCTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTACAATCTTTTTCTCAGTTAACATTAGGCTACCATTA	2	-	-
D12	TAAAACCTCTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTCAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D13	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTATAATCTTTTCCCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	2	1	-
D14	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTAGTTGACATTAAGCTACCATTA	2	1	-
D15	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	2	-	-
D16	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D17	TAAAATCTTTACATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D18	TAAAATCTTTACATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	3	-	-
D19	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D20	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D21	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTTTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	4	-	-
D22	TAAAATCCTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTTTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D23	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTGCAATCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D24	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	2	-	-
D25	TAAAACCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	2	-	-
D26	TAAAATCCTTGCATATCGGCTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTTTTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D27	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACAGTCTTGTA <sup>T</sup> TGCTACAACCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D28	TAAAATCTTTGCATATCGACTGGTTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTATTCGCTACAATCTTTTTCTTAGTTGATATTAAGCTACCATTA	-	1	-
D29	TAAAACCTTTGTATATCGACTGATTGACACTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTACAATCTTTTTCTAGTTAACATTAAGCTACCATTA	2	-	-
D30	TAAAACCTTCGTATATCAACTGATTGGCATTACGAAATTCTCACAGTCTTGTA <sup>T</sup> CTCGCTACAATCTTTTTCTAGCTGACATTAAGCTACCATTA	3	-	-
D31	TAAAACCTTCGTATATCAACTGATTAGCATTACGAAATTCTCACAGTCTTGTA <sup>T</sup> CTACTACAATCTTTTTCTAGCTGACATTAAGCTACCATTA	1	-	-
D32	TAAAACCTTTGTATGTCAACTGACTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTCTCCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-



D33	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTATTCGCTATAATCTTTCTCCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D34	TAAAACCTTTGTACATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCGTTA	2	-	-
D35	TAAAACCTTTGTATATCAACTAATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D36	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATTTTTTTCTAGTCAACATTAGGCTACCATTA	-	1	-
D37	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACCCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D38	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTCTTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D39	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTTACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D40	TAAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTACAATTTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D41	TAAAACCTCTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTTGCTACAATCTTTTTCTCAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D42	AGAAACCTCTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAGATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTCAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D43	AGAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCGCGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCATTA	1	-	-
D44	AGAAACCTTTGTATATCAACTGATTGACATTTACGAAATTCTCACGGTCTCGTACTCGCTATAATCTTTTTCTAGTTAACATTAGGCTACCGTTA	1	-	-
D45	TAGAACTTTTCGCGCTGTAATCAACAGATGTCTGTAAGGCCTCCATAACTCTACAGTTGTAATGTTT-CTCCTTTTATCAGCG-CGA-TCCGTTACC-	-	-	1
D46	TAGAACTTTTCGCGCTGTAATCAACAGATGTCTGTAAGGCCTCCATAACCCTATAGTTGTAATGTTT-CTCCTTTTATCAGCG-CGA-TCCGTTACC-	-	-	2
D47	TAAGGCTTTTCGCGCTGTAGTCAACAGATGTCTGTAAGGCCTCCATAGTCCTACAGTTGTAATGTTT-CTTTTTTATCAGCG-CGA-TCCGTTACC-	-	1	3

Levando em consideração todas as populações estudadas, o número médio de diferenças nucleotídicas (k) para o fragmento seqüenciado da região controle foi de 14,74427 que resultou em uma diversidade haplótipos média (Hd) de 0,976 e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) de 0,02344. Os níveis de variabilidade genética para cada uma das sub-bacias pode ser verificado na Tabela 19. A população do Uruguai apontou maior índice de diferença nucleotídica entre seus haplótipos e conseqüentemente uma maior diversidade nucleotídica comparada às populações do Pantanal e Paraná.

**Tabela19** – Diversidade genética observada nas populações de *S.brasiliensis* de cada sub-bacia. N= tamanho da amostra; h= número de haplótipos; k=média do número de diferenças; Hd= diversidade haplotípica; Pi( $\pi$ ) = diversidade nucleotídica.

	N	H	Hd	Pi ( $\pi$ )	K	S
<b>Pantanal</b>	81	42	0,968	0,01200	7,5463	44
<b>Paraná</b>	6	3	0,733	0,01134	7,133	13
<b>Uruguai</b>	6	6	1,000	0,03943	24,800	65

As diferenças evolutivas entre as populações de *S.brasiliensis* foram inferidas pela distância genética (p distance) que apontou uma média geral de 2,3%. As distâncias calculadas entre as sub-bacias, bem como, a média dentro de cada população está relatada na Tabela 20.

**Tabela 20-** Estimativa da distância genética pareadas dentro e entre os grupos populacionais de *S. brasiliensis* de cada sub-bacia. d (média): distância genética intra populacional. Os valores das distâncias estão em porcentagem (%).

	Pantanal	Paraná	Uruguai	d (media)
Pantanal				1,2
Paraná	9,3			1,1
Uruguai	2,6	8,0		3,9

A sub-bacia do Paraná apresentou valores altos de distância genética em relação ao Pantanal e Uruguai, enquanto para as duas últimas a distância foi bem menor. Outro parâmetro analisado foi o Índice de disparidade por pares de base (ID) que não obstante atribuiu valores maiores entre Paraná e Pantanal (1,4%). Os demais foram Paraná X Uruguai (0,7%) e Pantanal X Uruguai (0,5%).

### V.2.2.b – Estimativas de estruturação populacional e inferência filogeográfica

A Análise da Variância Molecular (AMOVA) estimada para o fragmento da região controle indicou que as maiores variações ocorreram dentro das populações do que entre as populações (Tabela 21). O valor estimado do  $F_{ST}$  na amova é de 0,06657 ( $p=0,05279\pm 0,00730$ ) foi significativo, demonstrando certa diferença entre as amostras.

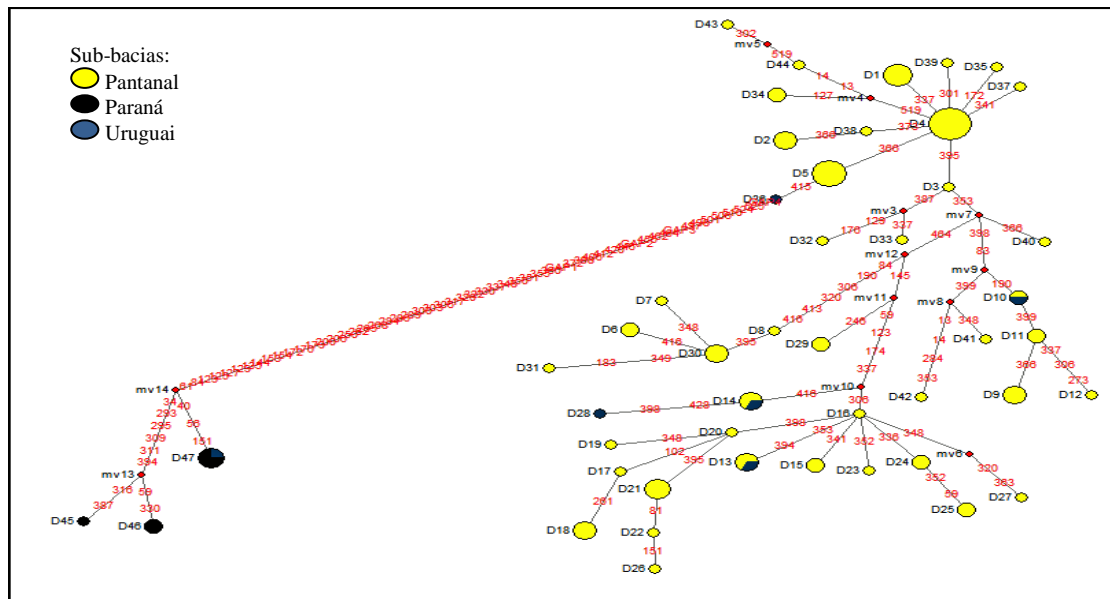
**Tabela 21-** Análise da variância molecular (AMOVA),  $F_{ST}$ , entre as populações de *S.brasiliensis* no Pantanal, Paraná e Uruguai. Significância do teste (1023 permutações).

Fonte da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Componentes de variância	Porcentagem de variação
Entre os grupos	2	1,715	0,03569Va	<b>6,96</b>
Entre as populações dentro dos grupos	9	4,197	-0,00154 Vb	<b>-0,30</b>
Dentro das populaces	82	39,259	0,47876Vc	<b>93,34</b>
<b>Total</b>	93	45,170	0,51291	-
Índices de Fixação	FSC: -0,00323	<b>FST:</b> 0,06657	FCT: 0,06958	-
Valores de p	0,67449 $\pm$ 0,01805	0,05279 $\pm$ 0,00730	0,00391 $\pm$ 0,00233	-

Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par igualmente demonstraram a ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as populações do dourado da sub-bacia do Pantanal e Paraná (0,12061\*). Pantanal e Uruguai não tiveram valores significantes (0,00827), assim como Paraná e Uruguai (0,05455). Considerando-se o valor de significância \* $P= 0,05$  (1023 permutações).

A rede de relações entre os haplótipos das sub-bacias estudadas é apresentada na Figura 11. Pode-se verificar a separação entre dois conjuntos de haplótipos, bem definidos por 55 passos mutacionais. Tais conjuntos correspondem as sub-bacias do Pantanal (na parte superior da rede) e Paraná (na parte inferior da rede), sendo que a sub-bacia do Uruguai compartilha haplótipos nos dois conjuntos ilustrados (Figura 11).

O haplótipo mais freqüente foi o D4 representando na rede o parental de qual partem todos os demais ramos e suas derivações. De forma abrangente a rede apresenta uma configuração estrelada com ramificações partindo dos haplótipos mais freqüentes e direcionando-se a haplótipos únicos (exclusivos). Este formato de rede é típico de populações em expansão.



**Figura 11-** Rede de haplótipos de *S. brasiliensis* referente à região controle (D-loop), evidenciando o relacionamento entre três sub-bacias. Os círculos representam os haplótipos identificados por letras e números (D1, D2...). O tamanho do círculo indica a frequência do haplótipo na amostra e os losangos vermelhos indicam os haplótipos intermediários inferidos que não foram encontrados nas amostras. Cada linha representa a distância por passos mutacionais (números em vermelho). A rede foi desenhada pelo programa Network.

Os testes de neutralidade realizados (Tajima's D, Fu and Li's D\*, Fu and Li's F\* e Fu's de F) ajudaram a compreender a relação evolutiva apontada na rede haplotípica. Na análise da população em geral os resultados dos testes (D= -0,71517; D\*= 1,12462 e F\*= 0,42793) não foram significantes ( $p > 0.10$ ) e FuFs (FS= - 5,48604,  $p = 0,4350$ ), de forma que todos eles não rejeitaram a hipótese nula de neutralidade. O teste D de Tajima apresentou valor negativo, indicativo de população em expansão.

Analisando separadamente cada sub-bacia foram observados valores negativos para todos os testes em Pantanal e Uruguai; já Paraná revelou valores positivos (Tabela 22). Contudo, os valores encontrados não foram significativos para nenhum dos testes ( $p > 0.10$ ), exceto para o teste de FuFs do Paraná que apontou significância.

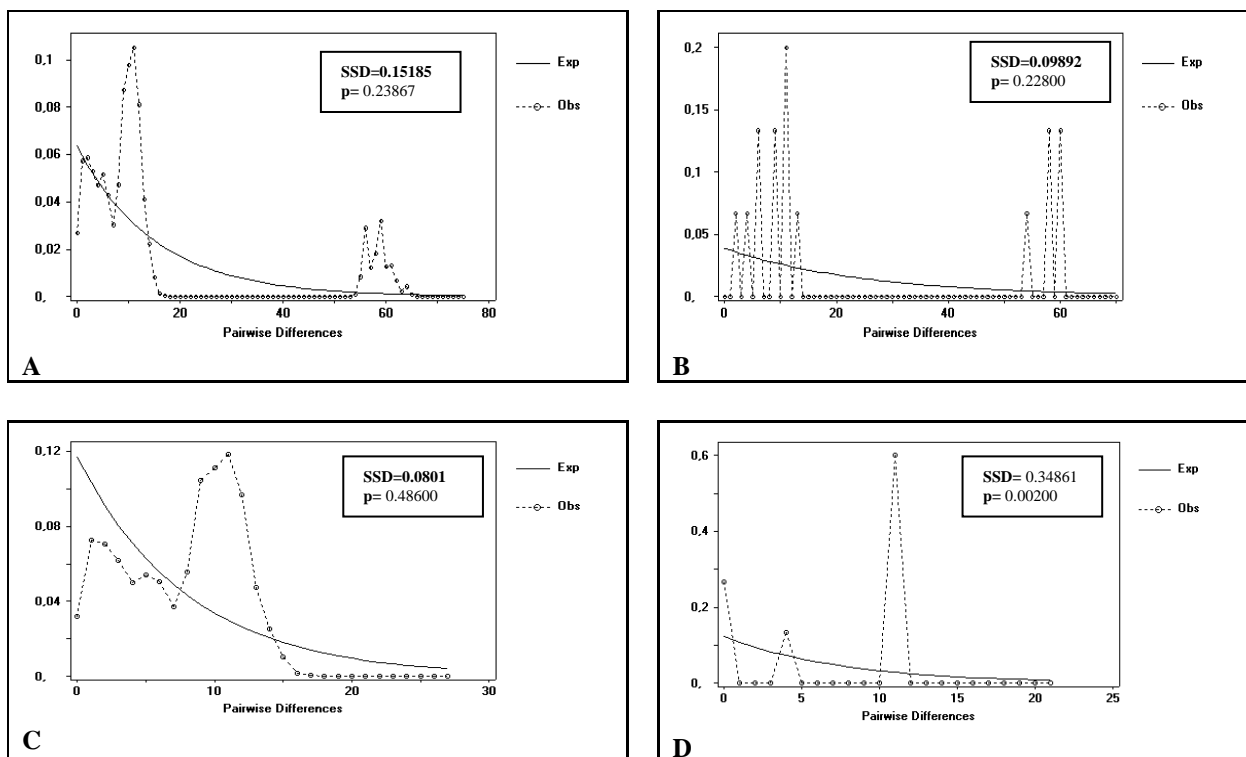
**Tabela 22** - Testes de neutralidade aplicados a cada uma das populações de *S. brasiliensis* amostradas em cada sub-bacia, referentes à região controle (D-loop).

