

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

ANTONIO AUGUSTO ADAMI PIRES

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE PEIXES
DO GÊNERO *Zungaro* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) DE
DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS

São Carlos
2014

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE PEIXES
DO GÊNERO *Zungaro* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) DE
DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

ANTONIO AUGUSTO ADAMI PIRES

IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR E CARACTERIZAÇÃO DE PEIXES
DO GÊNERO *Zungaro* (SILURIFORMES: PIMELODIDAE) DE
DIFERENTES BACIAS HIDROGRÁFICAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Genética
Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade
Federal de São Carlos como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Genética e
Evolução.

São Carlos
2014

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

P667im Pires, Antonio Augusto Adami.
Identificação molecular e caracterização de peixes do gênero *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae) de diferentes bacias hidrográficas / Antonio Augusto Adami Pires. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
37 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Peixe. 2. Filogeografia. 3. Identificação molecular. 4. *Zungaro*. 5. Distribuição geográfica. I. Título.

CDD: 597 (20^a)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

Dissertação de Mestrado de

ANTONIO AUGUSTO ADAMI PIRES

Banca Examinadora

Profa. Dra. Patricia Domingues de Freitas



.....

Profa. Dra. Alexandra Sanches



.....

Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta



.....

Aos meus pais João Martinho Pires e Nicéia Penha Adami Pires por serem o alicerce forte em minha vida, e sempre acreditarem em mim.

Nun'Alvares - Mensagem

*Que aureola te cerca?
É a espada que, volteando,
Faz que o ar alto perca
Seu azul negro e brando.*

*Mas que espada é que, erguida,
Faz esse halo no céu?
É Excalibur, a ungida,
Que o Rei Arthur te deu.*

*Sperança consummada,
S. Portugal em ser,
Ergue a luz da tua espada
Para a estrada se ver!*

Fernando Pessoa.

Agradecimentos

“Os céus e a terra tomo hoje por testemunhas contra vós, de que tenho proposto a vida e a morte, a benção e a maldição; escolhe pois a vida, para que vivas, tu e tua descendência. (Deuteronômio 30:19).

À Minha querida Orientadora Profa. Dra. Patrícia Domingues Freitas, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo suporte e incentivo à pesquisa, nunca me identifiquei tanto com uma orientadora em toda à sua baianidade como ela.

Ao Prof. Dr. Pedro Galleti Jr, pelo suporte e incentivo à pesquisa e de poder trabalhar no Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) com uma linha de pesquisa tão importante que é a Genética da Conservação.

Ao meu Amigo, Colega de Trabalho, Tutor e Sacerdote de Pacha Mama Jorge Ramirez o qual me mostrou o caminho de todas as práticas laboratoriais e análises de bioinformática deste trabalho.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Departamento de Genética e Evolução (DGE) por ter me acolhido nesta agradável comunidade Acadêmica ao qual fazemos parte.

À CAPES (Cordenação de Aperfeiçoamento de ensino pessoal de Nível Superior), pelo suporte concedido através da Bolsa de Mestrado, pelo projeto ao qual estou inserido de Predadores Topo de Cadeia: Sisbiota.

Obrigado à Aldo Troy, Neusa Arenhart, Maurício Carrillo pela colaboração na obtenção dos tecidos e coleta de material biológico ao qual hoje faz parte do acervo do Banco Biológico do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) e que foi diretamente usado por mim neste trabalho, tanto tecidos quanto um indivíduo de Jaú do Rio Juruena que foi tombado na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Gostaria de agradecer à Organização, sem fins lucrativos o qual ajuda pesquisadores na área de conservação, “Idea Wild” e a empresa de *Softwares* voltados à bioinformática “Biomatters” por doarem a licença do *Software* “Geneious” para o LabBMC o qual foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

À Minha querida Psicóloga e Fada Madrinha Graziela Vanni por me ouvir em altas horas de problemas, dúvidas e sonhos, além de ajudar esta consciência à quem vos escreve a vencer todos os obstáculos.

Aos Meus Colegas de Trabalho: Carla Guinart Marques, Danielly Blanck, Adriana Takako, Camila Alves, Carolina Machado, Alline Braga, Aline Galindo, Andiara Silos, Karen Rodriguez, Rosane Santos, Karla Chávez, Ueslei Lopes, Bruno Saranholi, Fernanda Lima, Lucas Caldano, Rafael Oliveira, Leonardo Niero, André Silva, Carmen Ruiz, Paola Ayala, Alexandra Sanches, Regina Yabe, Michelle Gonçalves, Andréia Moraes, Mariana Correa, Tailise Souza, Beatris Sasamoto, Eliana Fisher, Josiani Riboli, Luisa Simbine, Paulo Andrade e Pedro Gallo. Todos o qual de alguma forma ou outra me ajudaram durante estes dois anos de convívio através de muitas lutas e risadas juntos.

À Família Bacóvis de Manaus, Sacerdotes o qual tão amigavelmente nos mostrou onde tinha um indivíduo de Jaú, coletado por uma população ribeirinha próximo ao Rio Solimões, indivíduo o que foi tombado na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Ao Meu Irmão João Dos Santos Justo Pires e Sua Família Itacy Miguel Pires, Daniel Isaque Miguel Pires e Ana Vitória Miguel Pires, família de Sacerdotes separados por Deus que em nenhum momento deixaram de orar, acreditar em mim.

À Minha Irmã Lívia Maria Adami Pires Oliveira e sua Família Rafael Saraiva Oliveira, Gael Pires Oliveira e Bernardo Pires Oliveira, pelo amor incentivo e pelos agradáveis momentos de churrascos nos feriados, conversas o qual tivemos aqui em São Carlos.

Aos Meus Pais João Martinho Pires e Nicéia Penha Adami Pires por investirem em mim, acreditarem e serem um alicerce forte em minha vida, pelas noites em branco que passaram por minha causa, pelos dias de alegria que passamos juntos e pelo eterno amor e aprendizado que carrego deles.

Ao meu cachorro o Shelly Berry (Sheldom), que é um amigão e me faz companhia aqui em São Carlos.

Maria Nize Queiroz Adami (*in memoriam*)

SUMÁRIO

RESUMO.....	1
ABSTRACT.....	2
1.INTRODUÇÃO.....	3
2.OBJETIVO.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	11
3.1.Coleta do Material e Localidades.....	11
3.2. Extração de DNA.....	14
3.3. Extração de DNA da amostra fixada em formaldeído.....	14
3.4. Amplificação de DNA via PCR.....	15
3.4.1. <i>Reação com Taq Platinum</i> [®]	15
3.4.2. <i>Reação com Go Taq</i> [®]	15
3.5. Programação do Termociclador.....	16
3.6. Sequências dos Primers para amplificação dos genes.....	16
3.7. Amplificação da amostra extraída de tecido fixado em formaldeído.....	16
3.8. Purificação.....	17
3.9.Sequenciamento.....	17
3.10.Análises das Sequências.....	17
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 Citocromo Oxidase I (COI).....	21
4.2 Região Controle do Genoma Mitocondrial (D-loop).....	25
4.3 Citocromo Oxidase B (Cytb).....	30
5.CONCLUSÃO.....	31
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

RESUMO

O gênero *Zungaro*, Bleeker, 1858 (Siluriformes: Pimelodidae), pertence a um grupo de peixes popularmente denominados jaús, composto por duas espécies válidas: *Zungaro jahu* que ocorre na bacia dos rios Paraná-Paraguai e *Zungaro zungaro* encontrada na bacia dos rios Amazonas e Orinoco. Este gênero é conhecido por compreender um dos maiores bagres da América do Sul. Em especial na região do Mato-Grosso, no rio Juruena. Estas espécies são conhecidas por serem os maiores bagres da América do Sul. No rio Juruena (MT), indivíduos de jaús adultos tem sido capturados por pescadores com um tamanho menor do que o descrito na literatura e o permitido para pesca, levantando incertezas sobre a classificação desta espécie nesta região. Neste trabalho foram analisadas populações do Juruena e os dados moleculares obtidos foram comparados com os de outras populações de jaús para saber se tratam da mesma espécie. Amostras de peixes dos rios Juruena, Amazonas, Solimões, Madeira, Xingu, Meta, Miranda, Taquari e Cuiabá foram obtidas e armazenadas no acervo do Banco de Tecidos do laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC). Após isolar o DNA segundo o protocolo de Sambrook, fragmentos mitocondriais dos genes Citocromo Oxidase I (COI) e Citocromo b (Cytb) e da região controle D-Loop foram amplificados via PCR. Após o sequenciamento e edição das sequências, os resultados obtidos foram comparados com sequências disponíveis nas bases de dados BOLD e GenBank. Árvores filogenéticas baseadas em diferentes algoritmos foram construídas. As espécies das bacias Amazonas-Orinoco (*Z. zungaro*) e Paraná-Paraguai (*Z. jahu*) apresentaram uma distância genética considerável, evidenciando estruturação populacional. Indivíduos do rio Juruena apresentaram-se diferenciados das demais espécies válidas para o gênero com valor de distância genética segundo o modelo K2p de 2.4% (COI) e 5%(D-Loop). Estes resultados apontam a evidência da existência de no mínimo três espécies para o Gênero: *Z. zungaro*, *Z. jahu* e uma possível nova espécie do rio Juruena. Espécimes do rio Xingu também demonstraram alta distância genética com relação às demais populações analisadas, necessitando uma investigação mais profunda.

