

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE JAÚ  
(Siluriformes: Pimelodidae) UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES**

**MAURICIO CARRILLO AVILA**

**SÃO CARLOS, SP  
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE JAÚ  
(Siluriformes: Pimelodidae) UTILIZANDO MARCADORES  
MOLECULARES MITOCONDRIAIS E NUCLEARES**

**MAURICIO CARRILLO AVILA**

**Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Evolução 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: Genética e Evolução

**SÃO CARLOS, SP  
2009**

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

C317cg

Carrillo Avila, Mauricio.

Caracterização genética de populações de jaú  
(Siluriformes: Pimelodidae) utilizando marcadores  
moleculares mitocondriais e nucleares / Mauricio Carrillo  
Avila. -- São Carlos : UFSCar, 2010.  
123 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,  
2008.

1. Genética de populações. 2. Marcador molecular. 3.  
DNA mitocondrial. 4. Siluriformes. 5. Pimelodidae. I. Título.

CDD: 575.15 (20<sup>a</sup>)

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

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE JAÚ  
(SILURIFORMES: PIMELODIDADE) UTILIZANDO  
MARCADORES MOLECULARES MITOCONDRIAIS E  
NUCLEARES**

Tese de Doutorado de **Maurício Carrillo Ávila**

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas

Prof. Dr. Oscar Akio Shibatta

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko



Handwritten signatures of the exam board members, each on a dotted line. The signatures are: 1. Pedro Manoel Galetti Jr (black ink), 2. Marco Antonio Del Lama (black ink), 3. Patrícia Domingues de Freitas (black ink), 4. Oscar Akio Shibatta (black ink), and 5. Adriane Pinto Wasko (purple ink).

**A minha filha Sara Juliana**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.;

Ao programa de Pós-graduação em Genética e Evolução;

À CAPES PEC-PG, pela bolsa concedida;

À minha família por seu apoio incondicional;

À todos os membros do Departamento de Genética e Evolução;

À todos os professores do Departamento de Genética e Evolução

À todos os meus colegas, amigos e companheiros que sempre me ajudaram para chegar aqui.

## Resumo

O gênero *Zungaro*, conhecido como Jaú, está conformado por duas espécies distribuídas pelos rios da América do Sul. *Zungaro jahu* ocorre mais ao sul, na bacia do Paraná-Paraguai e *Zungaro zungaro* que ocorre mais ao norte, na bacia dos rios Amazonas e Orinoco. No entanto, na literatura ainda não existe clareza sobre a classificação e a distribuição da cada uma das espécies e informações básicas sobre a biologia e história natural são escassas. No Brasil o jaú encontra-se listado como uma das espécies ameaçadas de extinção, sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-explotação, no entanto, as normativas emitidas para proteger o jaú apresentam um erro de mencioná-lo como *Zungaro zungaro*. Na Colômbia, segundo o livro vermelho de espécies de água doce, o *Zungaro zungaro* encontra-se declarada como em perigo. Considerando a escassez de informações sobre a estrutura genética populacional desses peixes o objetivo do presente estudo foi, através de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares, responder se dadas as incertezas taxonômicas encontradas no gênero *Zungaro*, este está conformado por duas espécies ou são simplesmente populações diferentes, se pelo fato do jaú ser um peixe de grande porte e, aparentemente, de grandes migrações, existe estruturação das populações e se conhecendo a condição de espécie ameaçada e dadas as alterações de habitat sofridas e a sobrepesca, isso já está refletindo numa redução da variação genética desses bagres. Para tanto, foram utilizados como marcadores moleculares como o gene mitocondrial do citocromo b, o gene nuclear RAG (Gene Ativador da Recombinação) e o gene nuclear que codifica para a proteína ribossomal S7, assim mesmo foi prospectado um total de oito locos microssatélites polimórficos. A análise populacional do gênero *Zungaro* com os marcadores mitocondriais e nucleares indicou a existência de uma estrutura populacional entre os indivíduos amostrados. Esta estruturação é devida principalmente as diferenças encontradas entre as populações do Pantanal – Paraná com relação às populações do Meta e Amazonas, corroborando a separação das espécies. Igualmente, foi encontrado que as populações compartilham um haplótipo central, indicando uma coesão genética no gênero onde as populações do Meta- Amazonas apresentaram um maior número de haplótipos derivados indicando uma provável expansão populacional. A ocorrência de um haplótipo exclusivo e central para as populações do Pantanal-Paraná do qual são derivados os haplótipos do Meta e Amazonas, quando utilizado o gene RAG, suportariam a idéia de que estas populações seriam o centro de dispersão e manteriam o haplótipo ancestral. Enquanto aos locos microssatélites