	Pantanal	Paraná	Uruguai
Tajima's D	-0,59956	1,54626	-0,91379
Fu and Li's D*	-0,58329	1,17320	-0,92284
Fu and Li's F*	-0,70634	1,35825	-1,01070
Fu's de F	-20,6698	3,87153*	0,34018

(\*significante,  $p = 0,9630$ )

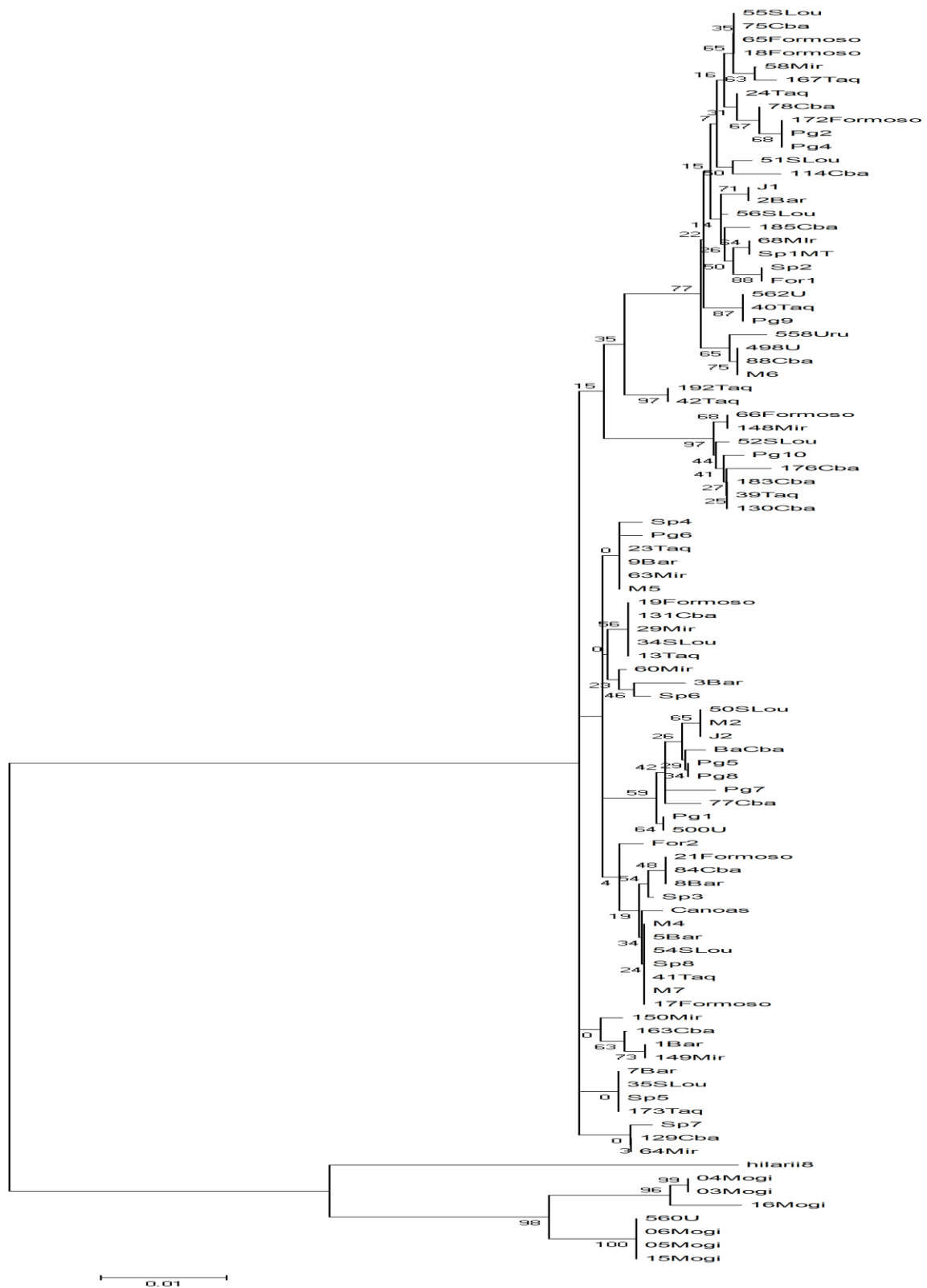
Foi realizada uma análise conjunta das sub-bacias (Pantanal, Paraná e Uruguai) para avaliar as curvas de distribuição das diferenças (“*mismatch distribution*”). O resultado encontrado foi um padrão de curva do tipo multimodal, habitualmente presente em populações que estão em equilíbrio (Figura 12a).

Esse padrão de curva multimodal manteve-se presente nas análises individuais de cada sub-bacia. Na população do Pantanal as curvas foram mais suaves (Figura 12b) enquanto que nas populações do Uruguai e do Paraná foram constatados picos mais evidentes e distantes (Figura 12d e 12c). Estes resultados são apoiados com os valores encontrados no teste da soma dos desvios dos quadrados SSD calculados no programa Arlequim.



**Figura 12.** Gráficos das curvas de distribuição das diferenças “*mismatch distribution*” obtidos para as seqüências do fragmento da região controle de *S.brasiliensis*. Em: **A-** Padrão de curva apresentado na análise conjunta das sub-bacias (Pantanal, Paraná e Uruguai); **B-** Sub-bacia do Uruguai; **C-** Sub-bacia do Pantanal e **D-** Sub-bacia do Paraná. A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas pelo modelo de expansão populacional foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

Por fim, foi realizada uma análise de agrupamento com a construção da árvore de *neighbor-joining* para compreensão da relação filogenética intra específica desse grupo de peixe nas sub-bacias estudadas. A topologia da árvore revelou agrupamentos com valores fortemente suportados de bootstrap ( $\geq 75\%$ ) separando a sub-bacia do Pantanal e a sub-bacia do Paraná (Figura 13) da mesma forma como foi visualizado com o marcador Cit b.



**Figura13** - Árvore gênica utilizando *neighbor-joining* para o fragmento da região controle de *S.brasiliensis* das diferentes localidades estudadas. Indivíduos da sub-bacia do Pantanal, da sub-bacia do Paraná e da sub-bacia do Uruguai. Como grupo externo foi usado o mesmo fragmento da região controle de *S.hilarii* do rio Piuí-SP.

Esta árvore ilustra dois cladogramas. Um grupo monofilético que reúne os indivíduos da sub-bacia do Pantanal e dois indivíduos da sub-bacia do Uruguai, e outro grupo, incluindo os indivíduos da sub-bacia do Paraná e um indivíduo do Uruguai, sustentado com alto valor de bootstrap. Novamente o indivíduo de *S.hilarii* utilizado como grupo externo se separa dos dois grupos, ficando mais próximo do grupo do Paraná.

Note-se que, novamente, dentro do grupo da sub-bacia do Paraná ocorre outra divisão intra-populacional, destacando um grupo com indivíduos só do rio Mogi Guaçu e outro grupo com membros do rio Mogi Guaçu mais um indivíduo do Uruguai. Idêntico ao encontrado com o marcador Cit b.

### V-2.3 - Discussão

Estimativas do grau da variabilidade e diferenciação genética de populações naturais têm tido grande apelo no contexto atual sobre conservação da biodiversidade. No sentido de que por meio dela podemos compreender o comportamento genético entre populações, suas ligações históricas e contemporâneas entre regiões geográficas e fazer inferências mais precisas sobre as condições genéticas efetivas as populações nativas se encontram nos ambientes.

A esse respeito, verificamos nas populações estudadas uma diversidade genética de moderada à relativamente alta, refletida conforme o marcador molecular utilizado. O Citocromo b apresentou valores menores que os encontrados para região controle, provavelmente, devido às diferenças peculiares na sensibilidade de detecção do polimorfismo.

No âmbito geral, ambos foram coincidentes com os dados de polimorfismo encontrados, nos quais as estimativas de diversidade haplotípica foram maiores que as estimativas de diversidade nucleotídica. Considerando, como baixo os índices de diversidade  $<0.5$  e como alto os índices  $\geq 0.5$  (Lowe *et. al.*, 2006), verificou-se um padrão característico de populações que tiveram rápido crescimento oriundo de uma população ancestral pequena. Supondo ainda, que tenha tido tempo suficiente para recuperar a diversidade haplotípica por mutação e migração, embora o tempo tenha sido demasiadamente curto para acumular grandes diferenças nas seqüências (Avise, 2000; Lowe *et. al.*, 2006; Gaffney *et. al.*, 2007).

Das três sub-bacias estudadas, a do rio Uruguai é a que revelou maiores índices de polimorfismo, por ter apresentado indivíduos com haplótipos tão diferenciados. Entretanto,

esse pode ser um efeito do tamanho amostral reduzido do rio Uruguai e precisa ser observado com limitação. Por outro lado, ele pode ter algum significado biológico considerando que, em trabalho similar, Machado *et.al.* (2005) também verificaram maior variabilidade genética em populações de dourado no rio Uruguai, em relação a outras localidades como os rios Jacuí, Sinos, Corrientes e Paraná.

O número de diferenças nucleotídicas foi extremamente grande levando a um amplo conjunto de haplótipos distribuídos entre as sub-bacias. Apesar da quantidade elevada nenhum haplótipo esteve presente nos três grupos (Pantanal, Paraná e Uruguai), além de serem observados haplótipos únicos em cada uma das sub-bacias. O partilhamento de haplótipos entre as sub-bacias foi detectado unicamente pelo Uruguai que esteve presente entre os haplótipos encontrados no grupo Pantanal e no grupo do Paraná.

O número de haplótipos encontrados em uma espécie e seu compartilhamento inter e intra-populacional revelam aspectos do comportamento e coesão genética entre as populações naturais, que são adquiridos através das relações entre as forças evolutivas e biológicas do grupo ao longo do tempo e espaço, e que determinam a variação genética. Esta variação é o componente sob o qual atua a seleção natural, continuamente criado pela mutação e ao mesmo tempo destruído pela seleção e deriva (Lowe *et. al.*, 2006).

Lembrando-se de que a mutação é um dos fatores responsáveis pela diversidade genética (Nei e Kumar, 2000; Frankhan *et. al.*, 2008), observamos as alterações evidenciadas nas seqüências nucleotídicas das sub-bacias e constatamos que o maior número de mutações compartilhadas foi entre os indivíduos do Uruguai com os do Pantanal (30), seguidos do Paraná (8), para os dois marcadores. Já as mutações compartilhadas entre Pantanal e Paraná só foram detectadas para a região controle (4). Em contrapartida, mais de 40 diferenças fixadas entre o Paraná e o Pantanal foi notada nos dois marcadores. Conforme Nei e Kumar (2000), quando a mutação se espalha inteiramente na população e é incorporada dentro do genoma da espécie, chamam-se esse evento de fixação de uma mutação na população. Em razão disto, a população do Pantanal se mostrou geneticamente diferente da população do Paraná para esses dois marcadores mitocondriais.

Assim, uma das explicações possíveis para a coesão haplotípica do Uruguai com o Pantanal e com o Paraná é o compartilhamento das mutações entre essas sub-bacias por possível fluxo gênico. Além disso, essa relação pode revelar aspectos da ancestralidade entre as sub-bacias e sua formação, que serão discutidos mais tarde. De acordo com Castelleo e Templeton (1994), numa rede haplotípica é esperado que o haplótipo ancestral mais antigo



seja também o mais freqüente baseado na coalescência. Além disso, os mais antigos têm múltiplas conexões na rede e distribuição mais ampla, pois os indivíduos tiveram mais tempo para dispersar.

A estimativa obtida da distância genética pareada considerando-se todas as bacias juntas apresentou uma média geral baixa de 1,5% (Cit b) e 2,3% (D-loop). No entanto, os valores estimados entre as sub-bacias foram relativamente altos para Paraná em relação ao Pantanal e Uruguai (7,7%, 5,1% respectivamente), revelando certo grau de divergência evolutiva entre as seqüências de cada população. Conforme descrito por Lowe *et.al.* (2006), a distância genética quantifica o grau de similaridade entre os indivíduos/grupos, de forma que, quanto mais divergentes evolutivamente forem dois grupos, altos serão os valores de distância genética, numa escala de 0 a 1. Os dados então, nos indicariam que essas populações podem estar caminhando rumo a uma divergência evolutiva.

Esses dados associados à relação haplotípica ilustrada na rede demonstram uma separação entre as populações do Paraná e Pantanal e sugerem que algum tipo de isolamento reprodutivo deva estar ocorrendo entre essas sub-bacias. Entretanto o formato estrelado da rede seria um indicativo de expansão populacional, mais bem evidenciado pelo grupo Pantanal. O haplótipo mais freqüente está na população do Pantanal e foi considerado ancestral. Em redes haplotípicas, o ancestral mais antigo é também esperado ser o haplótipo mais freqüente baseado na coalescência (Castelloe e Templeton, 1994).

Os valores das distâncias genéticas também podem sugerir um baixo fluxo gênico entre os grupos, considerando que fluxo gênico é uma força evolutiva de coesão, que une as populações geograficamente separadas em uma única unidade evolutiva da espécie (Allendorf e Luikart, 2007), promovendo uma associação entre distância genética e geográfica. Influência direta da distância geográfica na estimativa de diferenças genéticas foi relatada em populações de dourado no Uruguai, sendo que o grau de isolamento das populações nos grandes rios mostrou-se menos pronunciado que em pequenos rios (Machado *et. al.*, 2005).

Os valores da AMOVA com relação ao índice de fixação ( $F_{ST}$ ), assim como, os valores par-a-par de  $F_{ST}$  indicaram uma diferenciação significativa entre Paraná e Pantanal. Embora a porcentagem de variação tenha demonstrado que as diferenças maiores se encontram mais dentro dos grupos do que entre os grupos, a ocorrência de subdivisão entre as populações do dourado da sub-bacia do Pantanal e Paraná parece ser real.

Os testes de neutralidade seletiva (Tajima's  $D$ , Fu and Li's  $D^*$ , Fu and Li's  $F^*$  e Fu's de  $F$ ) não foram significantes e por tanto não rejeitaram a hipótese nula de neutralidade. Exceto o teste FuFs do fragmento de D-loop, que apresentou valor significativo para sub-bacia do Paraná rejeitando a hipótese de neutralidade seletiva.