Palavras Chave: *Zungaro*, Rio Juruena, Identificação Molecular, Filogenia

ABSTRACT

The Genus *Zungaro*, Bleeker, 1858 (Siluriformes: Pimelodidae), comprise a group called Jaú. This group is divided in two species: *Zungaro jahu* located in Paraná-Paraguai basins and *Zungaro zungaro* located in Amazonas-Orinoco basins. Both species are known because they are the biggest catfish in South America. In Juruena River, smaller catfishes are found by local fishermen and because of that it's very hard to classify these species. During this work Juruena population was genetically analyzed and these molecular datum were compared with other population to know if they are the same specie or not. Samples of fish came from Juruena, Amazonas, Solimões, Madeira, Xingu, Meta, Miranda, Taquari e Cuiabá were collected and kept in the heap of tissue bank in the Molecular Biodiversity and Conservation Laboratory (LabBMC). After isolating the DNA according to Sambrook protocol, mitochondrial sequences of cytochrome oxidase I (COI), cytochrome b (Cytb) and D-Loop were amplified by PCR. After the sequencing and edition, the results were compared to the databases BOLD and GenBank. Phylogenetic trees based on different algorithms were built. The species of Amazonas-Orinoco basins (*Z. zungaro*) and Paraná-Paraguai basins (*Z. jahu*) showed a considerable genetic distance highlighting a population structuring. Individual from Juruena River were different from the others following the model K2p 2.4% (COI) and 5% (D-Loop). The results showing an evidence of three different species: *Z. zungaro*, *Z. jahu* and possible new species in the Juruena River. Besides, specimens from Xingu River demonstrated a high genetic distance from the others, being necessary further analyses.

Key Words: *Zungaro*, Juruena River, Molecular Identification, Phylogeny

1. INTRODUÇÃO

Os peixes constituem o grupo de maior biodiversidade dentre os vertebrados. Atualmente estima-se que existam 27.977 espécies válidas, que habitam oceanos, mares, lagos, e também ambientes subterrâneos. A região Neotropical abriga uma das maiores ictiofaunas continentais, com cerca de 5000 espécies (CARILLO-AVILA, 2009; CUNHA, 2008; NELSON, 2006).

A família Pimelodidae, conhecida internacionalmente como “catfishes”, devido à presença de barbilhões similares aos de gatos, é composta por peixes de água-doce, amplamente distribuídos, na América do Sul, México e Panamá. Estes peixes são endêmicos das regiões neotropicais, apresentando maior diversidade nas bacias Amazônicas, Paraná e Orinoco e nos grandes rios das Guianas. Fósseis de pimelodídeos são mais comumente encontrados em rochas datadas do período Mioceno, encontrando-se também alguns poucos registros do Oligoceno e Eoceno (LUNDBERG; LITTMANN, 2003).

Este grupo é composto por espécies sem escamas, com largos ossículos na linha lateral e narinas são bem separadas. Possuem três pares de barbilhões, sendo que as nadadeiras peitorais e dorsais são ausentes. A nadadeira adiposa é bem desenvolvida e a nadadeira caudal é emarginada e bifurcada. As membranas branquiais são livres, com margens orbitais também livres. (LUNDBERG; LITTMANN, 2003; NELSON, 2006; PINNA, 1998).

Os pimelodídeos são bentônicos, carnívoros ou onívoros, consumindo um grande número de pequenos peixes e invertebrados. Muitos são ativos predadores e nadadores, apesar de alguns serem mais sedentários e apresentarem comportamento de predador de espreita. Eles possuem coloração diversa com pigmento padrão, sendo que alguns apresentam um brilho metálico prateado, dourado, em azul ou em verde.

Não há dimorfismo sexual neste grupo e a fertilização é externa sem cuidados parentais (LUNDBERG; LITTMANN, 2003). De acordo com Lundberg et al. (2011), existem cerca de 27 gêneros descritos e 57 espécies reconhecidas como um grupo monofilético com base em sinapomorfias morfológicas.

O gênero *Zungaro*, Bleeker, 1858 (Siluriformes: Pimelodidae), engloba um grupo de peixes popularmente conhecidos no Brasil como jaús, sendo que estes constituem alguns dos maiores peixes de água doce da América do Sul. Existem duas espécies atualmente válidas: *Zungaro jahu* (IHERING, 1898) localidade tipo: São Paulo (Brasil), que ocorre na bacia dos rios Paraná-Paraguai e se distribui na Argentina, Bolívia, Brasil e Paraguai, podendo atingir comprimento máximo de 140 cm; e *Zungaro zungaro* (HUMBOLDT, 1821) localidade tipo: Tomependa, Rio Marañon (Peru), encontrada na bacia dos rios Amazonas e Orinoco, de ocorrência na Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru e Venezuela, podendo atingir um comprimento máximo de 140 cm e peso de 150kg (FERRARIS JUNIOR, 2007; LUNDBERG; LITTMANN, 2003).

Os jaús são bagres piscívoros de corpo robusto, cabeça quase triangular e focinho transversalmente truncado. Apresentam corpo liso com coloração que varia do pardo-esverdeado claro ao escuro no dorso com o ventre branco. A maxila superior é projetada sobre a inferior, os dentes são viliformes e os barbilhões maxilares são curtos, enquanto os mentonianos alcançam a base da nadadeira peitoral. Possuem diversas pintas, com as margens das nadadeiras, especialmente a caudal, com listras estreitas transversais e sinuosas (MOJICA et al., 2002).

Os peixes deste gênero costumam viver em poços profundos de ambientes lóticos e realizam migrações reprodutivas, sendo o período de desova entre os meses de dezembro e fevereiro. Alcançam a maturidade por volta dos quatro anos e meio de

vida, sendo esta considerada uma maturidade tardia. São peixes que possuem uma taxa de crescimento lenta, entretanto, atingem grandes comprimentos e conseqüentemente alcançam alta longevidade (AGOSTINHO et al., 2003).

O jaú é um predador topo de cadeia nos sistemas hidrográficos, no entanto, tem sofrido um declínio significativo em suas populações devido ao número de distúrbios nos habitats, como por exemplo, fragmentação de florestas nos percursos dos rios, acúmulo de sujeira e poluição das águas, (eutrofização, assoreamento), introdução de espécies exóticas também topo de cadeia, as quais competem por alimento, construção de represas e conseqüente interrupção da migração reprodutiva, além da pesca indiscriminada. (BONI, 2008).

Apesar de não estar *criticamente em perigo* ou em *perigo*, de acordo com a Lista Vermelha de Animais Ameaçados da IUCN (International Union of Conservation), este grupo corre risco de extinção a médio prazo por causa do declínio populacional e da fragmentação de sua área de ocupação.

Carillo-Avila et al. (2009) ressaltam que estas espécies possuem um grande valor ecológico e econômico pois tem relevante importância para a pesca esportiva e de subsistência, por isso é essencial delimitar suas unidades populacionais e genéticas para contribuir com a conservação desta espécie a partir do estabelecimento de planos de manejo eficientes.

De acordo com Frankhan et al., (2008), as ações conservacionistas devem ser planejadas em diversos níveis, considerando análises de genes, espécies, e ecossistemas. Em relação à conservação da biodiversidade referente às espécies, esta só será mais adequadamente planejada, quando as relações taxonômicas ficarem esclarecidas.

Segundo dados disponíveis em Carillo-Avila (2009), a classificação taxonômica do jaú é apresentada da seguinte forma:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Gênero: Zungaro

Espécies: *Zungaro jahu*, *Zungaro zungaro*

Na literatura ainda não existe clareza sobre a classificação e a distribuição de cada uma das espécies de jaús e informações básicas sobre a biologia e história natural desses peixes ainda são escassas. Até a década de 90, por exemplo, os indivíduos de jaú eram denominados como sendo a espécie *Paulicea luetkeni* (até hoje referida como sinônima à *Zungaro*) (AGOSTINHO et al., 2003; BONI, 2008).

Desta forma, estudos que visem a caracterização das espécies deste gênero podem contribuir para melhor entendimento deste importante grupo de peixes predadores de topo e conseqüentemente para sua conservação na natureza.

Estudar as populações de jaú é essencial para compreender a estrutura genética destas populações e as diferenças entre estas a nível intra e interespecífico. Neste contexto, os marcadores moleculares têm se mostrado como ferramentas úteis para evidenciação de estruturação populacional e discriminação de espécies, incluindo a caracterização da diversidade oculta e a confirmação de espécies crípticas (BIGNOTTO et al., 2009; CARILLA-AVILA, 2009; DE FREITAS, 2003; PFENNIGER; POSADA, 2009; WARD et al., 2005).

Dentre a ampla gama de marcadores que pode ser utilizada nesta abordagem estão os genes do genoma mitocondrial, incluindo o Citocromo C Oxidase Subunidade I (COI), Citocromo B (CytB) e a região controle D-loop.

Estes marcadores vêm sendo empregados com muito êxito em estudos populacionais e de discriminação de espécies, permitindo analisar as relações evolutivas dentro de grupos de organismos diversos e descrever os níveis de diversidade intra e interpopulacionais, assim como entre espécies (BIGNOTTO et al., 2009; CARILLA-AVILA, 2009; DE FREITAS, 2003; PFENNIGER; POSADA, 2009; WARD et al., 2005).

O DNA mitocondrial (DNAmit) possui características únicas que o tornam apropriado para estudos taxonômicos, evolutivos e também populacionais. Ele possui uma frequência alta de mutação (5 a 10 vezes maior que o DNA nuclear), não sofre recombinação e tem transmissão unidirecional, por via materna, ao longo de gerações. Tais características facilitam o estudo da estrutura genética dentro de uma mesma espécie e entre espécies relacionadas (AVISE, 2004).

Hebert et al. (2003) propuseram uma metodologia, que utiliza o DNA mitocondrial, mais especificamente o gene COI, para gerar assinaturas genômicas espécie-específicas que permitem a descrição e identificação de espécies através de um conjunto de análises compreendidas dentro da abordagem conhecida como código de barras de DNA ou DNA *Barcoding*. Esta metodologia tem permitido a descrição e caracterização de muitas espécies, incluindo aquelas de difícil discriminação.

Além do genoma mitocondrial, análises utilizando genes nucleares também podem ser eficientes para esta abordagem. Carillo-Avila (2009) utilizou o gene nuclear Rag (Gene ativador de recombinação) e o gene que codifica a proteína S7, além do gene mitocondrial citocromo b, para análises populacionais no gênero

Zungaro. Neste estudo, o autor relatou a existência de estruturação em populações do Pantanal e Amazonas, corroborando a diferenciação genética entre estas. Foram ainda encontradas populações que compartilham um haplótipo central, indicando uma coesão genética no gênero, na qual populações do Amazonas se expandiram originando as populações do Pantanal, derivadas daquelas.