prospectados estes foram eficientes na amplificação e verificação de polimorfismo em *Zungaro jahu*, assim como mostraram –se eficientes na amplificação heteróloga para outras espécies da família Pimelodidae. As análises estatísticas mostraram evidencia da existência de uma única população da espécie *Z. jahu* habitando o pantanal norte e sul. Em contraste, em *Z. zungaro* as duas populações estudadas (do rio Meta, bacia do Orinoco, e do rio Amazonas) mostraram-se significativamente diferentes, evidenciando uma estruturação populacional. Os resultados de variação genética evidenciaram valores comparáveis a outras espécies de peixes de outras localidades, a despeito do jaú ser uma espécie ameaçada. Com esses resultados abre-se a possibilidade de estabelecer programas de manejo claros e dirigidos especialmente para cada uma das populações aqui estudadas visando a proteção e recuperação de cada um dos estoques pesqueiros.



## Abstract

The genus *Zungaro* known as jaú, is composed by two species distributed along the rivers of South America: *Zungaro jahu* is found further south in the basin of the Paraná-Paraguay whereas *Zungaro zungaro* is found further north in the basin of the rivers Amazon and Orinoco. However, in the literature the classification and distribution of each of those species is still unclear and the basic information on the biology and natural history is scarce. In Brazil the jaú is listed as one of endangered species, over-exploited or threatened by over-exploitation; however, the regulations fail to protect the jaú because they have mistakenly identified it as *Zungaro zungaro*. In Colombia, according to the freshwater species Red Book, the *Zungaro zungaro* has been declared endangered. Considering the limited information on the population genetics of these fish, the purpose of this study was to obtain the genetic characterization of the jaú population through mitochondrial and nuclear molecular markers. This purpose includes the following research questions: 1- Given the uncertainties encountered in the taxonomic genus *Zungaro*, is this group composed by two species, or are they two different populations? 2- Considering the jaú's big size and the fact that they migrate long distances, would that mean that there is a population structure? and 3- The jaú's endangered condition, its habitat's changes and overfishing, could be responsible for a reduction of the genetic variation of these catfishes? In order to conduct the characterization we used molecular markers such as the mitochondrial cytochrome b gene, the nuclear gene RAG (Recombination Activation Gene) and the nuclear gene coding for ribosomal protein S7. Additionally, a total of eight polymorphic microsatellite loci capable of producing a considerable genetic variation was prospected. The population analysis of the genus *Zungaro* with mitochondrial and nuclear markers indicated the existence of a population structure among the individuals sampled. This result is due mainly to the differences between the populations of Pantanal - Paraná and the populations of Meta and Amazon; this finding supports the separation of these species. It was also found that these populations share a central haplotype, indicating a genetic cohesion in the genus, where the populations of Meta-Amazon had a greater number of derived haplotypes suggesting a possible population expansion. The occurrence of a unique and central haplotype to the populations of Pantanal- Parana from which the haplotypes of Meta and the Amazon are derived, when the gene RAG was used, would support the idea that these populations would be the center of dispersion and they would retain the ancestral haplotype. Regarding the prospected microsatellite loci, the results indicated they were efficient in the amplification and

verification of polymorphism in *Zungaro jahu*, and were effective in heterologous amplification of other species of the Pimelodidae family. Statistical analyses on the microsatellites loci showed evidence of a single population of the *Z. jahu* specie inhabiting the north and south Pantanal. In contrast, the two *Z. zungaro* populations studied (the Meta River, basin of the Orinoco and the Amazon River) shown to be significantly different, indicating a population structure. In spite of the jaú being an endangered species, the results of the genetic variation showed values comparable to other species of fish. These results open the possibility of developing clear management programs specifically directed to each of these populations, seeking the protection and recovery of individual fish stocks.