Quando a hipótese nula de neutralidade é rejeitada em favor de um  $F_s$  significativo, os resultados podem estar indicando ocorrência de expansão populacional recente (Fu, 1997; Schneider e Excoffier, 1999). Os testes de neutralidade de  $D^*$  e  $F^*$  são mais sensíveis à seleção e, ao serem comparados com os valores de  $F_s$ , podem auxiliar na distinção entre expansão populacional e seleção purificadora (negativa). Valores de  $F_s$  significativos e  $D^*$  e  $F^*$  não significativos indicam expansão demográfica, enquanto o caso contrário sugere que os efeitos da seleção são mais pronunciados.

Valores negativos que também corroboram o indicativo de expansão populacional, sugerido na rede haplotípica, foram apresentados pelos testes  $D$  de Tajima's. Valores abaixo de zero (negativos) para  $D$  sugerem expansão populacional e/ou seleção purificadora (Holsinger, 2008), mas também podem estar relacionados a crescimento populacional, bem como a um bottleneck menos recente ou migração (Schmidt e Pool, 2002). Segundo esses autores, esta estatística pode ser influenciada tanto pela história populacional como pela seleção natural.

Devido o teste FuFs da região controle ter apresentado contraditoriamente, resultado significativo à rejeição da hipótese nula, outros dois testes foram realizados com o Cit b. Pôde-se confirmar assim, a rejeição da hipótese nula de neutralidade estrita em favor da hipótese alternativa de seleção positiva para o grupo representativo do rio Paraná (que inclui um indivíduo do Uruguai). Todavia, devemos lembrar que existem variações no padrão evolutivo entre diferentes regiões do DNA, algumas regiões são menos sujeitas a seleção natural que outras (Nei e Kumar, 2000), sendo normal não encontrar sempre os mesmos padrões em diferentes marcadores. A que se considerar, entretanto, que um número variado de marcadores aumenta o espectro de detecção da variabilidade genética e a capacidade de compreensão do comportamento genético real da espécie.

A idéia de expansão populacional não pôde ser bem sustentada pelas análises da distribuição das diferenças ("*mismatch distribution*"). Na análise conjunta das três sub-bacias o padrão de curva evidenciado foi do tipo multimodal, sugestivo de populações estáveis. Contudo, diferenças foram detectadas nas análises restritas de cada sub-bacia entre os dois marcadores genéticos utilizados.

O gene *Cit b*, encontrou um padrão unimodal da curva apenas para as sub-bacias do Pantanal e do Paraná (analisadas separadamente) que seria indicativo de uma expansão populacional (Slatkin e Hudson, 1991; Rogers e Harpending, 1992; Harpending *et.al.*, 1998). Além disso, as ondas foram bem acentuadas com picos de crista altos, característico de uma explosão populacional antiga (Rogers e Harpending, 1992). Já a sub-bacia do Uruguai apresentou um padrão bimodal, caracterizando uma população estável.

Entretanto, o observado para a região controle foi contraditório aos dados de expansão, para todas as análises, conjuntas e/ou individuais das sub-bacias, pois todas as curvas amostradas revelaram um padrão multimodal, que sugere a ocorrência de populações estáveis (Rogers e Harpending, 1992; Harpending, 1994).

Diante dos dados opostos apresentados para as sub-bacias do Pantanal e Paraná, podemos refletir sobre alguns aspectos: primeiro, o *Cit b* é um gene codificador de proteínas, mais estável e conservado que a região controle, assim as mutações se acumulam mais lentamente no *Cit b* e mais rapidamente no D-loop (Esposti *et.al.*, 1993; Nei e Kumar, 2000; Farias *et.al.*, 2001). Logo, o *Cit b* poderia ter registrado um momento histórico de expansão desse grupo de peixes, anterior ao momento de estabilidade registrado pela curva do D-loop, já que, este último consegue detectar eventos mais recentes.

Além disso, as curvas unimodais que sugerem expansão são mais próximas do modelo teórico da curva do que são as curvas multimodais que sugerem equilíbrio, pois esta última se distancia da curva teórica devido às simulações computacionais que promovem distribuições empíricas (Rogers e Harpending, 1992). Assim é necessário cautela na interpretação das curvas obtidas na análise de distribuição, devendo-se associar sua interpretação aos valores estatísticos obtidos e aos demais testes referentes às inferências demográficas.

Por outro lado, autores revelam que alguns genes mitocondriais podem ser mais conservados que outros conferindo ao marcador uma plasticidade em inferências filogenéticas, permitindo resolver divergências ocorridas a cerca de 100 anos até variações inter populacionais (Irwin *et. al.*, 1991; Cantatore *et. al.*, 1994; Farias *et. al.*, 2001). Outros revelam que o *Cit b* é um marcador efetivo em escalas de tempo entre 10-15 Ma (Brown *et. al.*, 1982; Irwin *et. al.*, 1991). Desta forma, teríamos então, conseguido apontar com esses dois marcadores momentos históricos distintos na ocupação da sub-bacia do Paraná e na sub-bacia do Pantanal.

Os valores até agora mencionados que indicaram uma diferenciação significativa entre a sub-bacia do Pantanal e a sub-bacia do Paraná parecem ser apoiados pelas análises das árvores gênicas intra-específica. O gene *Cit b* e a região controle conseguiram mostrar dois clados, com bootstrap fortemente suportado, um deles agrupando os indivíduos do Pantanal e Uruguai e outro agrupando os indivíduos da sub-bacia do Paraná e um indivíduo do Uruguai.

O agrupamento representado pelo Pantanal não apresentou subdivisões internas enquanto no clado do Paraná é possível verificar uma segunda separação entre os indivíduos do grupo, fortemente suportada pelo bootstrap, o que poderia indicar uma possível estruturação dentro da própria sub-bacia. Segundo Lowe *et. al.*, (2006) o arranjo terminal em filogenias intra específicas são reconhecidos como : monofilético, parafilético e polifilético.

O grupo selecionado no clado maior (Pantanal) aponta para o tipo monofilético, em que as linhagens dentro de uma população são geneticamente mais próximas umas das outras do que são para com as linhagens de uma segunda população (Avise, 2000). Já o clado correspondente a população do Paraná, parece apontar para o tipo parafilético, quando todas as linhagens de uma população formam um grupo monofilético que está aninhado dentro de uma segunda população (Lowe *et. al.*, 2006). No entanto, conforme o mesmo autor, em comparações intra-específicas, populações podem progredir da polifilia/parafilia para a monofilia como efeito da triagem incompleta da linhagem e/ou fluxo gênico secundário (após separação da população), embora a distinção entre as hipóteses dependa se a separação é histórica ou contemporânea.

A questão da estruturação em populações de *Salminus* tem sido levantada por outros autores tanto na bacia do Uruguai quanto na bacia do Paraná (Machado *et. al.* 2005; Ramella *et. al.* 2006; Lopes *et. al.* 2007; Shibatta *et. al.*, 2007; Esguícero e Arcifa, 2009). Além do dourado, outros peixes migradores também têm apresentado estruturação genética intra e/ou inter populacional em diferentes sistemas hidrográficos (Sivasundar *et.al.* 2001; Wasco e Galetti, 2002; Moysés e Almeida-Toledo, 2002; Prioli *et. al.*, 2002; Hatanaka e Galetti, 2003; Sanches e Galetti, 2007; Pereira, 2007; Sukanuma, 2008; Calcagnotto e DeSalle, 2009).

A análise filogeográfica molecular nos auxilia a compreender os padrões históricos de dispersão das espécies, interpretando processos que ficaram evolutivamente marcados, na atual distribuição geográfica das características genéticas (Avise, 2000; Lowe *et. al.*, 2006). Sobre essa premissa, discutiremos o cenário apresentado até agora associado à

formação das bacias hidrográficas sul americanas e sua ictiofauna, para a compreensão do comportamento genético dessa espécie no tempo e no espaço.

Ou seja, dentro de uma abordagem biogeográfica denominada “história do táxon” : que busca correlacionar a diversidade biótica no contexto do conhecimento acerca da “ história da Terra” já estabelecida (Hovenkamp, 1997 apud Ribeiro, 2007).

A diversidade de peixes neotropical tem uma longa e complexa história temporal e está intimamente ligada à gênese dos sistemas fluviais, começando antes da separação completa da América do Sul com a África (a mais de 90Ma), e tornando-se essencialmente moderna no fim do Mioceno médio (10Ma) (Lundberg *et. al.*,1998). Durante todo esse período de formação, o padrão de drenagem sul-americano foi sendo moldado por eventos tectônicos globais e orogênicos os quais ocasionaram várias mudanças nos rios e bacias hidrográficas levando a diversificação da fauna de peixes através do rompimento de divisas entre bacias e a coalescência dos sistemas de drenagem (Lundberg *et.al.*, 1998; Ribeiro, 2007).

Dentro deste contexto, das bacias analisadas neste trabalho, a bacia do Paraná é o sistema mais antigo, que surgiu por eventos tectônicos conseqüentes à separação dos continentes (ruptura Gondwana) (Lundberg *et.al.*, 1998; Ribeiro, 2007), e apresentou uma história inicial de crescimento para o norte, através da captação de águas da parte sudoeste da bacia do Paleo-Amazona-Orinoco, separando-se da mesma à aproximadamente 30 Ma (Lundberg *et. al.*, 1998).

No início de desenvolvimento da bacia do Paraná, o Pantanal (juntamente com o Chaco Paraguai) consistia em terrenos elevados, dômicos, que serviam como divisor de água entre a “Zona Sub Andina” e a bacia do Paraná (Almeida, 1949; Ab’ Saber, 2007; Ribeiro, 2007). O Pantanal, começou a se desenvolver na depressão escavada e na planície de sedimentação atual, subseqüente à Bacia Sedimentar do Paraná, a aproximadamente 23-13Ma. (Assine,2003; Ab’Saber, 2007), atraindo toda drenagem da sua orla ocidental (Almeida, 1949).

Embora o sistema Paraná-Paraguai apresente grandes diferenças na composição da ictiofauna, distribuições geográficas indicam a existência de compartilhamento de espécies entre essas áreas, provavelmente por captura de cabeceiras (Hubert e Renno, 2006), o mecanismo primordial que permite a troca de fauna entre diferentes bacias, como o verificado para a espécie de *Oligosarcus pinto* (Ribeiro, 2007).

Tomando-se por base essa informação histórica das bacias hidrográficas, poderíamos inferir que o Paraná por ser um sistema mais antigo possivelmente tenha sido o dispersor de *S. brasiliensis* para o sistema Pantaneiro, por prováveis eventos de cabeceira. No entanto, não foi encontrado aqui, haplótipos comuns entre as duas bacias que evidenciassem esse compartilhamento, pelo contrário, os dados revelam um grau considerável de distanciamento genético entre as populações.

Tendo em vista que o DNAm<sub>t</sub> é capaz de revelar alterações ocorridas a cerca de 100M.a (Irwin *et. al.*, 1991; Farias *et. al.*, 2001 ) e o Cit b entre 10 a 15 M.a (Irwin *et. al.*, 1991), um haplótipo ancestral vindo da bacia do Paraná seria facilmente detectado entre os indivíduos da população do Pantanal. No entanto, não houve compartilhamento de haplótipos entre essas duas regiões.

Assim, se realmente a população de *S. brasiliensis* no Pantanal tiver se originado a partir de um grupo oriundo do Paraná por um evento histórico (entre 23-13 Mil anos), os dados comparativos entre a diversidade haplotípica e nucleotídica nos levam a acreditar que a população do Pantanal tenha passado por um processo rápido de expansão genética a partir de um pequeno grupo ancestral. Que o tempo decorrido até então, foi suficiente para que a diversidade genética fosse reconstituída, por meio de mutações, sem acúmulos de grandes diferenças nas seqüências (Avise, 2000; Lowe *et.al.*, 2006; Gaffney *et.al.*,2007 ), como foi verificado pela curva de distribuição das diferenças do Cit b que apresentou ondas características de explosões antigas (Rogers e Harpending, 1992).

Nesse sentido, as curvas reveladas pelo D-loop (características de populações em equilíbrio) não teriam conseguido expressar a realidade da população, ou, por outro lado, teriam captado uma condição mais recente do grupo na bacia do Pantanal.

As distâncias genéticas relativamente altas, a grande quantidade de haplótipos exclusivos, a formação de dois conjuntos na rede haplotípica por muitos passos mutacionais os valores de  $F_{st}$  significantes e a fixação de cerca de 40 mutações, indicam que as populações do Pantanal e Paraná estão se tornando evolutivamente distantes e que provavelmente não exista conectividade reprodutiva que possa produzir fluxo gênico entre elas. Mesmo essas bacias se conectando mais ao sul, em terras argentinas, os dados deste trabalho apontam para um isolamento reprodutivo entre elas.

Apesar da capacidade migratória a longas distâncias (Sverlij e Espinach Ros, 1986; Bonetto *et.al.*, 1971) ser uma característica positiva da espécie, no sentido de possibilitar a conectividade genética entre distintos grupos populacionais, existe relato, no rio

Sinos, de tendência de homing durante a migração reprodutiva e fidelidade de rios (Schulz *et al.* 2003), conduzindo-nos a ponderar a possibilidade de que o dourado tenha distintas populações em cada vertente.

Embora, morfologicamente, a variação geográfica da espécie seja muito pequena considerando sua ampla distribuição (Lima, 2006), os dados genéticos podem revelar uma realidade que vai além do fenótipo até então observado. Assim, nossos resultados refletem um contato histórico de dispersão entre as bacias, na ocupação de novas áreas, propiciada por eventos de cabeceira e seguida de crescimento populacional. Ao mesmo tempo, revela como uma realidade contemporânea, a separação genética visível entre *S.brasiliensis* da sub-bacia do Paraná e da sub-bacia do Pantanal (Alto Paraguai).

Outro aspecto a se considerar e refletir seria a possibilidade de não serem a mesma espécie, tendo em vista o alto endemismo da região do Alto Paraná (Agostinho e Júlio Jr., 1999; Castro e Vari, 2004) e as diferenças eminentes registradas no DNAmT dos grupos analisados. Ainda que, os resultados obtidos neste trabalho sejam preliminares para sustentar completamente essa hipótese, eles são forte indício de que *Salminus brasiliensis* encontrado na bacia do Alto Paraguai-Pantanal é geneticamente diferente do *Salminus brasiliensis* da bacia do Paraná.