O DNA *Barcoding* pode ser utilizado para identificação de espécies de peixes a partir de amostras de tecidos obtidas de indivíduos inteiros, filés, barbatanas, alevinos, larvas, ovos ou qualquer tecido disponível que esteja em condições razoáveis de preservação. Mesmo peixes cozidos ou processados podem fornecer *barcodes* (BECKER et al., 2011). Tratamentos de alta pressão e temperatura ocasionam a degradação do DNA de peixes enlatados, nestes casos apenas sequências mais curtas de DNA podem ser amplificadas, gerando os chamados *minibarcodes*. Dada sua aplicabilidade, o *Barcoding* se tornou ferramenta de identificação de peixes e de mercadorias pelo *US Food and Drug Administration*, substituindo a técnica de focalização isoelétrica de proteínas (BECKER et al., 2011).

Os primeiros resultados bem-sucedidos de DNA *Barcoding* para peixes publicados por Ward *et al.* (2005) incentivaram a criação do “Fish Barcode of Life”, o FISH-BOL (<http://www.fishbol.org/>), que almeja reunir perfis *barcodes* da região 5’ do gene COI para todas as espécies de peixe do mundo. Nos últimos sete anos, o FISH-BOL compilou *barcodes* de mais de 10 mil espécies, além de informações sobre os *vouchers*, distribuição das espécies, nomenclatura, taxonomia e referências bibliográficas, consistindo assim em uma base de dados importante que complementa outros bancos genômicos.

De forma geral, esses trabalhos apresentaram altas taxas de sucesso para identificação de peixes dulcícolas utilizando a região 5’ do gene COI. Entretanto, os

resultados obtidos indicam que cerca de 10% das espécies de peixes não podem ser separadas entre si através do DNA *Barcoding* (APRIL et al., 2010; PEREIRA et al., 2013). Em Characiformes, o DNA *Barcoding* não funcionou para 4,1% das espécies que já foram amostradas (BECKER et al., 2011). Nesses casos, a delimitação de tais espécies deve envolver o uso de outros marcadores moleculares para uma análise mais acurada dos indivíduos que não podem ser separados pela análise do COI (WARD et al., 2009).

2. OBJETIVOS

Considerando a problemática taxonômica do gênero *Zungaro* e relatos de pescadores da região do Mato-Grosso, que têm apontado para existência de diferenças nos tamanhos dos espécimes de jaús coletados no rio Juruena (afluente do rio Tapajós, pertencente a bacia Amazônica), nos quais indivíduos adultos apresentam tamanho menor que o descrito na literatura e permitido para pesca pelos órgãos de fiscalização locais, o presente trabalho teve como principal objetivo testar a seguinte hipótese de trabalho:

Os jaús do rio Juruena constituem uma espécie diferenciada das duas espécies de jaús reconhecidas e atualmente válidas para o gênero: *Zungaro zungaro* e *Zungaro jahu*.

Para isso foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

2.1. Amplificar fragmentos dos genes COI e CytB e da região controle do genoma mitocondrial D-Loop em indivíduos coletados no rio Juruena e em diferentes rios das bacias do Amazonas-Orinoco e Paraná-Paraguai, onde ocorrem as espécies *Z. zungaro* e *Z. jahu*.

2.2. Estabelecer os níveis de divergência genética e construir redes de haplótipos e árvores genéticas para as diferentes populações amostradas.

2.3. Comparar os dados obtidos, visando definir o status taxonômico das amostras estudadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Coleta do Material e Localidades

Amostras de tecido biológico de indivíduos de jaú do rio Juruena (Município de Contriguaçu, MT, Brasil) foram retiradas da nadadeira e armazenadas em tubos de 1,5ml com álcool 70%, sendo mantidas em freezer à -20°C no Laboratório de Biologia Molecular e Conservação (LabBMC) do Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos (DGE-UFSCar). Estas amostras foram cedidas pela Dra. Neusa Arenhart, da Secretaria de Estado e Meio Ambientes do estado do Mato-Grosso, por intermédio do Prof. Dr. Waldo Troy do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Mato-Grosso (Tangará da Serra, MT, Brasil). Pequenos pedaços de nadadeiras deste exemplar foram posteriormente armazenados para as análises moleculares. Um indivíduo adulto coletado no rio Juruena (município de Juína, MT, Brasil) foi fixado em formol e mantido em álcool 70%, para ser utilizado como *voucher*, sendo tombado na Universidade Estadual de Londrina (UEL) (Figura 1).

Um indivíduo de jaú do rio Solimões (Bacia Amazônica-Orinoco) (figura 2), coletado por pescadores da região, foi congelado e transportado para o LabBMC com o consentimento do Ministério do Meio Ambiente (licença nº 37922-1). Este indivíduo também teve um pedaço da nadadeira amostrada para as análises moleculares e posteriormente foi fixado em formol para também ser utilizado como *voucher*, o qual foi tombado na Universidade Estadual de Londrina (UEL).

A identificação taxonômica dos espécimes foi realizada pelo Prof. Dr. Julio César Garavello do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos. A caracterização baseada no catálogo de Carl Ferraris (2007)

indicou tratar-se do jaú do médio Amazonas, *Platystoma luetkeni* sinônimo de *Zungaro zungaro* (HUMBOLT, 1821).

Figura 1: *Voucher* do indivíduo de Jaú coletado no rio Juruena, (município de Juína, MT, Brasil) visto dorsalmente (a) e lateralmente (b).

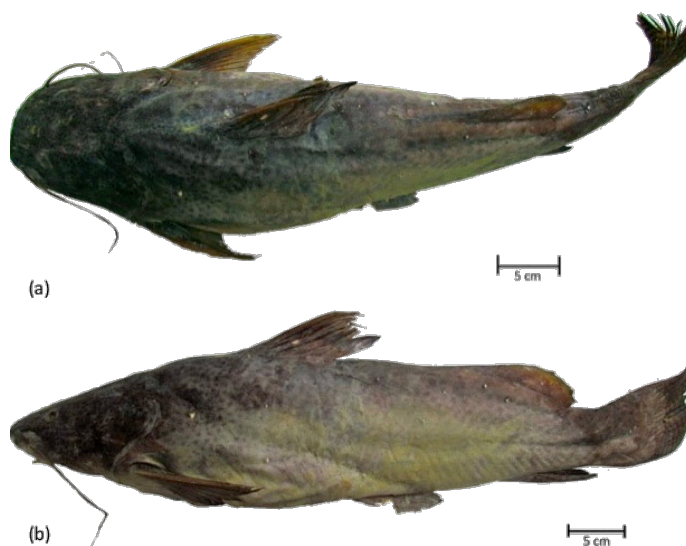
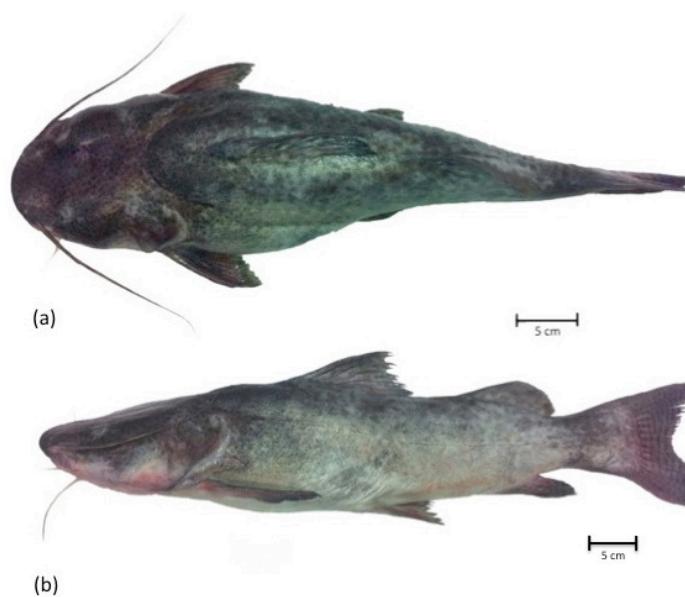
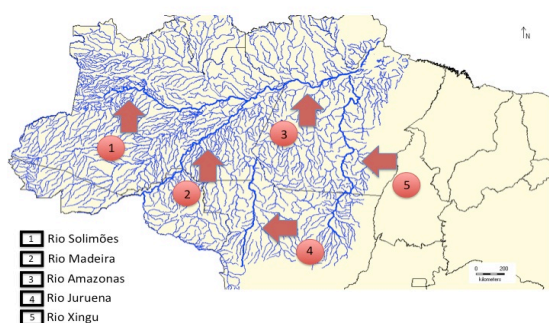


Figura 2: Visão dorsal (a) e lateral (b) do exemplar de Jaú do médio Amazonas, coletado no rio Solimões. Classificado como *Platystoma luetkeni*, sinônimo de *Zungaro zungaro*

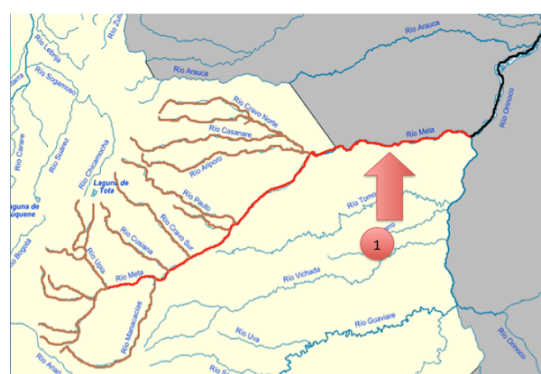


Além das amostras coletadas no presente trabalho, outras amostras mantidas no acervo do banco de tecidos do LabBMC, previamente coletadas nos rios Meta (5), Amazonas (2), Madeira (3), Xingu (1) Iquitos (1) e Juruena (11) (Bacias Amazônicas e Orinoco). Miranda (2), Taquarí (1) e Cuiabá (1) (bacias Paraná e Paraguai) também foram analisadas. Um mapa ilustrando as localidades amostradas no presente trabalho pode ser visualizado na figura 3.