## Sumário

Capítulo 1. Considerações gerais.....	1
1.1. Introdução.....	1
1.1.1. Estado de conservação das espécies.....	3
1.1.2. Características gerais das bacias.....	4
1.1.2.1. Bacia do Rio Orinoco .....	4
1.1.2.2. Bifurcação do Rio Casiquiare.....	5
1.1.2.3. Bacia do Rio Amazonas .....	5
1.1.2.4. Bacia do Alto Rio Paraguai.....	6
1.1.2.5. Bacia do Rio Paraná.....	7
1.1.3. Filogeografia de peixes de água doce.....	8
1.1.4. Marcadores Moleculares em Estudos Populacionais de Peixes de Águas Continentais.....	13
1.2. Objetivos.....	14
1.3. Material e métodos.....	15
1.3.1. Área de estudo.....	15
1.3.2. Extração e quantificação do DNA.....	16
1.3.3. Amplificação das seqüências de DNA mitocondrial e nuclear.....	16
1.3.3.1. Gene mitocondrial citocromo b.....	16
1.3.3.2 Gene nuclear RAG.....	17
1.3.3.3. Gene Nuclear S7.....	17
1.3.4. Purificação e seqüenciamento dos produtos de PCR.....	18
1.3.5. Isolamento e caracterização de microssatélites.....	19
1.3.6. Validação das seqüências identificadas.....	23
1.3.7. Caracterização dos microssatélites.....	23
1.3.7.1. Determinação da temperatura ótima de anelamento.....	23
1.3.7.2. Padronização das reações.....	25
1.3.7.3. Análise do perfil polimórfico dos locos em gel de agarose.....	25
1.3.7.4. Genotipagem dos locos polimórficos.....	25
1.3.8. Análises estatísticas.....	25

1.3.8.1. Análise dos dados para os genes mitocondrial e nucleares.....	25
1.3.8.2. Análise dos dados para a caracterização populacional com microssatélites.....	27
1.3.8.3. Caracterização da variabilidade genética.....	27
Capítulo 2. Coesão genética entre populações alopátricas de <i>Zungaro</i> revelada pelo seqüenciamento de genes mitocondrial e nucleares.....	29
2.1. Introdução.....	29
2.2. Material e métodos.....	32
2.3. Resultados.....	36
2.3.1. Citocromo b (Cyt b).....	36
2.3.1.1. Estimativas da variabilidade genética.....	36
2.3.1.2. Estimativas de subdivisão populacional.....	38
2.3.1.3. Inferências demográficas.....	39
2.3.2. Primeiro íntron do Gene Ativador da Recombinação (RAG).....	42
2.3.2.1. Estimativas da variabilidade genética.....	42
2.3.2.2. Estimativas de subdivisão populacional.....	44
2.3.2.3. Inferências demográficas.....	45
2.3.3. Gene da Proteína Ribossomal S7.....	48
2.3.3.1. Estimativas da variabilidade genética.....	48
2.3.3.2. Estimativas de subdivisão populacional.....	50
2.3.3.3. Inferências demográficas.....	51
2.4. Discussão.....	54
Capítulo 3. Isolamento e caracterização de microssatélites polimórficos no Jaú <i>Zungaro jahu</i> (Siluriformes, Pimelodidae).....	59
3.1. Introdução.....	59
3.2. Material e métodos.....	63