Além do contato com a bacia do Paraná, a bacia do Paraguai também apresentou conexão com a bacia Amazônica através do evento de captura de cabeceira ocorrido no final do Mioceno com o estabelecimento do arco de Michicola, e que parece ter influenciado a distribuição de *S.brasiliensis* no alto rio Madeira, na Bolívia e Perú (Lima, 2006). Essa informação nos leva a ponderar uma situação inversa no processo de dispersão desta espécie, pois, nos revela a possibilidade do Paraguai ter sido o dispersor de *S.brasiliensis* para o Paraná. Uma idéia que se reforça com os dados revelados para a bacia do Uruguai, uma vez que mostrou mais ligações com grupo do Pantanal.

A bacia do Uruguai demonstrou contato histórico entre Pantanal e Paraná por meio dos haplótipos compartilhados entre as duas bacias, tendo uma aproximação genética maior com o grupo do Pantanal revelado pelas estimativas genéticas anteriormente comentadas. Na rede haplotípica e na árvore gênica compartilhou inúmeras mutações com os indivíduos do Paraná, ocupando juntamente com este, uma posição separada do grupo Pantanal. Todos esses dados nos remetem a duas possibilidades.

Primeiro, o número amostral do Uruguai não foi grande o suficiente para revelar o comportamento genético do dourado na sub-bacia, onde a separação dos grupos na

rede, poderia sugerir uma possível estruturação genética da população nessa área, como já documentado em outros trabalhos (Machado *et.al.*, 2005; Ramella *et.al.*, 2006; Lopes *et.al.*, 2007). Segundo, os dados do rio Uruguai podem estar indicando que o possível ancestral tenha se dispersado do sul para o norte na ocupação histórica das bacias, partindo de La Plata para as demais sub-bacias que compõe o sistema do Prata. O fundamento para isso seria o compartilhamento do haplótipo ancestral com o Paraguai e o posicionamento na árvore filogenética intra-específica, enquanto o Paraná esteve sempre separado em outro grupo, podendo indicar uma linhagem derivada do ancestral comum que sofreu processo de expansão e acúmulo de mutações, as quais se espalharam na população fixando-se no genoma da espécie (Nei e Kumar, 2000). Em contrapartida, esse compartilhamento de haplótipos das duas bacias pode também reforçar a idéia de conectividade reprodutiva e trocas gênicas entre as regiões, já que existem relatos revelando que dourados presentes na porção sul do Uruguai se reproduzem mais no médio Paraná do que na própria bacia de origem (Carolsfeld *et.al.*, 2003).

A possibilidade levantada, de dispersão do ancestral no sentido Sul para Norte, é bastante plausível e pode ser também sustentada considerando-se os sistemas de bacias de antepaís ocorridas a cerca de 13Ma, que guiou os maiores rios para norte e sul, além de manter grandes lagos e receber transgressões marinhas de variadas extensões (Lundberg, 1998; Lundberg *et.al.*, 1998), impulsionando o processo de migração e distribuição da espécie na bacia do Prata.

Estudos futuros que acrescentem indivíduos de *S.brasiliensis* coletados mais ao sul nos rios La Plata, Bermejo, Pilcomayo, poderão testar a hipótese de origem ancestral no sul.



## VI- CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que *Salminus brasiliensis* não se encontra geneticamente estruturado no Pantanal Mato-grossense, sugerindo que essas populações mantêm conectividade pela ocorrência de fluxo gênico entre elas. O fluxo gênico que homogeneiza as populações mantém, distâncias genéticas curtas, baixa diferença evolutiva entre sub-regiões norte e sul e facilita a ocorrência de variabilidade genética relativamente alta. Esse quadro parece estar intimamente relacionado ao comportamento biológico da espécie e às particularidades da região, suas características geomorfológicas e hidrológicas que proporcionam a coalescência das águas, um dos processos naturais de maior importância dentro do sistema do Pantanal para a manutenção da diversidade genética das populações, pois permite o contato entre sub regiões transpondo barreiras e facilitando as trocas genéticas entre os grupos populacionais.

A respeito da “história do táxon” por meio da análise filogeográfica, podemos dizer que apenas iniciamos “um conto”. Ou seja, vários aspectos foram observados e traçaram algumas diretrizes sobre o relacionamento genético histórico do dourado entre as sub-bacias que compõem o sistema do Prata, porém, novos estudos são necessários para uma conclusão mais completa. Entretanto, nossos resultados foram suficientes para mostrar que, apesar de um contato histórico antigo entre a sub-bacia do Paraná e o Alto Paraguai, provavelmente datado no momento da gênese do Pantanal, as populações de dourado nessas duas áreas hoje se apresentam geneticamente distanciadas.

O haplótipo ancestral (do Cit b e do D-loop) partilhado na rede haplotípica entre o Pantanal e o Uruguai sugere que talvez esse haplótipo tenha surgido mais ao sul da bacia do Prata e expandido no sentido sul-norte para as demais sub-bacias do sistema. O fato de o Paraná não compartilhar desse haplótipo, se posicionando em outro grupo, reforça a hipótese de divisão genética da população do dourado no sistema da bacia da Prata.

Os resultados reforçam a idéia de que o conhecimento da estrutura genético-populacional desses peixes e sua evolução ao longo do tempo e espaço é um instrumento muito importante para melhor compreensão das relações intra-específicas que ocorrem e, assim, contribuir de maneira eficiente na elaboração de planos de manejo adequado à conservação da espécie e gestão de pesca.

## VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABILHOA, V. e L.F. DUBOC. 2004. Peixes. Pp. 581-677. In: Mikich, S.B. & R.S. Bérnils, (Eds.). Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba, Instituto Ambiental do Paraná.

ABREU, M.M. De. 2008. Estudos Genéticos Comparativos Entre Populações De *Pseudoplatystoma Reticulatum* (Eigenmann & Eigenmann, 1889), (Pisces Siluriformes) Provenientes Dos Rios Paraguai E Jauru, E Uma População De *Pseudoplatystoma Corruscans* (Spix & Agassiz, 1829) (Pisces Siluriformes), Proveniente Do Rio Paraguai. **Dissertação De Mestrado**. Universidade Do Estado De Mato Grosso. Cáceres. 48p.

AB'SABER, A. N. 1988. O Pantanal Mato-grossense e a teoria dos refúgios. Rio de Janeiro, RJ. Revista Brasileira de Geografia, 50n, n. especial, t.2: 9-57.

AB'SABER, A. N. 2007. Brasil: Paisagens de Exceção: o Litoral e o Pantanal Mato-Grossense Patrimônios Básicos. Cotia, SP: Ateliê Editorial.182p.

ADMAS, A.M. and HUDSON, R.R. 2004. Maximum- Likelihood Estimation of Demographic Parameters Using the Frequency Spectrum of Unlinked Single-Nucleotide Polymorphisms. Genetics. 168: 1699-1712p. Doi: 10.1534/genetics.104.030171.

AGOSTINHO, A.A.; L.C. GOMES; H.I. SUZUKI; H.F.JÚLIO JR. 2003. Migratory fishes of the Upper Paraná River basin, Brazil. Pp. 19-98 in: J. Carosfeld, B. Harvey, C. Ross & A. Baer (eds.), Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status. World Fisheries Trust/The World Bank/International Development Research Centre, Ottawa, 372 pp.

AGOSTINHO, A.A.; GOMES, L.C.; PELICICE, F.M. 2007. Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil. Maringá: Eduem, 501p.

AGOSTINHO, A.A. e JÚLIO JÚNIOR, H.F. 1999. Peixes da bacia do alto rio Paraná. 374-400p. In: Lowel - Mcconnell, R.H. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Neotropicais. 1ª ed. São Paulo: **EDUSP**, 536p.

AGOSTINHO, A.A.; MIRANDA, L.E.; BINI, L.M.; GOMES, L.C.; THOMAZ, S.M.; SUZUKI, H.I. 1999. Patterns of colonization in Neotropical reservoirs, and prognosis on aging. Pp.227-265 in: J.G. Tundisi & M. Straskraba (eds.), Theoretical Reservoir Ecology and its applications. International Institute of Ecology, Academia Brasileira de Ciências e Backhuys Publishers.

AGOSTINHO, A.A.; VAZZOLER, A.E.A. de M.; GOMES, L.C.; OKADA, E.K. 1993. Estratificación espacial y comportamiento de *Prochilodus scrofa* en distintas fases del ciclo de vida, en La planície de inundación del alto rio Paraná y embalse de Itaipu, Paraná, Brazil. Revue D' Hydrobiologie Tropicale, Paris, v.26,n.1: 79-90p.

ALJANABI, S.M. e MARTINEZ, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693.

ALLENDORF, F.W. e LUIKART, G. 2007. Conservation and the genetics of populations. Oxford: Blackwell, 641p.

ALMEIDA, F.F.M.de. 1945. Geologia do Sudoeste Mato-grossense. Boletim da divisão de Geologia e Mineralogia. Rio de Janeiro (116): 19-25p.

ALMEIDA, F.F.M.de. 1949. Relevo de “cuestas” na Bacia Sedimentar do rio Paraná. Boletim Paulista de Geografia. São Paulo, n.3, 21-23p.

ALMEIDA. V. L. L.; N. S. HAHN; VAZZOLER. A. E. A. de M.. 1997. Feeding patterns in five predatory fishes of the High Paraná River floodplain (PR-Brazil). *Ecology of Freshwater Fish*, 6(3):123–133p.

AIVARENGA, S. M.; BRASIL, A. E.; PINHEIRO, R.; KUX, H. J. H. 1984. Estudo Geomorfológico Aplicado à Bacia do Alto Rio Paraguai e Pantanaís Mato-grossenses. Pp.89-183. In: Boletim Técnico. Projeto RADAMBRASIL. Série Geomorfologia 1, Salvador.

ASSINE, M.L. 2003. Sedimentação na bacia do Pantanal Mato-grossense, centro oeste do Brasil. **Tese de livre docência**. Instituto de Geociências e Exatas, UNESP. Rio Claro.106p.

ASSINE, M.L; SOARES, P.C. 2004. Quaternary of the Pantanal, west-central Brazil. *Quaternary International*, v.114,p.23-34.

AVISE, J.C.; LANSMAN, R.A.; SHADE, R.O. 1979. The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. I. Population structure and evolution in the genus *Peromyscus*. *Genetics* 92: 279-295.

AVISE, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 312: 325-342.

AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Massachusetts: Harvard University Press,447p.

BARBIERI, G.; SALLES, F.A.; CESTAROLLI, M.A. 2000. Influência de fatores abióticos na reprodução do dourado, *S. maxillosus* e do Curimatá, *Prochilodus lineatus* do Rio Mogi Guaçu (Cachoeira de Emas, Pirassununga/SP). *Acta Limnológica Brasileira*, 12: 85-91.

BATISTA, J.S. e 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): 723-740p.

BEAUMONT, A.R. e HOARE, K. 2003. *Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture*. Blackwell Science Ltda, Oxford.157pp.

BERTOLETTI, J. J.; LUCENA, C. A. S.; LUCENA, Z. M. S.; MALABARBA, L. R.; REIS, R. E. 1989. Ictiofauna do rio Uruguai superior entre os municípios de Aratiba e Esmeralda, Rio Grande do Sul, Brasil. *Comum. Mus.Ciênc.*, PUCRS (Porto Alegre), 48–49:3–42.

BIRKY, C.W.; MARUYAMA, T.; FUERST, P. 1983. An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplast and some results. *Genetics* 103, 513– 527.

BÖHLKE, J.E.; WEITZMAN, S.H.; MENEZES, N.A., 1978. Estado Atual da Sistemática dos peixes de água doce da América do Sul. *Acta Amazônica*. 8 (4): 657-677.

BONETTO, A.A.; PIGNALBERI, C.; YUAN, E.C. de; OLIVEROS, O. 1971. Informaciones complementarias sobre migraciones de peces em la cuenca del Plata. *Physis* 30 (81): 505-520p.

BRASIL, MINISTÉRIO DO INTERIOR. Departamento Nacional de obras de Saneamento. 1974a. Estudos hidrológicos da Bacia do Alto Paraguai. Relatório Técnico. Rio de Janeiro.v.1.235p.

BRASIL, MINISTÉRIO DAS MINAS E ENERGIA. Secretaria-Geral. 1982b. *Projeto RADAMBRASIL. Folha SE-21 Corumbá*; Geologia, Geomorfologia, Pedologia, Vegetação e Uso Potencial da Terra. Rio de Janeiro. 640p. il., 5 Mapas (Levantamento de Recursos Naturais, 25).

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Secretaria de Recursos Hídricos. 2006c. Programa de Estruturação Institucional para a Consolidação da Política Nacional de Recursos Hídricos – BRA/OEA/01/002. Caderno Regional da Região Hidrográfica do Paraguai. Curitiba.PR. 194p.

BRITSKI, H.A.; SILIMON, K.Z.de.S.; LOPES, B.S. 2007. Peixes do Pantanal: manual de identificação. 2ed.rev.ampl. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 227p.

BROWN, W. M.; GEORGE, M. Jr; WILSON A. C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences. USA* 76: 1967-1971.

BROWN, W.M.; PRAGER, E.M.; WANG, A.; WILSON, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-239.

BRUM, M.J.I. 1995. Correlações entre a Filogenia e a Citogenética dos Peixes Teleósteos. *Série Monografias*, nº 2,5-42.

BUCKUP, P.A., 1999. Sistemática e biogeografia de peixes de riachos. pp.91-138. in Caramaschi, E.P.; Mazzoni,R. e Peres-Neto, P.R.. *Ecologia de Peixes de Riachos. Série Oecologia Bras. Vol.IV. PPGE-UFRJ. Rio de Janeiro. Computer e Publish Editoração Ltda. 260p.*

BUCKUP, P.A. 2007. Introdução a Sistemática de Peixes Neotropicais. Curso de sistemática de peixes neotropicais. PRPPG-ERN. UFSCar, São Carlos. 214p.

BUCKUP, P.A.; MENEZES, N.A.; GHAZZI, M.S. (eds.) 2007. Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil. Rio de Janeiro, Museu Nacional. 195p. (Série Livros, 23) ISBN: 978-85-7427-018-0.

CALCAGNOTTO, D. 1993. Caracterização genético-bioquímica do Pacu (*Piaractus mesopotamicus*), Tambaqui (*Colossoma macropomum*) e seus híbridos recíprocos. **Dissertação de mestrado.** Instituto de Biociências/ USP. São Paulo. 89p.