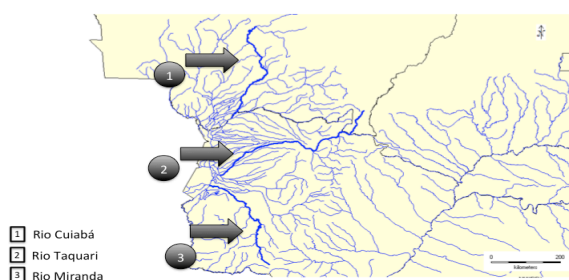
Figura 3: Mapas parciais ilustrando as regiões hidrográficas onde foram amostrados os exemplares de jaús estudados no presente trabalho e seus respectivos rios: (a) Bacia Amazônica (b) Bacia do Rio Orinoco, Rio Meta; (c) Bacia do Paraná-Paraguai



(a)



(b)



(c)

3.2. Extração de DNA

A extração do DNA foi realizada segundo protocolo de fenol/clorofórmio descrito por Sambrook et al. (1989). Aproximadamente 100mg de tecidos foi transferido para tubos de 1,5ml contendo 600 μ l de solução de digestão (Tris-HCl 50mM; NaCl 100mM; EDTA 6,3mM pH 8,0). Depois foram adicionados ao tubo 30 μ l de SDS 10% e 12 μ l de Proteinase K 20mg/ml. Tais tubos foram agitados em vortex por 15 segundos e em seguida a solução foi levada ao termo-bloco na temperatura de 55°C durante 12 horas (*overnight*). Após este tempo foi colocado um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) igual ao da solução homogeneizada. Em seguida o material foi centrifugado por 14000 rpm durante 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e posteriormente foram acrescentados NaCl 1M e dois volumes de etanol absoluto gelado para a precipitação do DNA. O material foi centrifugado à 14000 rpm e o sobrenadante foi descartado. O *pellet* foi lavado com etanol 70% e em seguida foi centrifugado novamente a 14.000rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi deixado para secar na estufa a 37°C. Ao final, o DNA foi ressuspendido em TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM pH 8,0).

A quantificação e verificação da qualidade do DNA foram feitas em eletroforese em gel de agarose 1% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

3.3. Extração de DNA da Amostra fixada em formaldeído

A extração do tecido fixado em formol foi feita seguindo protocolo descrito por Shrivastava et al. (2012). Primeiramente cerca de 100mg de tecido fixado em formol foi retirado da nadadeira e mantido em tampão TE (500mM Tris PH 9.0; 20mM EDTA; 10 mM NaCl) à 37°C por 24 horas. Posteriormente, esse material foi dilacerado com o auxílio de pinças, tesoura e estiletes. Foram adicionados 50µl de SDS 20%, 0,5% de Triton x 100, 15µl de Ditioneitol (8mg/ml) e 25 µl de Proteinase k 20mg/ml e o material foi incubado à 55°C em termo-bloco. Após 24h foram adicionados 25µl de SDS 20% e 25µl de Proteinase k 20mg/ml. O material permaneceu incubado em termo-bloco à 55°C por 48h. Após a digestão do material, foi utilizado o Kit de extração com coluna da Quiagen DNeasy[®], seguindo-se instruções do fabricante.

3.4. Amplificação de DNA via PCR

Foram feitos dois tipos de PCR: uma utilizando Taq Platinum (Life technologies[®]) e outra utilizando o mix GoTaq da Promega[®]. A seguir encontra-se a descrição das respectivas reações.

3.4.1. Reação com Taq Platinum[®]

As reações foram feitas para um volume final de 25µl contendo de 10 a 50ng de DNA, 100µM de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Tampão 10x, 0,2µM de cada primer, 1,5mM de MgCl₂ e 1,5U da enzima Taq Polimerase.

3.4.2. Reação com Go Taq®

As reações foram feitas para um volume final de 25µl contendo de 10 a 50ng de DNA, 12,5µl de GoTaq 0,2µM de cada primer, 1,5mM.

3.5. Programação do Termociclador

As reações foram programadas em termociclador com desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos, seguida posteriormente por 35 ciclos com desnaturação de 94°C por 30 segundos, temperatura de hibridização entre 51-56°C por 45 segundos e temperatura de extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final adicionou-se um minuto a 72°C.

3.6. Sequências dos *Primers* para Amplificação dos Genes

As reações de PCR foram realizadas para amplificação dos genes CytB, COI e D-Loop, utilizando-se seus respectivos pares de *primers* flanqueadores (tabela 1). Após a amplificação do DNA foi feito um gel de agarose 1% e corrida eletroforética para averiguar as sequências amplificadas.

Tabela 1: Sequências dos *primers* para amplificação dos genes mitocondriais

GENE	<i>Primer</i>
COI	COIF: ACAAACCACAAAGAYATYGG
	COIR: TCWGGGTGACCAAARAATCA
Cyt B	CytbL: AAYATCTCYGCATGATGAAA
	CytbH: TCTTCGGATTACAAGACCG
D-loop	DLoopF: ATAAAGCATCGGTCTTGTA
	DLoopR: AGAACAAAAGATCATTGCTGGTCGGG

3.7. Amplificação da amostra extraída de tecido fixado em formaldeído

A amplificação da amostra fixada em formol foi realizada seguindo ciclo proposto por Palero, et al. (2010), o qual amplificou o gene mitocondrial Citocromo Oxidase I de caranguejos fixados em formol. O programa incluiu 4 minutos para a desnaturação inicial a 94°C, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, temperatura de hibridização de 45°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 4 minutos. Após a amplificação do DNA foi feito um gel de agarose 1% e corrida eletroforética para averiguar as sequências amplificadas.

3.8. Purificação

Após a confirmação da amplificação das amostras foi adicionado um volume igual ao restante do produto de amplificação (cerca de 23µl) de solução PEG, sendo o material incubado em termo-bloco à 37°C por 20 minutos. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 15 minutos à velocidade máxima. Realizada a centrifugação, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente foram adicionados a cada tudo 125µl de etanol gelado a 80%. O material foi centrifugado novamente por 15 minutos à velocidade máxima. O etanol foi descartado e o pellet foi mantido em estufa à 37°C. Por fim, o produto purificado foi ressuspendido em 15 à 20µl de Água Milliq.

3.9. Sequenciamento

Os produtos purificados foram enviados para sequenciamento na empresa MacroGen[®] Inc (www.macrogen.com).

3.10. Análises das Sequências

As sequências foram submetidas à BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (ALTSCHUL et al., 1997) no GenBank do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e alinhamentos na base de dados do BOLD; *Barcode of Life Data Systems-The Identification System (IDS)*.

As sequências obtidas foram editadas no programa Geneious (Biomatters®) (KEARSE et al., 2012) e o alinhamento foi feito utilizando-se o algoritmo de alinhamento ClustalW (LARKIN et al., 2007). As análises de distância foram feitas baseando-se na média de substituições por sítio entre as sequências, usando-se o programa MEGA (KUMAR et al., 2004). As árvores foram construídas no programa MEGA utilizando-se os métodos de distância (*Neighbor-joining*), Máxima Parcimônia e Máxima Verossimilhança com 1000 réplicas de *bootstrap*. Árvores segundo a probabilidade bayesiana foram realizadas no programa Beast, neste mesmo software foi feita a calibração através de mutações por milhão de anos para as sequências da região controle D-Loop. (HELED; DRUMMOND, 2010).

O programa DnaSP (LIBRADO; ROZAS, 2009) foi utilizado para determinar os haplótipos. Também Foi feita uma rede de haplótipos utilizando o programa Network (BANDEL et al., 1999).

Para a análise de *Barcode* foram considerados os seguintes critérios: baixa distância intraespecífica, monofilia fortemente sustentada e alta distância interespecífica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram obtidas sequências para os genes Citocromo Oxidase (COI), Citocromo B (CytB) e região controle D-Loop de todas as amostras analisadas no presente trabalho (tabela 2) e os dados de divergência encontrados estão apresentados na tabela 3. A análise dos dados obtidos evidenciou redes haplotípicas e árvores genéticas que evidenciam diferenciação da espécie do rio Juruena em relação às demais espécies analisadas. Os resultados encontram-se apresentados nas figuras de 4 a 12.

Segundo o trabalho de Boni et al., (2011), a taxonomia do grupo que compreende os jaús está ainda pouco resolvida, com muitas incertezas e muitas espécies sinonímias à *Zungaro*. Segundo Lundberg e Littmann, (2003) há duas espécies morfologicamente distintas atualmente válidas, sendo estas: a espécie *Zungaro zungaro* de ocorrência na bacia Amazônica-Orinoco e a espécie *Zungaro jahu* de ocorrência na bacia do Paraná-Paraguai. No entanto, Graça e Pavanelli (2007), realizando análises morfológicas, sugerem à existência de uma única espécie para o grupo dos jaús.

Boni et al., (2011), através de análises moleculares de sequências de DNA mitocondrial corroboraram, no entanto, os estudos de Lundberg e Littmann, suportando a ideia da existência de dois distintos táxons. Para Lundberg et al., (2011), tais dados demonstram a necessidade de uma ampla revisão do status taxonômico deste gênero, em especial para *Z. jahu* e a espécie nominal de *Zungaropsis multiculatus* de ocorrência no rio Xingu.

Tabela 2: Amostras e suas respectivas localidades, amplificadas com genes COI, CytB e Região Controle D-loop.