CALCAGNOTTO, D.; SCHAEFER, S.A.; DESALLE, R. 2005. Relationships among characiform fishes inferred from analysis of nuclear and mitochondrial gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36: 135–153p.

CALCAGNOTTO, D e DESALLE, R. 2009. Population genetic structuring in pacu (*Piaractus mesopotamicus*) across the Paraná-Paraguay basin: evidence from microsatellites. *Neotropical Ichthyology*, 7(4):607-616p.

- CALHEIROS, D.F. e P; OLIVEIRA, M.D. 1999. Pesquisa limnológica no Pantanal: uma revisão.115-125p. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal,2. 1996, Corumbá. Manejo e Conservação. Anais... Embrapa Pantanal. 535p.
- CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M.N.; SACCONI, C. 1994. Evolutionary analysis of cytochrome b sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 589–597.
- CAROLSFELD, J.; HARVEY, B.; ROSS, C.; BAER, A. 2003. *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. Co-published by IDRC and the World Bank. ISBN 0-9683958-2-12
- CARRILLO-AVILA, M. 2009. Caracterização Genética de Populações de jaú (Siluriformes: Pimelodidae) utilizando marcadores moleculares mitocondriais e nucleares. **Tese de doutorado**. PPG/GEV. Universidade Federal de São Carlos. 159p.
- CASARIN, R. 2007. Caracterização dos principais vetores de degradação ambiental da Bacia Hidrográfica Paraguai/Diamantino. **Tese de Doutorado**. Instituto de Geociências/UFRJ. Rio de Janeiro. 169p.
- CASTELLOE, J. e TEMPLETON, A.R. 1994. Root probabilities for intraspecific gene trees under neutral coalescent theory. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 3: 102- 113p.
- CARVALHO, G. R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J.Fish Biol.*, **43** : (Suppl A), 53-73.
- CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI Jr., P.M. 2008. Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Genetics and Molecular Biology<sup>JCR</sup>*. V.31.377-380p.

CASTRO, R.M.C.; CASATTI, L.; SANTOS, H.F; FERREIRA, K.M.; RIBEIRO, A.C.; BENINEI, R.C.; DARDIS, G.Z.P.; Melo, A.L.A.; STOPIGLIA, R.; ABREU.; BOCKMANN, F.A; CARVALHO, M; GIBRAN, F.G.; LIMA, F.C.T. 2003. Estrutura e Composição da ictiofauna de riachos do rio Paranapanema, Sudeste e Sul do Brasil. *Biota Neotropica*, v3 (n1) - BN0170301

CASTRO, R.M.C. e 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: 189 pp.

CLABAUT, C.; SALZBURGER, W.; MEYER, A. 2005. Comparative phylogenetic analyses of the adaptive radiation of lake Tanganyika cichlid fish: nuclear sequences are less homoplasious but also less informative than mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution*, 61: 666–681.

COSTA, M.F. 2007. De Xarayes ao Pantanal: a cartografia de um mito geográfico. *Revista do ieb* n.4 p.21-36.

CRONIN, M.A.; SPEARMAN, W.J.; WILMOT, R.L.; PATTON, J.C.; BICKHAM, J.W. 1993. Mitochondrial DNA variation in chinook *Oncorhynchus tshawytscha*) and chum salmon (*O. keta*) detected by restriction enzyme analysis of Polymerase Chain Reaction (PCR) products. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **50**, 708-715p.

DA SILVA, C.J. 1990. Influências na variação da água sobre a estrutura e funcionamento de uma área alagável do Pantanal Mato Gorssense (Pantanal de Barão de Melgaço, município de Santo Antônio de Leverger e Barão de Melgaço – MT.). **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de São Carlos.SP.

DA SILVA, C.J.; SILVA, J.A.F. 1995. No Ritmo das Águas do Pantanal. São Paulo. **NUPAUB/USP**.



DA SILVA, C.J.; WANTZEN, K.M.; DA CUNHA, C.N.; MACHADO, F.A. 2001. Biodiversity in the Pantanal wetland, Brazil. pp. 1-29. In: B. Gopal, W.J. Junk & J.A. Davis (Eds.), Biodiversity in wetlands: assessement, function and conservation, volume 2.

DA SILVA, C.J.; ABDO, M.S.A.; NUNES, J.R.S. 2009. O rio Cuiabá no Pantanal Matogrossense. pp.126-139. In: Bacia do Rio Cuiabá, uma abordagem socioambiental. Figueiredo, D.M. e Salomão, F.X.T. organizadores. Cuiabá,MT. Entrelinhas: EdUFMT.216p.

DA SILVA, J.S.V. e ABDON, M.M. 1998. Delimitação do Pantanal brasileiro e suas sub regiões. Pesq. Agropec. Bras., Brasília, v.33, Número Especial, p.1703-1711. (geologia pantanal).

DERGAM, H.I.; SUZUKI, O.A.; SHIBATTA, L.F.; DUBOC, H.F.; JÚLIO Jr., L.; GUILIANO-CAETANO BLACK, W.C. 1998. Molecular biogeography of the Neotropical fishes *Hoplias malabaricus* (Erythrinidae: Characiformes) in the Iguaçu, Tibagi, and Paraná rivers, Genet. Mol. Biol. **21**, pp. 493–496.

EBERHARD, A., 2000. The Pantanal today, Prospects for tomorrow. 77-91p. In: The Pantanal, St. Paul Minnesota: Paragon House.

EIZIRIK, R. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. *Brazilia Journal of genetics*, v.19,n.4,supplement,p.23-29.

EMERSON, B.C.; PARADIS, E.; THÉBAUD, C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 707–716.

ESQUÍCERO, A.L.H. e ARCIFA, M.S.A. 2009. Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. *Hydrobiologia*. Doi 10.1007/s10750-009-0008-2.

ESPOSTI, M.D.; DE VRIES, S.; CRIMI, M.; GHELLI, A.; PATARNELLO T.; MEYER, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein. *Biochimica et biophysica acta*, 26: 243-271.

ESTEVEES, K.E. e PINTO LÔBO, A.V. 2001. Feeding pattern of *Salminus maxillosus* (Pices, Characidae) at cachoeira das Emas, Mogi Guaçu river (São Paulo state, southeast Brazil). *Rev. Brasil. Biol*, 61(2): 267-276p.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using *Phred*. I. Accuracy assessment. *Genome Research*, 8: 175-185p.

EXCOFFIER, L; SMOUSE P.E.; QUATTRO J.M. 1992. Analysis of molecular variance from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479–491.

EXCOFFIER, L. 2004. Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: Lessons from the infinite-island model. *Mol Ecol*, 13: 853-864.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1:47-50.

FACINCANI, E. M.; ASSINE, M.L.; SILVA, A.; ZANI, H.; ARAÚJO, B.C.; MIRANDA, G.M. 2006. Geomorfologia fluvial do leque do rio Aquidauana, borda sudeste do Pantanal, MS. Anais 1º Simpósio de Geotecnologias no Pantanal, Campo Grande, Brasil. Embrapa Informática Agropecuária/INPE, p.175-181.

FARIAS, I.P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. 1999. Mitochondrial DNA Phylogeny of the Family Cichlidae: Monophyly and Fast Molecular Evolution of the Neotropical Assemblage. *J Mol Evol*, 48:703–711.

FARIAS, I.P.; ORTÍ, G.; SAMPAIO, I.; SCHNEIDER, H.; MEYER, A. 2001. The cytochrome *b* gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *J Mol Evol*, 53: 89–103.

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

- FERREIRA, M. E. 2001. Técnicas e estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. Pp.233-267. In Garay, I. & Dias, B. (Eds.), Conservação da biodiversidade em Ecossistemas Tropicais. Petrópolis:Vozes, 431p.
- FRACALOSSI, D.M.; ZANIBONI-FILHO, E.; MEURER, S. 2002. No rastro das espécies nativas. Panorama da Aqüicultura, 12 (74): 43-49p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. 2008. Fundamentos da Genética da Conservação. Ribeirão Preto: SBG, 262p.
- FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. 2010. Introduction to Conservation Genetics, Second Edition. Cambridge University Press. 618pp.
- FU Y-X e LI W-H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133: 693-709.
- FU Y-X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.
- GAFFNEY, P.M.; RUPNOW, J.; DOMEIER, M.L. 2007. Genetic similarity of disjunct populations of the giant sea bass *Stereolepis gigas*. *J Fish Biol* 70 (Supplement A):111-124
- GODOY, M. P., 1975. *Peixes do Brasil: Subordem Characoidei*. Ed.Franciscana, Paciciraba 4: 631-831.
- GRAÇA, W.J. e PAVANELLI, C.S. 2007. Peixes da Planície de Inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. Maringá: Eduem. 241p.
- GRIFFITHS, C.S. 1997. Correlation of functional domains and rates of nucleotide substitution in cytochrome b. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 352–365.

HAFFER, J. e PRANCE, G.T. 2002. Impulsos Climáticos da Evolução na Amazônia durante o Cenozóico: sobre a teoria dos refúgios da diferenciação biótica. *Estudos Avançados*, 16 (46), 175-206p.

HALL, C.A.S.; STANFORD, J.A; HAUER, F.R. 1992. The distribution and abundance of organisms as a consequence of energy balances along multiple environmental gradients. *Oikos*, 65: 377-390p.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic. Acids Symposium. Series*, 41: 95-98.

HAHN, L. e CÂMERA, L. F. 2000. Ictiofauna do rio Uruguai: pesquisas e impactos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Ictiologia*, 58:9–11p.

HARPENDING, H.C. 1994. Signature of ancient population-growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, n. 66, p. 591-600.

HARPENDING, H.C.; BATZER, M.A.; GURVEN, M.; JORDE, L.B.; ROGERS, A.R.; SHERRY, S.T. 1998. Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the national academy of sciences of the u.s.a.*, 95: 1961–1967p.

HARRIS, M.B.; ARCANGELO, C.; PINTO, E.C.T.; CAMARGO, G.; RAMOS NETO, M.B.; SILVA, S.M. 2005. Estimativas de perda da área natural da Bacia do Alto Paraguai e Pantanal Brasileiro. Relatório técnico não publicado. Conservação Internacional, Campo Grande. 35p.

HATANAKA, T. e GALETTI JR, P.M. 2003. RAPD markers indicate the occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*. 26(1): 19-25.

HATANAKA, T.; SILVA, F. H.; GALETTI, P. M. 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*, 126: 153-159.

HECKMAN, C.W. 1999. Geographical and climatic factors as determinants of the biotic differences between the northern and southern parts of the Pantanal Mato Grossense. 167-175p. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2. 1996, Corumbá. Manejo e Conservação. Anais... Embrapa Pantanal. 535p.

HOLSINGER, K.E. 2008. Tajima's D, Fay and Wu's H, Zeng et al.'s E, and Fu's F<sub>s</sub>. Attribution-NonCommercial-ShareAlike License. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>. California, USA.

HRBEK, T. e LARSON, A. 1999. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. *Evolution* 53:1200-1216.

HUBERT, N. e RENNO, J. F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography* 33, 1414–1436

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 1977. Geografia do Brasil. vol.4, Região Centro-Oeste. Rio de Janeiro.

IRWIN DM, K.T.D. e WILSON, A.C. 1991. Evolution of cytochrome b gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 2:13–34.

ISSAC-JUNIOR, J.B. 1999. Gametogênese e ciclo reprodutivo do dourado, *Salminus brasiliensis* (Curvier, 1817) (Pisces: Characidae), do rio São Francisco, Minas gerais. **Dissertação de mestrado**. Inst. Ciências Biológicas, UFMG, 89p.

JUNK, W. F.; BAYLEY, P. B.; SPARKS, R. E. 1989. The Flood Pulse Concept in River Floodplains. In: *Can. Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 106: 110-127.

JUNK, W.J. 1999. The flood pulse concept of large rivers: learning from the tropics, *Archieve hydrobiologie*, Vol. 11, nº3.

JUNK, W.J. e DA SILVA, C.J. 1999. O Conceito do pulso de inundação e suas aplicações para o Pantanal de Mato Grosso.17-28p. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal,1996. 2. Manejo e Consevação. Anais.... Corumbá: Embrapa Pantanal. 535p.

KOCHER, T.D.; THOMAS, W.K.; MEYER, A.; EDWARDS, S.V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F.X.; WILSON, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial-DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 86: 6196-6200p.

LANGANI, F.; CASTRO, R.M.C.; OYAKAWA, O.T.; SHIBATTA, O.A.; PAVANELLI, C.S.; CASATTI, L. 2007. Diversidade da ictiofauna do Alto Rio Paraná: composição atual e perspectivas futuras. *Biota Neotropica*: v7, n3, 181-197p.

LIBRADO, P. e ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452p.

LIMA, F.C.T.; MALABARBA, L.R.; BUCKUP, P.A.; SILVA, J.F.P.; VARI, R.P.; HAROLD, A.; BENINE, R.; OYAKAWA, O.T.; PAVANELLI, C.S.; MENEZES, N.A.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, M.C.S.L.; LUCENA, Z.M.S.; REIS, R.E.; LANGANI, F.; CASSATI, L.; BERTACO, V.A.; MOREIRA, C.; LUCINDA, P.H.F. 2003. Genera Incertae Sedis in Characidae. P 106-156. In: Reis, R.E.; Kullander, S.O. e Ferraris, C.J. (eds), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Edipurs, Porto Alegre, 729p.

LIMA, F. C. T. 2006. Revisão taxonômica e relações filogenéticas do gênero *Salminus* (Teleostei:Ostariophysi: Characiformes: Characidae). Unpublished Ph.D. Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo. 253p.

LIMA, F. C. T. e BRITSKI, H. A. 2007. *Salminus franciscanus*, a new species from the rio São Francisco basin, Brazil (Ostariophysi: Characiformes: Characidae). *Neotropical Ichthyology*, 5(3):237-244p.

LIMA, R.L.V.A.; VAL-SELLA, M.V.; TORQUATO, V.C. 1986. Organização e desenvolvimento das gônadas do dourado (*Salminus maxillosus*) durante o ciclo reprodutivo. Bol. Fisiol. Anim., 10: 139-154p.

LIS, J. T. 1980. Fractionation of DNA fragments by polyethyleneglycol induced precipitation. Methods in Enzimology, 65: 347-353p.