Gene	Pb	Amostra	Localidade	
COI	600	1M	Rio Meta	
	600	2M	Rio Meta	
	600	4M	Rio Meta	
	600	5M	Rio Meta	
	600	6M	Rio Meta	
	600	16Am	Rio Amazonas	
	600	18am	Rio Amazonas	
	600	1C	Rio Madeira	
	600	1Q	Rio Madeira	
	600	1J	Rio Juruena	
	600	2J	Rio Juruena	
	600	3J	Rio Juruena	
	600	4J	Rio Juruena	
	600	6J	Rio Juruena	
	600	7J	Rio Juruena	
	600	8J	Rio Juruena	
	600	9J	Rio Juruena	
	600	2Mir	Rio Miranda	
	600	14Cui	Rio Cuiabá	
	600	22Cui	Rio Cuiabá	
	D-loop	600	VouchSolim	Rio Solimões
		980	1M	Rio Meta
980		2M	Rio Meta	
980		4M	Rio Meta	
980		6M	Rio Meta	
980		18am	Rio Amazonas	
980		1c	Rio Madeira	
980		5c	Rio Madeira	
980		1J	Rio Juruena	
980		3J	Rio Juruena	
980		8J	Rio Juruena	
980		9J	Rio Juruena	
980		11J	Rio Juruena	
980		15J	Rio Juruena	
980		11Mir	Rio Miranda	
980		9taq	Rio Taquari	
980		22Cui	Rio Cuiabá	
980		Iquitos2	Rio Iquitos	
980		VoushSolimões	Rio Solimões	
980		Xingu	Rio Xingu	
Cyt B		1100	1M	Rio Meta
		1100	2M	Rio Meta
	1100	4M	Rio Meta	
	1100	5M	Rio Meta	
	1100	1C	Madeira	
	1100	3J	Rio Juruena	
	1100	7J	Rio Juruena	
	1100	8J	Rio Juruena	
	1100	10J	Rio Juruena	

Tabela 3: Distância genética entre populações de Jaús segundo o modelo de substituição de Kimura2-Parâmetro calculadas para os genes mitocondriais: Citocromo Oxidase I (COI), Citocromo B (CytB) e D-Loop.

COI		
Espécie	Espécie	Distância (%)
<i>Z. zungaro</i>	<i>Z. Jahu</i>	0,4
<i>Z. zungaro</i>	<i>Z. sp (Juruena)</i>	2,6
<i>Z. sp (Juruena)</i>	<i>Z. jahu</i>	2,6

Cyt B		
Espécie	Espécie	Distância (%)
<i>Z. zungaro</i>	<i>Z. sp. (Juruena)</i>	0,3

D-Loop		
Espécie	Espécie	Distância (%)
<i>Z. zungaro</i>	<i>Z. jahu</i>	2,5
<i>Z. zungaro</i>	<i>Z. sp (Juruena)</i>	6,6
<i>Z.sp (Juruena)</i>	<i>Z. jahu</i>	6,0

4.1 Citocromo Oxidase I (COI)

Nos dados observados no presente trabalho, as distâncias genéticas encontradas para as duas espécies de jaús aceitas taxonomicamente como distintas, evidenciaram baixa divergência interespecífica para o gene COI, com valor de apenas 0,4%, o que é considerado insuficiente para separar espécies segundo a abordagem de DNA *Barcode*.

Os valores de distância interespecífica observados para as populações de jaús do Juruena e as espécies *Z. jahu* e *Z. zungaro* com o gene COI, no entanto, foram iguais à 2,6% em ambos os casos, evidenciando divergência significativa. Estes dados sugerem que a divergência entre as espécies *Z. jahu* e *Z. zungaro* é mais recente quando comparada à divergência destas com a espécie de *Zungaro* existente no rio Juruena.

Baixos valores de divergência interespecíficos podem sugerir que provavelmente, não houve um acúmulo de mutações suficiente em um período de tempo considerado, capaz de permitir a diferenciação entre as espécies após sua divergência. Entretanto, apesar de altos valores de distância não terem sido observados entre as duas espécies válidas *Z. jahu* e *Z. zungaro*, o não compartilhamento de haplótipos sugere a diferenciação entre ambas. Segundo

Pereira (2013), nestes casos deve-se buscar a descrição de caracteres diagnósticos para tentar diferenciar tais espécies.

De acordo com Gomes, et al. (2011), estudos dessas espécies com o gene citocromo oxidase I, também evidenciaram variabilidade genética interespecífica baixa. Esta, porém, foi suficiente para separar ambas as espécies. Portanto há necessidade de reavaliação para a espécie *Z. zungaro* do rio Tocantins, uma vez que segundo Carvalho e Albert, (2011), esta região tem sido relatada como área que apresenta taxa de endemismo elevado.

A distância entre as populações de jaús do rio Juruena e as duas espécies válidas para o gênero considerando o gene COI, ao contrário, evidenciou um valor de divergência interespecífico igual a 2,6%, o qual é representativo para diferenciação genética de espécies, segundo os critérios utilizados na abordagem de *DNA Barcode*.

Um valor baixo da máxima distância intraespecífica foi observado (figura 6), isto provavelmente devido ao fato do número amostral não ser grande o suficiente para evidenciar uma maior diferenciação intraespecífica. Já os valores da mínima distância interespecífica foram altos em relação à espécie do rio Juruena e as duas espécies válidas para o gênero.

Segundo Hebert et al. (2004), a distribuição das frequências das distâncias intra e interespecífica podem ser utilizadas para a construção do “Barcoding Gap”, um histograma que indica a existência de um intervalo (“gap”) entre as distâncias intra e interespecíficas.

Figura 4: Cladograma referente ao gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI) de jaús de diferentes localidades. Como pode-se observar nos clados os valores estatísticos baseado na construção de diferentes modelos seguem a seguinte ordem da esquerda para direita: Máxima Verossimilhança; Máxima Parcimônia; *Neighbour Joining*; Bayesiana. As populações formaram clados diferenciados de acordo com a localidade, exceto o indivíduo 3Jurueña*, alocado diferencialmente.

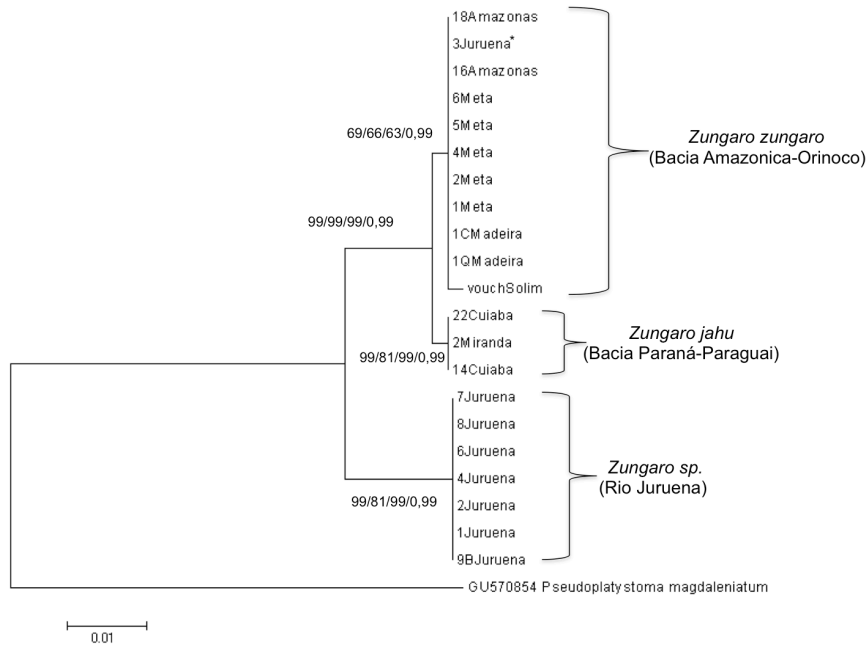


Figura 5: Rede haplotípica construída para o gene mitocondrial COI com indivíduos de jaús diferentes localidades.