LOPES, C. M.; ALMEIDA, F. S.; ORSI, M.L.; BRITTO, S.G.C.; SIROL, R.N.; SODRÉ, L.M.K. 2007. Fish passage ladders from Canoas Complex – Paranapanema River: evaluation of genetic structure maintenance of *Salminus brasiliensis* (Teleostei: Characiformes). Neotropical Ichthyology, 5(2):131-138p.

LOPES, I.F.; MIÑO, C.I.; DEL LAMA, S.N. 2007. Genetic diversity and evidence of recent demographic expansion in waterbird populations from the Brazilian Pantanal. Braz. J. Biol., 67(4, Suppl.): 849-857p.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; HONEYCUTT, R.L.; WINEMILLER, K.O. 2005. “Molecular phylogeny and evidence for an adaptive radiation of geophagine cichlids from South America (Perciformes: Labroidei).” Molecular Phylogenetics and Evolution, 34: 227-244p.

LOVEJOY, N.R. e DE ARAÚJO, L.G.. 2000. Molecular systematics, biogeography, and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*, Mol. Ecol. 9, pp. 259–268p.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. 2006. Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application. Blackwell Publishing Ltd. Oxford, USA.

LOWE - MCCONNELL, R.H. 1999. Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Neotropicais. 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 536p.

LUNDBERG, J.G. 1998. The temporal context for the diversification of neotropical fishes. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari R.P.; Lucena, Z.M.; Lucena, C.A.S. (Eds.). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Porto Alegre: EDIPUCRS. pp. 49-68p.

LUNDBERG, J.G.; MARSHALL, L.G.; GUERRERO, J.; HORTON, B.; MALABARBA, M.C. And WESSELINGH, F. 1998. The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers. In: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, C.A.S., Lucena, Z.M.S. (Eds.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. EDIPUCRS, Porto Alegre. Chapter 1.

MACHADO, C. 2003. Aspectos reprodutivos de dourado *Salminus brasiliensis* (Curvier, 1816) (Teleostei, Characidae) na Região do Alto Rio Uruguai, Brasil. **Dissertação de mestrado**. UFSC.61p.

MACHADO,V.; SCHULZ, U.H.; PALMA, L.P.; RODRIGUES, J.J.S. 2005. Mitochondrial DNA Variation and Genetic population structure of the migratory freshwater fish dourado *Salminus brasiliensis* (Characidae). Acta Biologica Leopoldensia, 27 (2): 107-113p.

MALABARBA, M.C.S.L. 1998. Phylogeny of fóssil Characiformes and paleogeography of the Tremembé formation. In: Malabarba, L.R., Reis, C.R., Vari, R.P., Lucena, Z.M.S., Lucena, C.A.S., (Eds). Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs. Porto Alegre. 603p.

MALABARBA, L.R.; REIS, C.R.; VARI, R.P.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S. 1998. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Edipucrs. Porto Alegre. 603p.

MARGARIDO, V.P. e GALETTI JR., P.M. 1999. Heterochromatin patterns and karyotype relationships within and between the genera *Brycon* and *Salminus* (Pisces, Characidae). Genetics and Molecular Biology,22: 357-361p.

MARQUES, A.A.B.; FONTANA, C.S.; VÉLEZ, E.; BENCKE, G.A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R.E. 2002. Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, Publicações avulsas FZB, 52p.

MARTINS, C.; WASCO, 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: 33-38p.



MARTINS, C.; PORTO-FORESTI, F.; WASKO, A.D.; LEITÃO, G.R.; OLIVEIRA, C.; FORESTI, F., 2002. Marcadores Genéticos e sua aplicação na piscicultura. *Rev.Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* nº 28: 12-15p.

MATEUS, L. A. F., PENHA, J.M. F.; PETRERE, M. 2004. Fishing resources in the rio Cuiabá basin, Pantanal do Mato Grosso, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 2(4): 217-227p.

MATSUMOTO, C.K. e HILSDORF, A.W.S. 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):395-402p.

MENEZES, N.A. 1972. *Poluição e Piscicultura*. São Paulo. Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguaí. **USP**.

MENEZES, N. A.; BUCKUP, P. A.; FIGUEIREDO, J. L.; MOURA, R. L. 2003. Catálogo das espécies de peixes marinhos do Brasil. São Paulo: Museu de Zoologia USP, v. 1. 160 p.

MEYER, A., KOCHER, T.D., BASASIBWAKI P. & WILSON, A.C. 1990. Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature* **347** (6293): 550-553p.

MEYER, A. 1994. DNA technology and phylogeny of fish. *In*: Beaumont, A.R. (Ed). *Genetics and evolution of aquatic organisms*. London: Chapman e Hall. 219-249p.

MORAIS FILHO, M.B. e SCHUBART, O. 1955. Contribuição ao Estudo do Dourado (*Salminus maxillosus*) do Rio Mogi Guassu. Ministério da Agricultura. São Paulo. 146p.

MOURA, N.A., 2000. Influência de fatores físicos-químicos e recursos alimentares na migração lateral de peixes no lago Chacororé, Pantanal de Barão de Melgaço, Estado de Mato-Grosso. **Dissertação de Mestrado**, UA/INPA/UNEMAT, Manaus (AM). 88p.

MOYSES, C.B. e ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2002. Restriction Length polymorphism of mitochondrial DNA among five freshwater fish species of the genus *Astyanax*. *Genetics and Molecular Biology*, 25:401-408p.

NAKATANI, K.; AGOSTINHO, A.A; BAUMGARTNER, G.; BIALETZKI, A.; SANCHES, P.V.; MAKRAKIS, M.C.; PAVANELLI, C.S. 2001. Ovos e Larvas de Peixes de água doce. Desenvolvimento e manual de identificação. **EDUEM** – Maringá. 378p.

NEI, M.. 1977. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivides populations. *Ann. Hum.Genet.*, **41**, 225-233p.

NEI M. e KUMAR, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, 333p.

NELSON, J.S. 1994. *Fishes of the world*. John Wiley e Sons, 3. ed. New York.

NELSON, J.S. 2006. *Fishes of the world*. John Wiley e Sons, New York.

NIRCHIO, M. e OLIVEIRA, C. 2006. *Citogenética de Peces*. Ed. Universidad de Oriente. Venezuela.212p.

NICOD, J.C.; WANG, Y. Z.; EXCOFFIER, L.; LARGIADE'R, C. R. 2004. Low levels of mitochondrial DNA variation amongcentral and southern European *Esox lucius* populations. *Journal of Fish Biology*. 64: 1442–1449p. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00397.

ODÁLIA-RIMOLI, A.; ARRUDA, E.J.; RIMOLI, J.; BUENO, N.R.; COSTA, R.B. 2000. Biodiversity Biotechnology and Genetic Conservation in Local Development. *Revista Internacional de Desenvolvimento Local*. V.1, n1: 21-30p.

ORTÍ, G. e MEYER, A. 1996a. Molecular evolution of ependymin and the phylogenetic resolution of early divergences among euteleost fishes. *Molecular Biology and Evolution*, 13: 556-573p.

ORTÍ, G. e MEYER, A. 1997b. The radiation of characiform fishes and the limits of resolution of mitochondrial ribosomal DNA sequences. *Systematic Biology*, 46(1): 75-100p.

PAE. 2004. Implementação de Práticas de Gerenciamento Integrado de Bacia Hidrográfica para o Pantanal e Bacia do Alto Paraguai ANA/GEF/PNUMA/OEA: Programa de Ações Estratégicas para o Gerenciamento Integrado do Pantanal e Bacia do Alto Paraguai: Relatório Final/Agência Nacional de Águas – ANA ... [et al.]. – Brasília: TODA Desenho & Arte Ltda.316p.

PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; MCMILLAN, W.O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. 2002. The simple fool's guide to PCR: version 2. University of Hawaii.

PARSON, W.; PEGORARO, K; NIEDERSTÄTTER, H.; FÖGER, M.; STEINLECHNER, M. 2000. Species identification by means of the cytochrome b gene. *Int J Legal Med*. 114:23–28p.

PCBAP- 1997. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai- PCBAP/Projeto Pantanal, Programa Nacional do Meio Ambiente. Brasília: PNMA, 1997.v3. 375p.

PCBAP. 1997. Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai - Pantanal. Brasília: Diagnóstico do Meio Físico e Biótico. Ministério dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal. v2. p1349.

PEREIRA, L.H.G. 2007. Diversidade e estrutura genéticas em populações naturais de *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu.

PEREZ-SWEENEY, B.M.; RODRIGUES, F.P.; MELNICK, D.J. 2004. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação.343-380p. In: Cullen Jr., L.; Rudran, R. e Padua, C.V. Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre. Ed. UFPR.665p.

PONCE, V. M. 1995. Impacto Hidrológico e ambiental da Hidrovia Paraná- Paraguai no Pantanal Mato-Grossense – Um estudo de referência. San Diego State: University, 132p.

POVH, J.A.; MOREIRA, H.L.M.; RIBEIRO, R.P.; PRIOLI, A.P.; VARGAS, L.; BLANCK, D.V.; GASPARINO, E.; STREIT JUNIOR, D.P. 2005. Estimativa da variabilidade genética em linhagens de tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com a técnica de RAPD. **Acta Scientiarum: Animal Sciences**, v.27, 1-10p.

POVH, J.A.; RIBEIRO, R.P.; SIROL, R.N.; STREIT JÚNIOR, D.P.; LOPERA-BARRERO, N.M.; VARGAS, L.; GOMES, P.C.; LOPES, T. S. 2008. Diversidade genética de pacu do Rio Paranapanema e do estoque de um programa de repovoamento. *Pesq. agropec. bras.*, Brasília, v.43, n.2, 201-206p.

PÓVOAS, L.C. 1977. Mato Grosso um convite à fortuna. Rio de Janeiro:Guavira, 166p.

PRIOLI, S. M.A.P.; PRIOLI, A. J.; JÚLIO JR.; H. F.; PAVANELLI, C. S.; OLIVEIRA, A. V.; CARRER, H.; CARRARO, D M.; PRIOLI, L.M. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the IguaçúRiver, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, 25(4): 421-430p.

RAMELLA, S.M.; KROTH, M.P.; MEURER, S.; NUÑER, A.P.O.; ZANIBONI FILHO, E.; ARISI, A.C.M. 2006. Genetic Variability in Four Fish Species (*Pimelodus maculatus*, *Prochilodus lineatus*, *Salminus brasiliensis* and *Steindachneridion scripta*) from Uruguay River Basin. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, vol.49, n. 4: 589-598p.

RAYMOND, M. e ROUSSET, F. 1995. GENEPOP (version 1.2): a population genetic software for exact test and ecumenism. *Journal of Heredity*, 86: 248-249p.

REIS, R.E.; LUCENA, Z.M.S.; LUCENA, C.A.S.; MALABARBA, L.R. 2003. Peixes. Pp. 117-145. In:Fontana, C.S., G.A.Bencke & R.E. Reis (Eds.), Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Edipucrs, Porto Alegre, 632 p

REIS, R.E.; KULLANDER, S.O.; FERRARIS, C. 2003. Check List of The Freshwater Fishes of South And Central America (CLOFFSCA), EDIOUCRS. Porto Alegre, 729p.

RENNO, J.F.; HUBERT, N.; TORRICO, J.P.; DUPONCHELLE, F.; NUNEZ ROBRIGUEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; WILLIS S.C.; DESMARAIS, E. 2006. Phylogeography of peacock bass *Cichla monoculus* in the upper Madeira (Amazon, Bolivia): evidence of incipient speciation, *Mol. Phylogenet. Evol.* **41**, 503–510p.

RESENDE, E.K.; CATELLA, A.C.; NASCIMENTO, F.L.; PALMEIRA, S. Das.; PEREIRA, R.A. C.; LIMA, M. De. S.; ALMEIDA, V.L.L. de. 1996. Biologia do curimatá (*Prochilodus lineatus*), pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) e cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) na bacia hidrográfica do rio Miranda, Pantanal de Mato Grosso do Sul, Brasil. Corumbá. Embrapa-CPAP, 75p.

RESENDE, E.K. e PALMEIRA, S.S. 1999. Estrutura e dinâmica das comunidades de peixes da planície inundável do rio Miranda, Pantanal de Mato Grosso do Sul. 249-289p. In: Simpósio sobre recursos naturais e sócio-econômicos do Pantanal, 2. 1996, Corumbá. Manejo e Conservação. Anais... Embrapa Pantanal. 535p.

RESENDE, E.K. 2003. Migratory Fishes Of The Paraguay–Paraná Basin Excluding The Upper Paraná Basin. In: *Migratory Fishes of South America : Biology, Fisheries and Conservation Status* / edited by Joachim Carolsfeld . [et al]. Co-published by IDRC and the World. Bank.

REVALDAVES, E.; RENESTO, E.; MACHADO, M. F. P. S. 1997. Genetic variability of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) in the upper Paraná river. *Braz. J. Genet.*, **20**, 381-388.

RIBEIRO, A.C. 2006. Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotrop. Ichthyol.*, 4(2):225-246p.

RIBEIRO, A.C. 2007. Filogenia e biogeografia do gênero *Oligosarcus* Günther, 1864 (Ostariophysi; Characidae). **Tese de doutorado**. UNESP-Botucatu. 138p.

RIBEIRO, D.F.O. e NUÑER, A.P.O. 2008. Feed preferences of *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae) larvae in fish ponds. *Aquaculture*, 274: 65-71p.

ROGERS, A. R. e HARPENDING H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–569p.

ROSA, R.S. e LIMA, F.C.T. 2008. Peixes Brasileiros Ameaçados de Extinção. 1-19p. In: Livro Vermelho da Fauna Brasileira ameaçada de extinção / editores Machado, A.B.M.; Drummond, G.M.; Paglia, A.P. - 1.ed. - Brasília, DF : MMA; Biodiversitas, v.2, 1420p.

SANCHES, A. 2002. Análise de RAPD em *Brycon microlepis* (Characidae): Um estudo Populacional e suas implicações na conservação da espécie. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de São Carlos.SP

SANCHES, A. e GALETTI JR., P.M. 2007. Genetic Evidence of Population substructuring in the Neotropical freshwater fish *Brycon hilarii*. *Brazilian Journal of Biology*, 67: 895p.

SATO, Y. 1999. Reprodução de peixes da bacia do rio São Francisco: Introdução e caracterização de padrões. **Tese de doutorado**, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UFSCar. 179p.