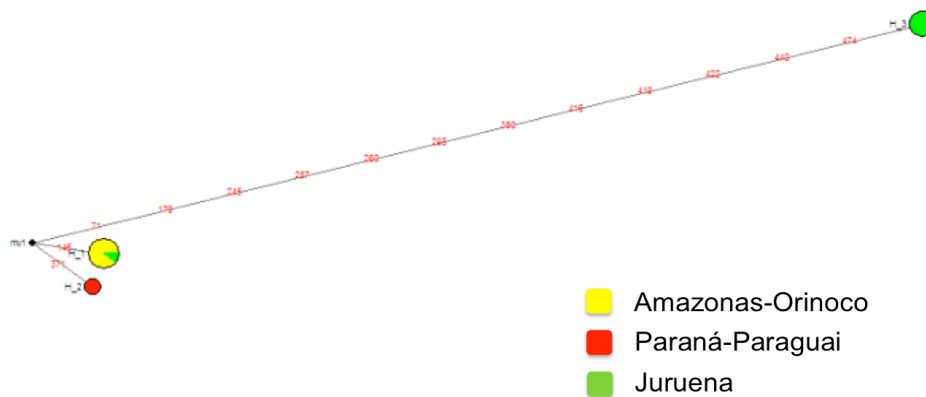
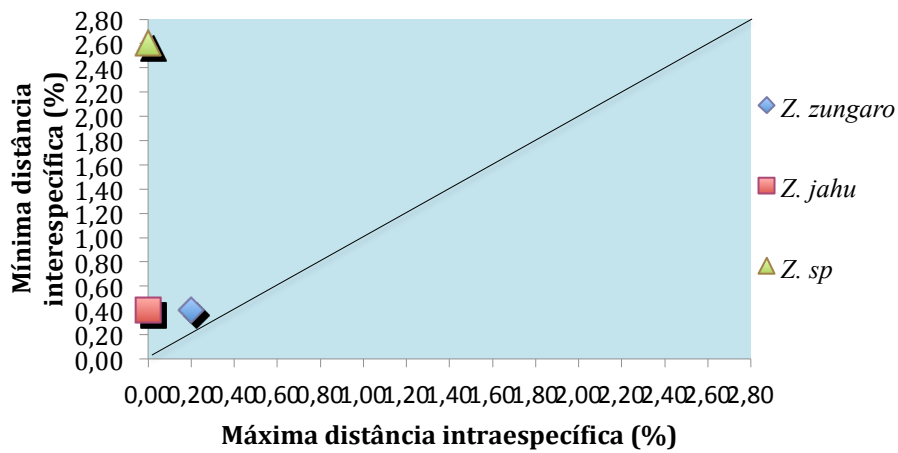
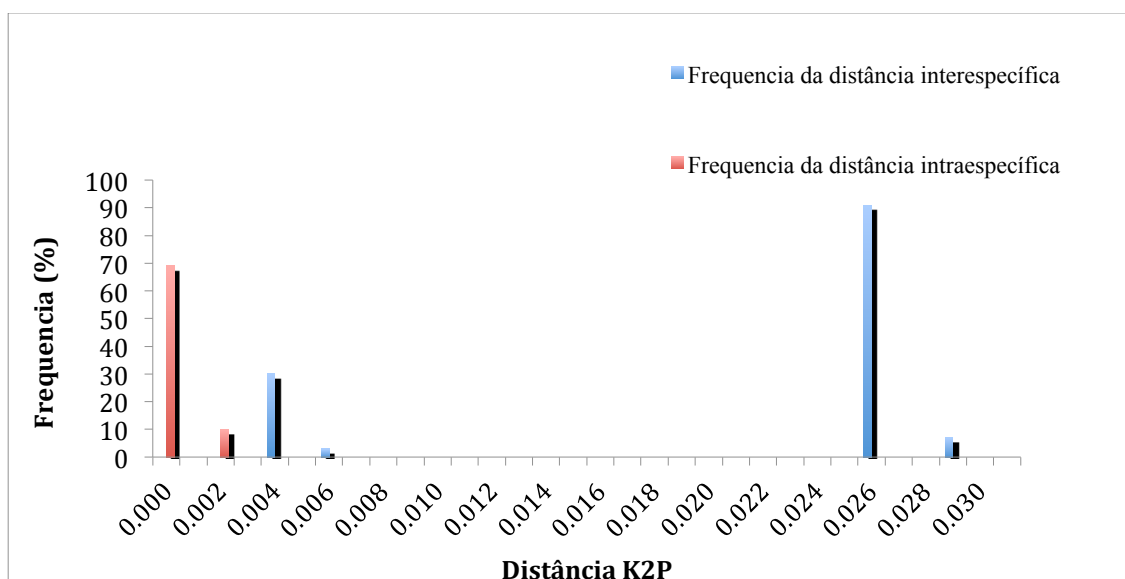


Figura 6: Gráfico entre a distância mínima interespecífica e a distância máxima intraespecífica. O valor do limiar usado foi de 0.12



Na figura 7 pode-se observar uma análise comparativa entre as distâncias interespecíficas e intraespecíficas. Tais distâncias feitas par a par, segundo o modelo K2P, não se contrapõem, evidenciando o “Gap” necessário que distingue diferenças espécie-específicas segundo a metodologia do DNA *Barcoding*.

Figura 7: *Barcoding Gap* para linhagens do Gênero Zungaro, indicando a frequência de cada distância segundo o modelo K2P, montado a partir das comparações par a par das sequências do gene Citocromo Oxidase I (COI), separadas em duas categorias; diferenças entre indivíduos da mesma espécie, e diferenças entre indivíduos de espécies irmãs.



4.2. Região Controle do Genoma Mitocondrial (D-loop)

Os dados obtidos no presente trabalho para as sequências da região controle D-loop, a qual, em geral, apresenta-se mais variável que outras regiões do genoma mitocondrial (AVISE, 2004), evidenciaram estruturação genética para todas populações analisadas, demonstrando nítida separação entre *Z. jungaro* e *Z. jahu* e entre estas e a possível nova espécie de *Zungaro* de ocorrência no rio Juruena.

Os valores de distância genética observados entre as populações de jaús do rio Juruena e as duas espécies válidas para a região D-Loop, foram iguais a 4,9 e 5%, respectivamente, apontando uma forte estruturação genética e sugerindo a provável existência de uma espécie distinta no rio Juruena.

Uma única exceção na comparação das populações do Juruena para os genes COI, CytB e D-Loop foi a alocação de um indivíduo do rio Juruena no clado das populações amazônicas, mostrando que é possível que no rio Juruena existam duas linhagens diferenciadas.

Pode-se averiguar nas figuras 4, 8, 11 e 12 que as topologias das diferentes árvores estabelecidas com base nos quatro modelos utilizados (Máxima Verossimilhança; Máxima Parcimônia; *Neighbour Joining*; Bayesiana), mostraram resultados coincidentes, evidenciando um único cladograma contendo os diferentes valores de *Bootstrap* e estatística bayesiana para as sequências mitocondriais COI, CytB e D-Loop.

Figura 8: Cladograma referente à região controle do mitocondrial D-Loop de jaús de diferentes localidades. Como pode-se observar nos clados os valores de Bootstrap e estatística baysiana baseado na construção de diferentes modelos seguem a seguinte ordem da esquerda para direita: Máxima Verossimilhança; Máxima Parcimônia; *Neighbour Joining*; Bayesiana. As populações formaram clados diferenciados de acordo com a localidade, exceto o indivíduo 3Juruena*, alocado diferencialmente.

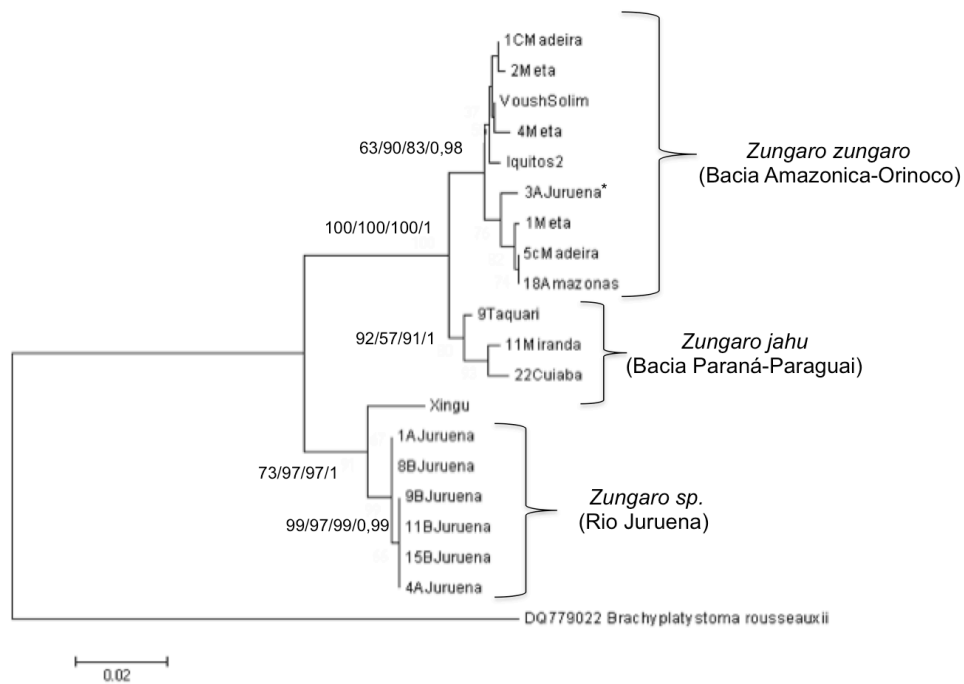
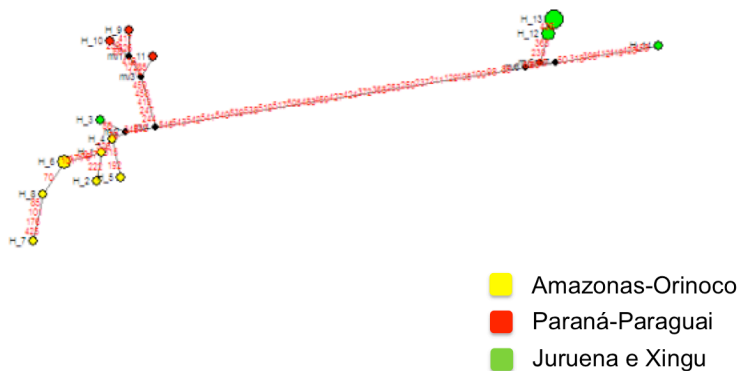


Figura 9: Rede haplotípica construída para dados de sequências da região mitocondrial D-Loop obtidos para indivíduos de jaús de diferentes localidades



Os altos valores de *Bootstrap* e a estatística Bayesiana demonstraram uma alta coesão entre os indivíduos relacionados quando as populações das duas espécies válidas para o gênero são comparadas, o que corrobora os dados de distância genética apresentados na tabela 3.

Assim como no trabalho de Boni et al. (2011), o qual utilizou o gene D-Loop para diferenciar geneticamente as duas espécies do gênero, os dados obtidos no presente trabalho evidenciaram uma alta diferenciação entre as espécies de *Z. zungaro* e *Z. jahu*, (figura 9), confirmando a diferenciação entre ambas através da forte estruturação observada.

Na Figura 10 podemos observar o cladograma referente a indivíduos de jaús de diferentes localidades. Este foi feito com calibração de 3,6 mutações por milhão de anos, de acordo com Aboin et al. (2005), o qual utilizou a mesma taxa de mutação para a região controle mitocondrial em peixes marinhos da espécie *Helicolenus dactylopterus*. O cladograma sugere uma especiação recente para o gênero em torno de 1 milhão de anos e diferenciação para as espécies válidas há cerca de 300 mil anos. Um clado diferenciado indica a divergência entre indivíduos do Juruena e Xingu, há aproximadamente 330 mil anos.

Boni et al. (2011) ainda discutem a ideia plausível de serem duas espécies molecularmente diferenciadas, relatando sua provável separação durante o período mioceno, quando há cerca de 10 milhões de anos ocorreu o surgimento das bacias Amazônicas e Paraná-Paraguai e a separação das duas espécies de *Z. zungaro* e *Z. jahu* por vicariância, sendo que o fluxo gênico se restringiu aos curtos períodos de cheias.

Malabarba (1998) afirma que tal separação pode ter tido início à 30 Ma com a inclinação oroclinal boliviana, onde foram observadas muitas transgressões marinhas durante este período, facilitando eventos vicariantes e divergências alopátricas.

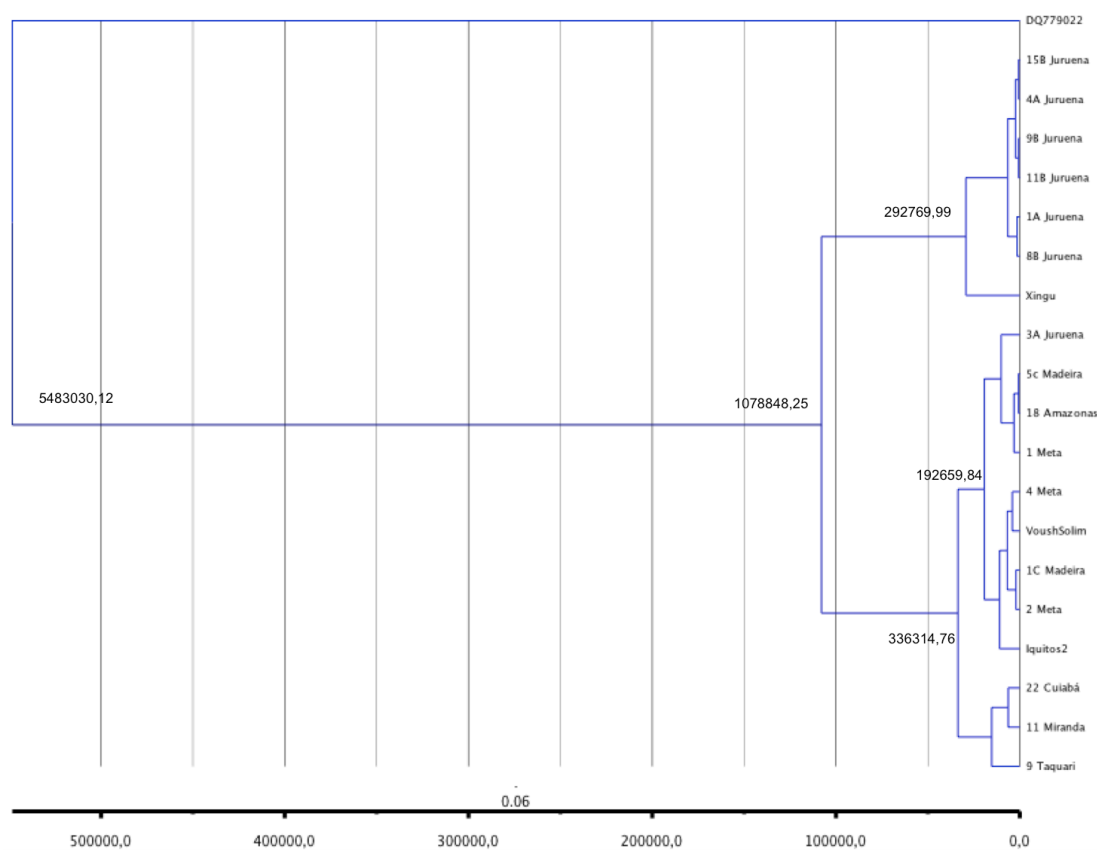
Carvalho e Albert (2011) relatam que grande parte da composição taxonômica da bacia do Paraná-Paraguai pode ser explicada pelas migrações através dos tributários do sul da Amazônia, e existência de diversas conexões entre as bacias, que promovem compartilhamento de ictiofauna como, por exemplo, para loricarídeos e gminotídeos. Estes mesmos autores relatam que até o século XX, informações sobre os tributários amazônicos do oeste central do planalto brasileiro (Tocantins, Xingu e Tapajós) eram limitadas, sendo esta região definida como “Zona Incógnita”. Recentemente, os estudos realizados nesta área tem revelado um alto endemismo da ictiofauna local.

Carvalho e Albert, (2011) também já reportaram a existência de uma passagem altamente viável entre os rios Tapajós e Paraguai (na Chapada dos Parecis) entre o alto Paraguai e o Arinos, evidenciando várias espécies em comum nas duas bacias.

Boni, 2008 relata que esta passagem pode se dar pelas cabeceiras do rio Paraguai, e que, portanto, alguns peixes de origem amazônica, como, por exemplo, a cachara (*Pseudoplatistoma faciatum*), são encontrados no Alto do rio Paraná. Sendo assim, é possível que exemplares de jaús, que são peixes que conseguem vencer altas correntezas para realizar as migrações reprodutivas, consigam transpor grandes barreiras.

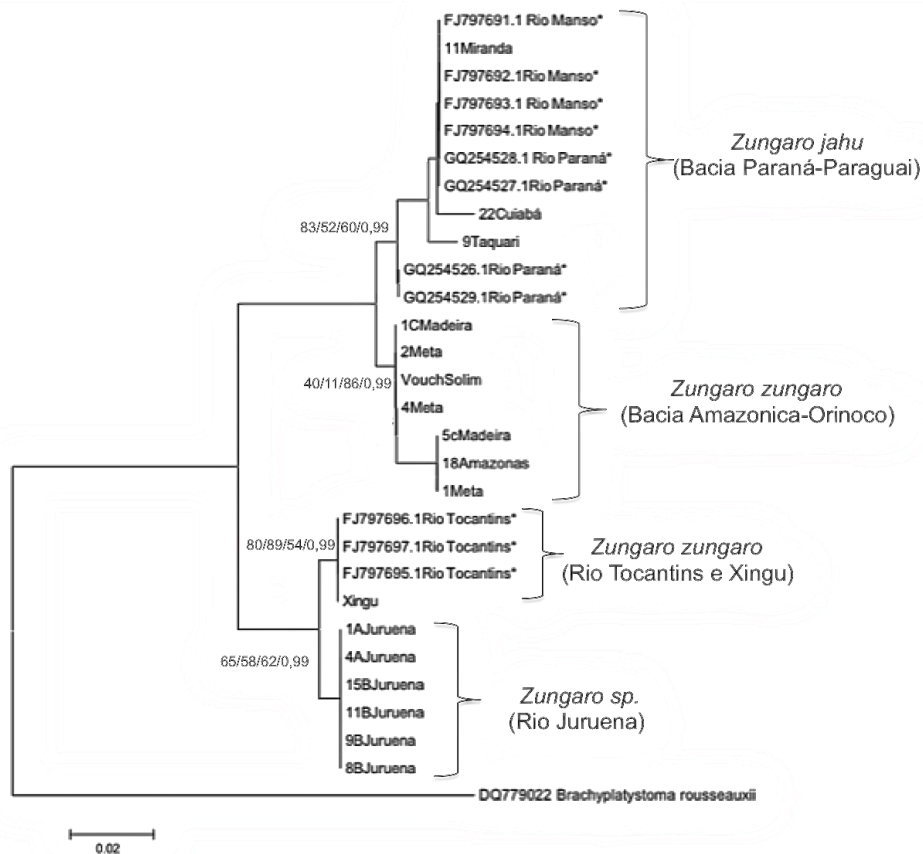
Segundo os resultados encontrados em Carrillo-Avila, (2009), populações de jaús teriam as bacias do Paraná-Paraguai como área de endemismo, devido as rotas de dispersão abertas pela captura de cabeceiras entre o Alto Amazonas e o Paraná-Paraguai migraram a áreas do Amazonas-Orinoco. Este ainda relata que é importante ressaltar que a divisão do Amazonas-Orinoco ainda está incompleta no escudo da Guiana onde o rio Casiquiare conecta o rio Negro com o Orinoco.

Figura 10: Cladograma segundo o modelo Baysiano referente a sequências da região controle do DNA mitocondrial D-Loop com a calibração de 3.6 mutações por milhão de ano para diferentes espécies de jaús e suas localidades.



A figura 11 mostra um cladograma referente à região mitocondrial Controle D-Loop conjunta com as sequências descritas em Boni et al., (2011) obtidas no Genbank. Nesta análise, o mesmo padrão é observado para indivíduos de *Z. jahu*. As sequências de *Z. zungaro* (Amazonas-Orinoco) seguem o mesmo padrão evidenciado nas árvores mostradas nas figuras 4, 8, 12. No entanto, as sequências de *Z. zungaro* do rio Tocantins apresentaram maior proximidade genética das de *Zungaro* do rio Juruena, evidenciando a necessidade de uma ampla reavaliação para este grupo.

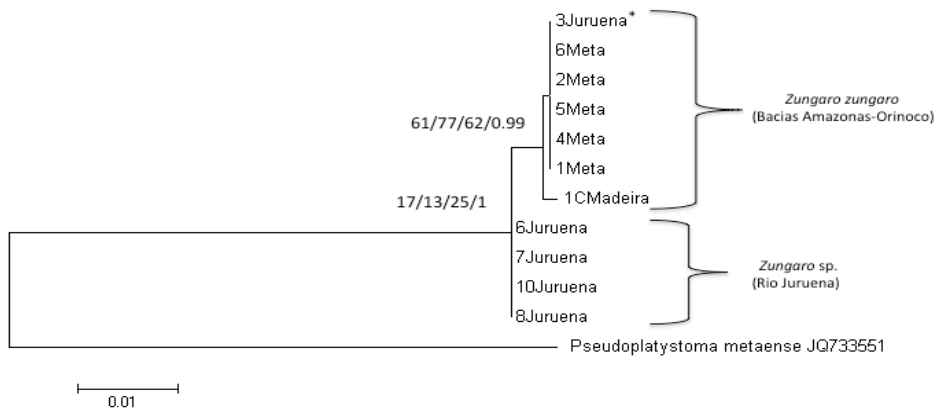
Figura 11: Cladograma referente à sequência da região controle do mDNA, D-Loop de jaús de diferentes localidades em conjunto com as sequências obtidas do GenBank (Boni et al, 2011) representados com (*). baseado na construção de diferentes modelos seguem a seguinte ordem da esquerda para direita: Máxima Verossimilhança; Máxima Parcimônia; *Neighbour Joining*; Bayesiana.