SCHAEFER, S.A. 1998. Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical Cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). pp. 363–374. In: Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and classification of neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS.

SCHMIDT, H.A.; STRIMMER, K.; VINGRON, M.; VON HAESLER, A. 2002. Treepuzzle: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*, 18: 502-504p.

SCHNEIDER, S. e EXCOFFIER, L. 1999. Estimation of demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079-1089p.

SCHULZ, U.H.; DA COSTA SILVA, R.; MACEDO, T.B.; LEUCHTENBERGER, C. 2003. Daily movement pattern, habitat use and spawning migration of radio-tagged dourado (*Salminus brasiliensis*) in rio dos Sinos, Brazil. In: 83<sup>rd</sup> Annual Meeting of the American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Manaus, on CD.

SEGOVIA, A. 2000. Geology of the Pantanal region, Pp 69-72. In: Swartz, F.A. (Eds), The Pantanal, Paragon House: St. Paul Minnesota, 301p.

SEIDL, A.F.; SILVA, J.S.V.; MORAES, A.S. 2001. Cattle ranching and deforestation in the Brazilian Pantanal, Ecological economics, 36: 413- 425p.

SHIBATTA, O.A.; GEALH, A.M.; BENNEMANN, S.T. 2007. Ictiofauna dos trechos alto e médio da bacia do rio Tibagi, Paraná, Brasil. Biota Neotropica, v7, n2. 125-134p.

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H. And FLOOK, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene-sequences and a compilation of conserved polymerase chain-reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87: 651-701p.

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

SLATKIN, M. e HUDSON, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129: 555–562p.

SOUZA, J.C.C., 1984. Geografia Regional (Centro-Oeste de MatoGrosso). Cuiabá. 3<sup>a</sup> ed. PRES, 205p.

SOUZA, I. L.; SANTOS-SILVA, L.K.; VENERE, P. C.; MOREIRA-FILHO, O. 2008. Molecular cytogenetics of *Salminus* fish (Characiformes) based on 5S and 18S rRNA genes hybridization, fluorochrome staining and C-banding. *Micron*, 39:1036–1041p.

STEPIEN, C.A. e KOCHER, T.D. 1997. Molecules and Morphology in Studies of Fish Evolution. 1-11p. In: Molecular Systematics of fishes, Kocher, T.D and Stepien, C.A. Editors. San Diego, Academic Press.

SUGANUMA, C. H. 2008. Avaliação da Diversidade Genética de Populações de Pacu (*Piaractus mesopotamicus* Holmberg, 1887) do Pantanal Mato-grossense com o Uso de Marcadores Moleculares do Tipo Microsatélites. Jaboticabal, **Tese doutorado**. UNESP-Centro de Aquicultura, 105p.

SVERLIJ, S.B. e ESPINACH ROS, A. 1986. El dorado, *Salminus maxillosus* (Pisces, Characiformes) em el Rio de La Plata Y Rio Uruguay inferior. Revista de Investigación y Desarrollo Pesquero, 6: 57-75p.

SWARTZ, F.A. 2000. The Pantanal. Paragon House: St. Paul Minnesota, 301p.

TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595p.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596-1599p.

TEMPLETON, A.R. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. USA: Wiley-Liss, 705p.

TESSIER, N. e BERNATCHEZ, L. 2000. A genetic assessment of single versus double origin of landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*) from Lake Saint-Jean, Québec, Canada. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 57: 797-804p.

TOLEDO FILHO, S.A.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. 1992a. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. CCS/USP. São Paulo. Cadernos de Ictiogenética, 1: 39p.



TOLEDO FILHO, S.A.; ALMEIDA – TOLEDO, L.F.; FORESTI, F. BERNADINO, G.; CALCAGNOTTO, D. 1994b. Monitoramento e conservação genética em projetos de hibridação entre pacu e tambaqui. CCS/USP, São Paulo. Cadernos de ictiogenética 2: 51p.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBRON, T.J. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acid Research*, 22: 4673-4680p.

TUCCI, C.E.M. 1997. Bacia hidrográfica do Alto Paraguai. pp5-12. IN: Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai- PCBAP/Projeto Pantanal, Programa Nacional do Meio Ambiente. Brasília: PNMA. v.2 – hidrossedimentologia do alto Paraguai. 376p.

TUCCI, C.E.M. e GENZ, F. 1997. Caracterização hidrológica da BAP. pp173-256. IN: Plano de Conservação da Bacia do Alto Paraguai- PCBAP/Projeto Pantanal, Programa Nacional do Meio Ambiente. Brasília: PNMA. v.2 – hidrossedimentologia do alto Paraguai. 376p.

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, *J. Fish Biol.* 64, pp. 186–201p.

UTTER, F.M. 1991. Biochemical Genetics and Fisher Management: an historical perspective. *Journal of Fish Biology* 39: 1-20p.

VALVERDE, O. 1972. Fundamentos geográficos do planejamento do município de Corumbá. *Revista Brasileira de Geografia*, 34 (1): 49-137p.

VAZZOLER, A.E.M. e MENEZES, N.A. 1992. Síntese de conhecimentos sobre o comportamento reprodutivo dos Characiformes da América do Sul (Teleostei, Ostariophysii). *Revista Brasileira de Biologia*, 52 (4): 627-640p.

WASKO, A.P. e GALETTI JR., P.M. 2000. Mapping 18S ribosomal genes in fish of the genus *Brycon* (Characidae) by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Genet. Mol. Biol*, 23 (1): 135–138p.

WASKO, A.P. e GALETTI JR., P.M. 2002. RAPD analysis in the neotropical fish *Brycon Lundi* (Characidae): genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474: 131-137p.

WEST-EBERHARD, M.J. 1989. Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, Vol. 20. 249-278p.

ZANIBONI-FILHO, E. e SCHULZ, U.H. 2003. Migratory fishes of the Uruguay river. Pp 135-168. In: J Carolsfeld , B. Harvey; A. Baer; C. Ross (Eds), *Migratory Fishes of South America : Biology, Fisheries and Conservation Status*,372p.

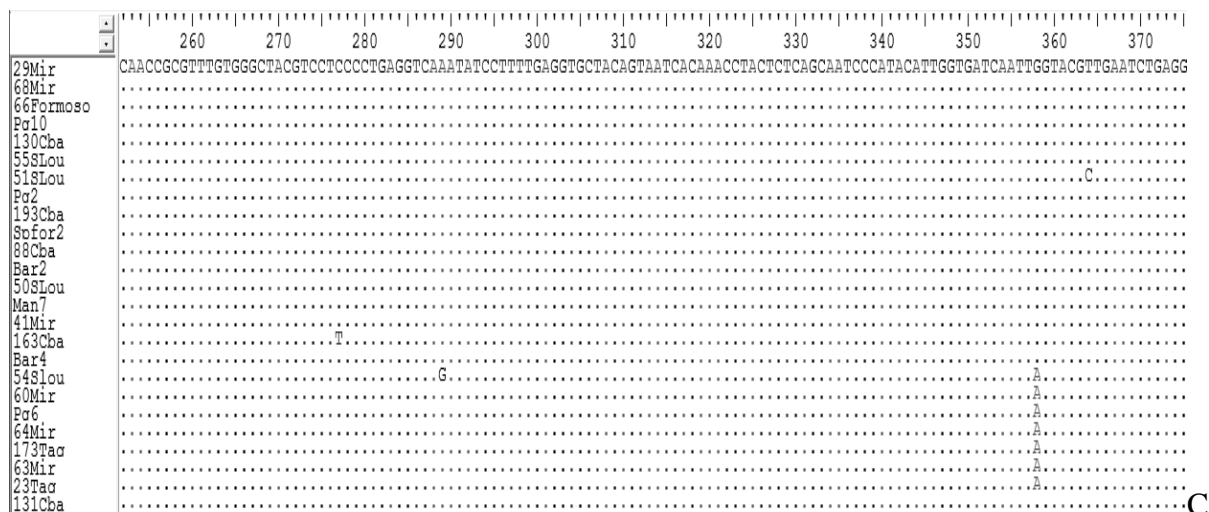
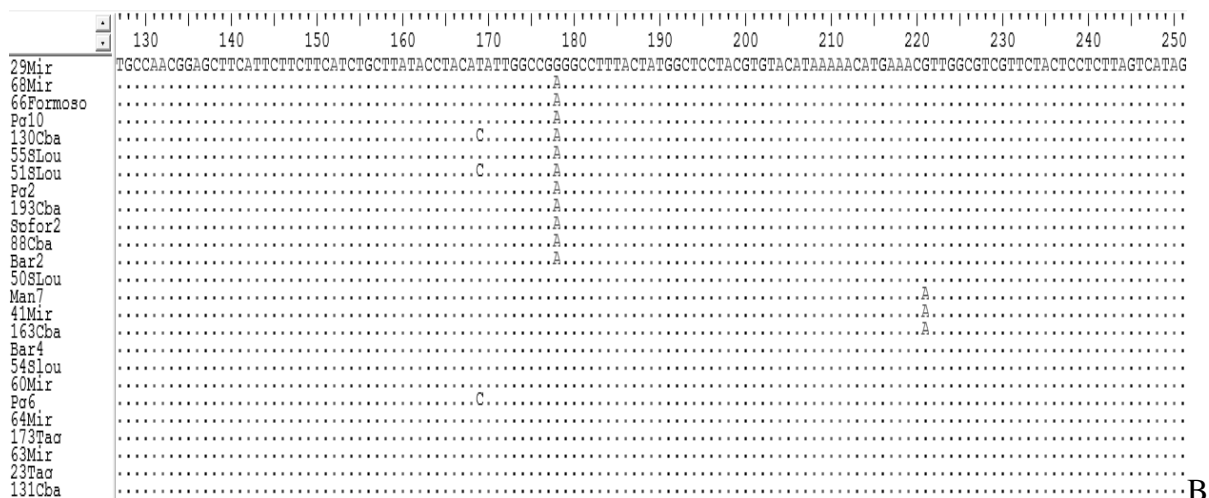
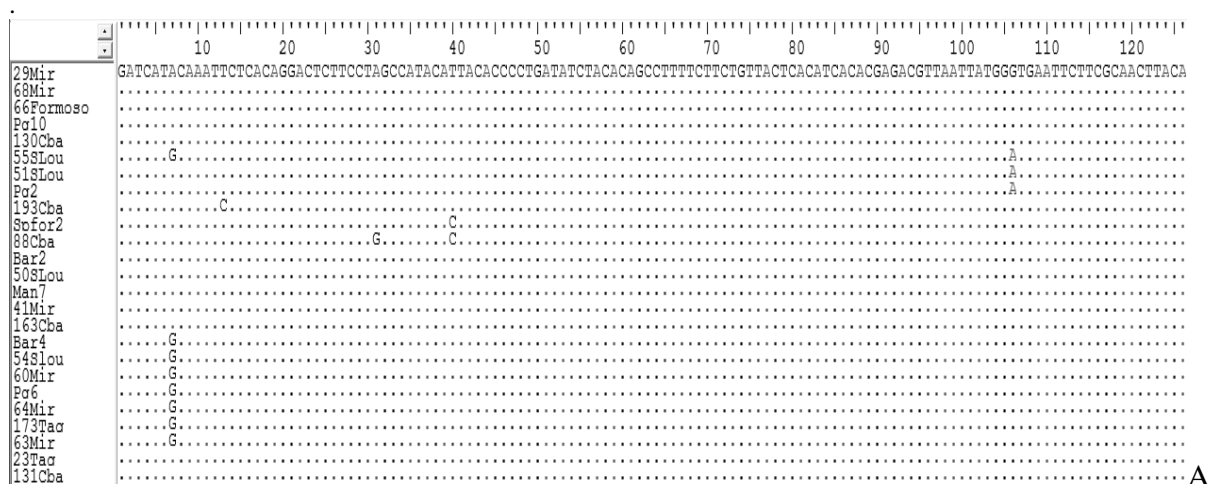
ZANIBONI-FILHO, E; MEURER, S; SHIBATTA, O.A; NUÑER, A.P.O. 2004. Catálogo Ilustrado de Peixes do Alto Rio Uruguai. Universidade Federal de Santa Catarina/Tractebel Energia, Florianópolis. 128p.