4.3 Citocromo Oxidase B (Cytb)

Na figura 12 pode-se observar um valor baixo de *Bootstrap* entre as populações do Juruena e da bacia Amazônica-Orinoco para os dados obtidos para gene CytB. Uma possível explicação para tal evidência pode ser o fato de que o rio Juruena é um afluente do rio Tapajós, o qual pertence também a Bacia Amazônica, havendo por esse motivo uma possibilidade de menor diferenciação entre estas duas populações especificamente.

Figura 12: Cladograma referente ao gene mitocondrial CytB de Jaús de diferentes localidades. Como pode-se observar nos cladogramas os valores baseado na construção de diferentes modelos seguem a seguinte ordem da esquerda para direita: Máxima Verossimilhança; Máxima Parcimônia; *Neighbour Joining*; Bayesian. As populações formaram cladogramas diferenciados de acordo com a localidade, exceto o indivíduo 3Juruena*, alocado diferencialmente.



5. CONCLUSÃO

Os resultados aqui encontrados apontam para a existência de uma espécie endêmica do rio Juruena, e sugerem a necessidade de um estudo mais abrangente dentro do grupo para melhor caracterização das espécies de *Zungaro* atualmente existentes. Estes estudos devem incluir a determinação de unidades evolutivas, ESUs (*Evolutionary Significant Units*) visando o estabelecimento de planos de manejo e conservação direcionados às distintas espécies e suas respectivas áreas de ocorrência.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOIM, M. A. et al. Genetic structure and history of populations of the deep-sea fish *Helicolenus dactylopterus* (Delaroche, 1809) inferred from mtDNA sequence analysis. **Molecular Ecology** 14, 1343–1354, 2005.

AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory Fishes Of The Upper Paraná River Basin, Brasil, In: CAROLSFELD, J. et al. **Migratory Fishes Of South América: Biology, Fisheries And Conservation Status**. World Fisheries Trust, 2003. p.19-98.

APRIL, J. et al. Genetic calibration of species diversity among North America's freshwater fishes. **Proc. Nat. Acad. Sci. U S A**. 108(26):10602-7. 2011.

ALTSCHUL, S.F. Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments. In: SUHAI, S. **Theoretical and Computational Methods in Genome Research**. Plenum, New York. 1997. p. 1-14,

AVISE, J.C. **Molecular Markers, Natural History, and Evolution 2.ed.** Sinauer, Sunderland, MA. 2004. 684 p.

BECKER, S.; HANNER, R.; STEINKE, D. Five years of FISH-BOL: Brief status report. **Mitochondrial DNA**, 22: 3-9. 2011.

BIGNOTTO, T. S. et al. Genetic Divergence Between *Pseudoplatystoma Corruscans* And *Pseudoplatystoma Reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) In The Paraná River Basin Braz. **J. Biol.** 69 2: 681-689. 2009.

BANDELT, H.; FORSTER P.; RÖHL A. Median-Joining Networks For Inferring Intraspecific Phylogenies. **Molecular Biology And Evolution** 16, 37-48. 1999.

BONI, T.A.; et al. Molecular Differentiation Of Species Of The Genus *Zungaro* (Siluriformes, Pimelodidae) From The Amazon And Paraná-Paraguay River Basins In Brazil. **Genetics And Molecular Research**, 10 (4): 2795-2805. 2011.

BONI, T. A. **Comparação Molecular De Populações Naturais De Jaú (Zungaro) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) Das Bacias Amazonicas E Do Parana-Paraguai**, 2008. 59p. Tese (Doutorado Em Ecologia), Universidade Estadual De Maringá, Maringá, 2008.

CARRILLO-AVILA, M. **Caracterização Genética De Populações De Jaú (Siluriformes: Pimelodidae) Utilizando Marcadores Mitocondriais E Nucleares**, 2009 123p. Tese (Doutorado Em Genética E Evolução) Universidade Federal De São Carlos, São Carlos, 2009.

CARRILLO-AVILA, M; RESEND, E. K.; GALETTI JR, P. M Isolation And Characterization Of Polymorphic Microsatellites In The Threatened Catfish Jaú, *Zungaro Jahu* (Siluriformes, Pimelodidae) **Conserv. Genet.** 10:1597–1599, 2009.

CARVALHO, T. P.; ALBERT, J. S. The Amazon-Paraguay Divide In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical Biogeography Of Neotropical Freshwater Fishes**. Berkeley: University of California Press, 2011. p. 193-202

CUNHA, J. M. F. L. **Biodiversidade E Sistemática Molecular de Phreatobiidae (Ostariophysi, Siluriformes) – Com Uma Proposta Sobre Sua Posição Filogenética Em Siluriformes E Uma Discussão Sobre A Evolução Do Hábito Subterrâneo** 2008. 143p. Tese (Doutorado em Genética) Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DE FREITAS, P. D. **Estudos De Diversidade Genética Em Estoques Reprodutores de Camarões *Litopenaeus Vannamei* Cultivados No Brasil**. 2003. 119p Tese (Doutorado em Genética e Evolução) Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

DRUMMOND, A.; RAMBAUT A. Beast: Bayesian Evolutionary Analysis By Sampling Trees. **Bmc Evolutionary Biology** 7, 214, 2007.

FERRARIS JR., C. J. Checklist Of Catfishes, Recent And Fossil (Osteichthyes: Siluriformes), And Catalogue Of Siluriform Primary Types, **Zootaxa**, 1418. 628p, 2007.

FRANKHAM, R; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos da Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: SBG, 2008. 262p.

GOMES, V.N.2; et al. Utilização do Gene Mitocondrial Citocromo C Oxidase I Para

Distinguir Duas Espécies De Zungaro (Siluriformes: Pimelodidae) de duas Bacias Neotropicais. In: X CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 16 A 22 de Setembro de 2011, São Lourenço. **Resumos**. São Lourenço: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2011. P. 1-2.

HEBERT, P. D. N. et al. Biological Identifications Through Dna Barcodes **Proc. R. Soc. Lond.** 270, 313–321, 2003.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, 28 (12), 1647-1649. 2012.

KUMAR, S.; TAMURA K.; NEI M. Mega3: Integrated Software For Molecular Evolutionary Genetics Analysis And Sequence Alignment. **Briefings In Bioinformatics** 5, 150-163, 2004.

LARKIN, M. A et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, 23 (21): 2947–2948. 2007.

LIBRADO, P; ROZAS, J. Dnasp V5: A Software For Comprehensive Analysis Of Dna Polymorphism Data. **Bioinformatics** 25, 1451-1452, 2009.

LUNDBERG, J. G; SULLIVAN, J. P.; HARDMAN, M. Phylogenetics Of The South American Catfish Family Pimelodidae (Teleostei: Siluriformes) Using Nuclear And

Mitochondrial Gene Sequences. **Proceedings Of The Academy Of Natural Sciences Of Philadelphia**, 161(1):153-189. 2011.

LUNDBERG J. G.; LITTMANN M. W. Family Pimelodidae (Long-Whiskered Catfishes)
In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS JR, C. J. **Check List Of The Fresh Water Fishes Of South And Central América**. Porto Alegre: Edipucrs, 2003. p. 432-446

LUNDBERG, J. G. et al. The Stage For Neotropical Fish Diversification: A History Of Tropical South American Rivers. (1998) In: MALABARBA L. R. et al. **Phylogeny And Classification Of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 13 – 48.

MASCARENHAS-ALVES C. B.; MARTINS DA SILVA, L.G.; LIMA-GODINHO, A. Radiotelemetry Of A Female Jaú, *Zungaro Jahu* (Ihering, 1898) (Siluriformes: Pimelodidae), Passed Upstream Of Funil Dam, Rio Grande, Brazil. *Neotrop Ichthyol* 5(2):229–232, 2007.

MOJICA, J.I. et al. (Ed.). **Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia**. Bogotá, Colombia: Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales - Universidad Nacional de Colombia y Ministerio del Medio Ambiente, 2002. 285p.

NELSON, J. S. **Fishes Of The World**, 4.ed. Nova York: John Wiley And Sons. Any, 2006. 601p.

SAMBROOK J.; FRITISH E. F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

SHRIVASTAVA, K.; et al. Extraction of Genomic Dna From Formalin Fixed Tissues Of Different Wild Avian Species. **Annals Of Biological Research**, 3 (7): 3174-3177, 2012.

PALERO, F.; HALL, S.; CLARK, P. F.; JOHNSTON, D.; MACKENZIE-DODDS, J.; THATJE, S. Dna Extraction From Formalin-Fixed Tissue: New Light From The Deep Sea **Sci. Mar.**, 74(3), September, p. 465-470, 2010.

PFENNINGER, M; POSADA, D. Phylogeographic History Of Land Snail *Candidula Unifasciata* (Helicellinae, Atylommatozoa): Fragmentation, Corridor Migration, And Secondary Contact. **Evolution** 56 (9) p. 1776-1788, 2002.

PINNA, M. C. Phylogenetic Relationships Of Neotropical Siluriformes (Teleostei: Ostariophysi): Historical Overview And Synthesis Of Hypotheses In: MALABARBA L. R et al. **Phylogeny And Classification Of Neotropical Fishes**. Porto Alegre: Edipucrs, 1998. p. 279-330.

PEREIRA L. et al. Can DNA barcoding accurately discriminate megadiverse Neotropical freshwater fish fauna? **BMC Genetics** 14:20. 14 p. 2013.

WARD, R. T. et al.; Dna Barcoding Australia's Fish Species. **Philosophical Transactions Of Royal Society B: Biological Science** 360, p.1847–1857. 2005.

WARD, R.D.; HANNER. R.; HEBERT, P.D.N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. **Journal of Fish Biology** 74: p. 329-356, 2009.