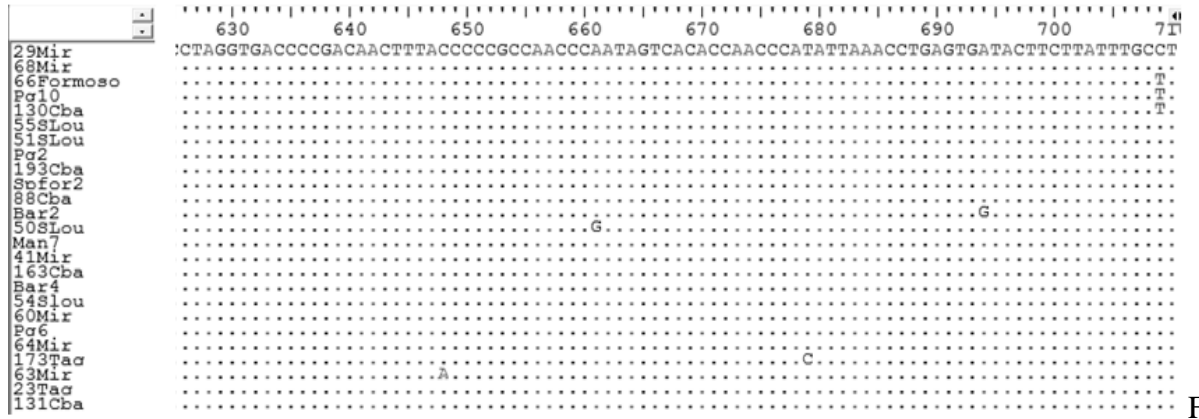
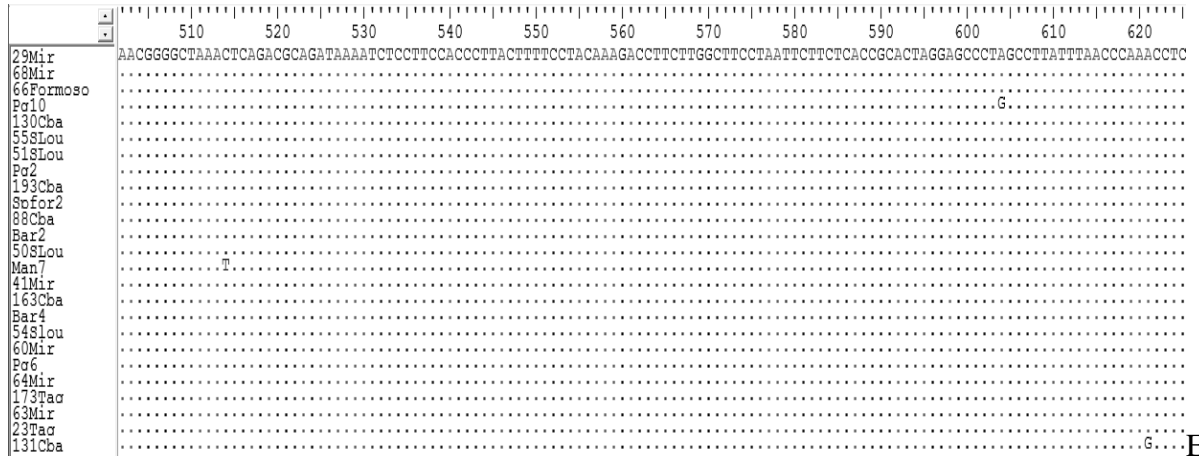
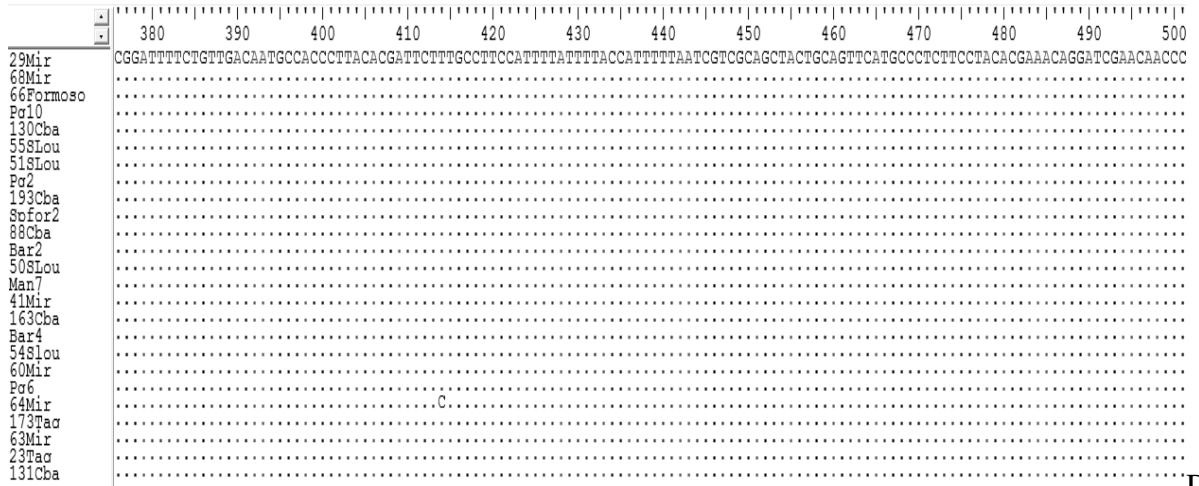
ZAYAS, M.A. e CORDIVIOLA, E. 2007. The conservation state of characidae fish (Pisces: Characiformes) in of the plata basin, Argentina. *Gayana* 71(2): 178-186p.

## **VIII – ANEXOS**

## VIII.1 – ANEXO

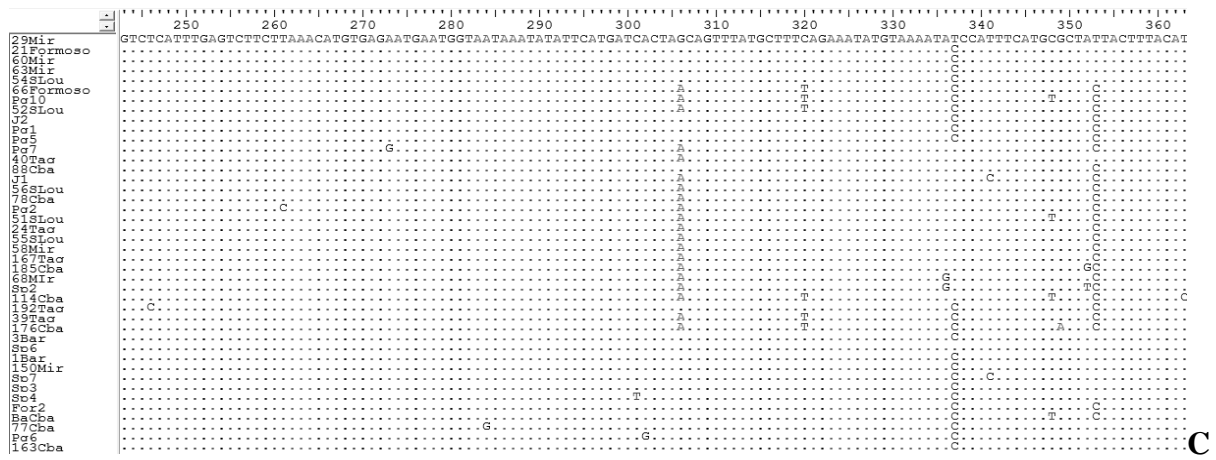
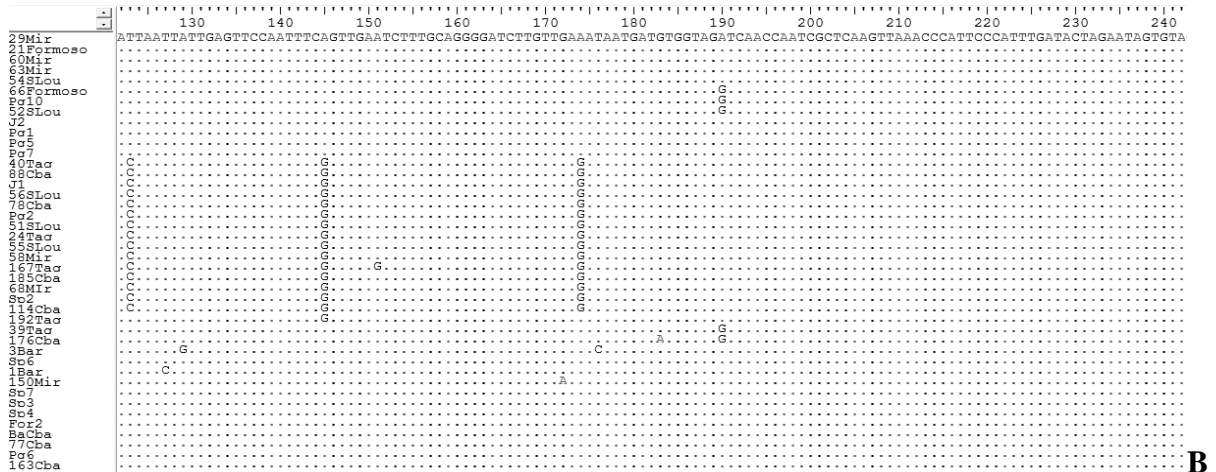
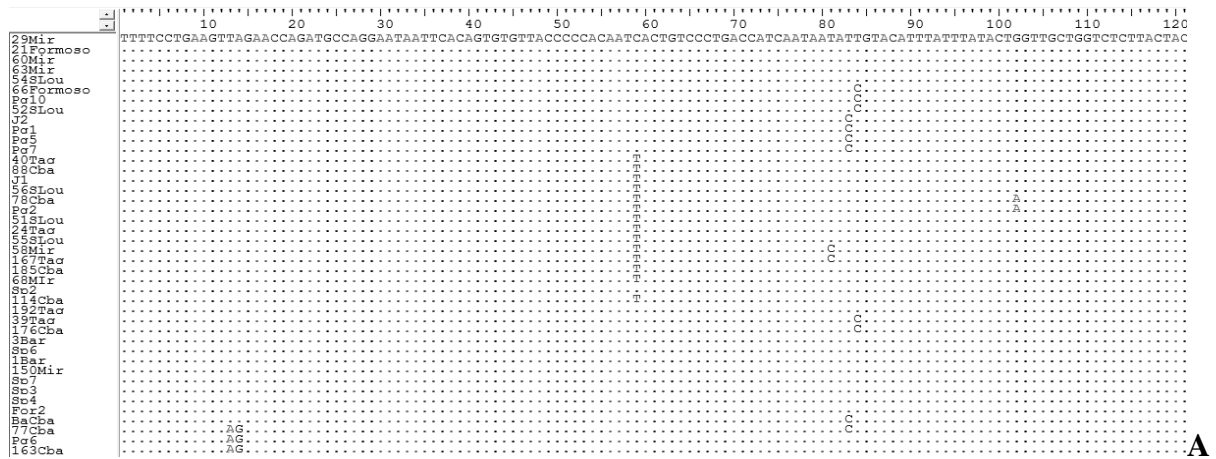
Alinhamento do fragmento do gene Citocromo b dos haplótipos sequenciados para *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense. São 710 pares de bases (pb) seqüenciais identificadas pela barra de graduada acima do alinhamento. Na lateral esquerda está a identificação dos haplótipos sendo que cada linha representa apenas um haplótipo. Os pontos representam bases idênticas e as mutadas estão descritas por suas iniciais. Em A. Sequencia de 1 a 126pb; B- continuação do sequenciamento de 127 a 251pb; C- continuação e 252 a 375pb; D- continuação de 376 a 501pb; E- de 502 a 625pb; F- de 626 a 710pb

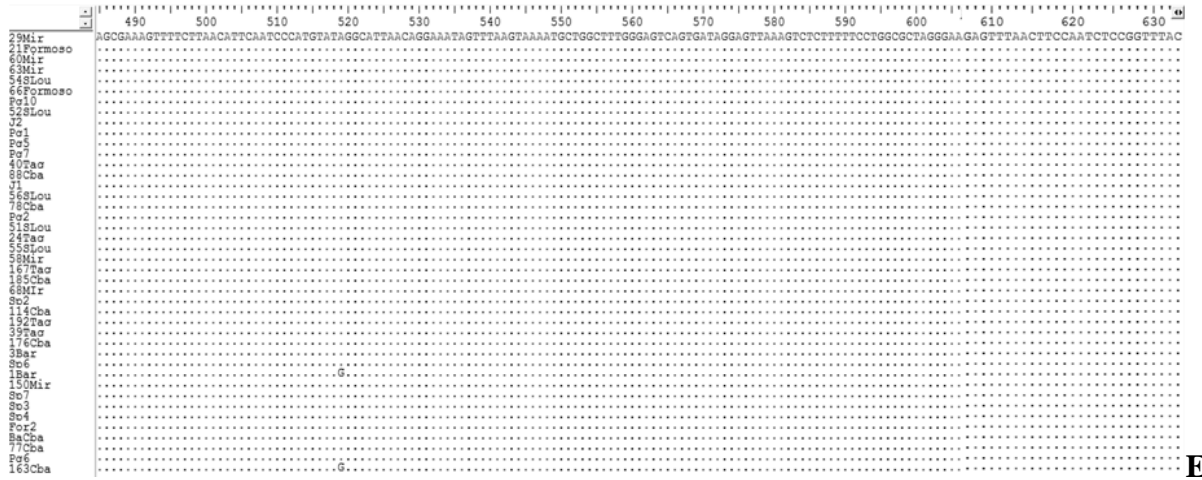
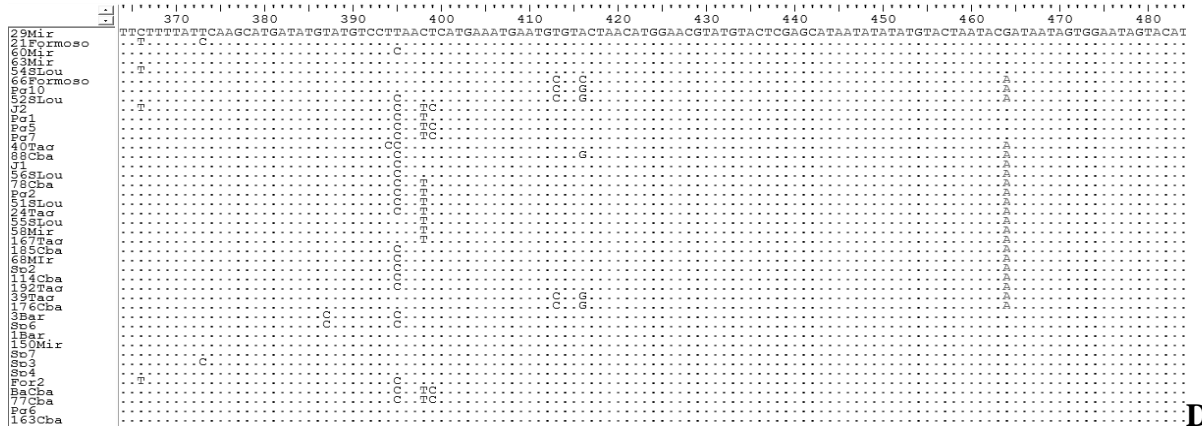




VIII.2 – ANEXO

Alinhamento do fragmento da região controle (D-loop) dos haplótipos sequenciados para *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense. São 633 pares de bases (pb) sequenciais identificadas pela barra de graduada acima do alinhamento. Na lateral esquerda está a identificação dos haplótipos sendo que cada linha representa apenas um haplótipo. Os pontos representam bases idênticas e as mutadas estão descritas por suas iniciais. Em A. Sequencia de 1 a 121pb; B- continuação do sequenciamento de 122 a 242pb; C- continuação e 243 a 363pb; D- continuação de 364 a 484pb; E- de 485 a 633pb.





VIII.3 – ANEXO

Alinhamento do fragmento do gene Citocromo b dos haplótipos sequenciados para *S.brasiliensis* do Pantanal Mato-grossense, da bacia do Uruguai e da bacia do Paraná. São 710 pares de bases (pb) sequenciais identificadas pela barra de graduada acima do alinhamento. Na lateral esquerda está a identificação dos haplótipos sendo que cada linha representa apenas um haplótipo. Os pontos representam bases idênticas e as mutadas estão descritas por suas iniciais. Em A. Sequencia de 1 a 123pb; B- continuação do sequenciamento de 124 a 248pb; C- continuação e 249 a 373pb; D- continuação de 374 a 498pb; E- de 499 a 710pb.