3.3. Resultados.....	65
3.3.1. Prospecção de locos microssatélites.....	65
3.3.2. Caracterização dos locos microssatélites prospectados.....	66
3.3.3. Análise populacional do <i>Zungaro jahu</i> da bacia do Paraguai.....	67
3.4. Discussão.....	70
3.4.1. Isolamento dos microssatélites.....	70
3.4.2. Caracterização dos locos microssatélites de <i>Zungaro jahu</i> .....	71
Capítulo 4. Caracterização populacional de duas espécies do gênero <i>Zungaro</i> (Siluriformes, Pimelodidae) utilizando marcadores tipo microssatélites.....	73
4.1. Introdução.....	73
4.2. Material e métodos.....	76
4.3. Resultados.....	79
4.3.1. Caracterização intrapopulacional das populações do <i>Z. jahu</i> .....	79
4.3.2. Caracterização interpopulacional de <i>Z. jahu</i> do pantanal.....	81
4.3.3. Caracterização intrapopulacional das populações do <i>Z. zungaro</i> .....	82
4.3.4. Caracterização interpopulacional em <i>Z. zungaro</i> .....	85
4.4. Discussão.....	86
5. Conclusões Gerais.....	91
6. Referências.....	93

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1.</b> Exemplar de jaú.....	3
<b>Figura 1.2.</b> Localização dos locais de coleta das amostras de jaú. ....	15
<b>Figura 1.3.</b> Recuperação de fragmentos de DNA digerido de jaú.....	19
<b>Figura 1.4.</b> Esquema ilustrando o funcionamento do protocolo desenvolvido por Schuelke (2000) para amplificação de um fragmento de interesse juntamente com a cauda M13 marcada com fluorescência.....	24
<b>Figura 2.1.</b> Localização dos pontos de coleta das amostras de jaú.....	32
<b>Figura 2.2.</b> Rede de haplótipos utilizando o fragmento do gene Cyt b.....	38
<b>Figura 2.3.</b> Gráficos de “ <i>mismatch distribution</i> ” obtidos para as seqüências do fragmento do Cyt b das diferentes localidades estudadas.....	40
<b>Figura 2.4.</b> Árvore de <i>neighbor joining</i> para as seqüências do fragmento do Cyt b das diferentes localidades estudadas.....	41
<b>Figura 2.5.</b> Rede de haplótipos utilizando o fragmento do gene RAG.....	44
<b>Figura 2.6.</b> Gráficos de “ <i>mismatch distribution</i> ” obtidos para as seqüências do fragmento do RAG das diferentes localidades estudadas.....	46
<b>Figura 2.7.</b> Árvore de <i>neighbor joining</i> para as seqüências do fragmento do RAG das diferentes localidades estudadas.....	47
<b>Figura 2.8.</b> Rede de haplótipos utilizando o fragmento do gene S7.....	50
<b>Figura 2.9.</b> Gráficos de “ <i>mismatch distribution</i> ” obtidos para as seqüências do fragmento do S7 das diferentes localidades estudadas.....	52

<b>Figura 2.10.</b> Árvore de <i>neighbor joining</i> para as seqüências do fragmento do S7 dos diferentes indivíduos nas localidades estudadas.....	53
<b>Figura 2.11.</b> Possíveis rotas de dispersão de espécies entre as áreas de endemismo do Paraná-Paraguai e do Amazonas.....	58
<b>Figura 3.1.</b> Locais de coleta nos rios do Pantanal Brasileiro.....	63
<b>Figura 3.2.</b> Porcentagens de clones positivos seqüenciados e analisados para a obtenção de microssatélites de <i>Z. jahu</i> .....	65
<b>Figura 3.3.</b> Porcentagens de cada tipo de microssatélite de <i>Z. jahu</i> .....	65
<b>Figura 4.1.</b> Locais de coleta das amostras de jaú.....	76

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1.</b> Número de indivíduos por população que apresentaram cada haplótipo.....	36
<b>Tabela 2.2.</b> Número de indivíduos, número de haplótipos e sítios polimórficos encontrados nas populações de Zungaro para o fragmento do Cyt b analisado.....	37
<b>Tabela 2.3.</b> Diversidade genética observada nas seqüências do Cyt b das populações de Zungaro. ....	37
<b>Tabela 2.4.</b> Resultados da AMOVA para o fragmento das seqüências do Cyt b para as populações de Zungaro.....	38
<b>Tabela 2.5.</b> Valores de $F_{ST}$ par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene Cyt b.....	39
<b>Tabela 2.6.</b> Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento do Cyt b em cada uma das populações.....	39
<b>Tabela 2.7.</b> Número de indivíduos por população que apresentaram cada haplótipo para o fragmento do gene RAG nas populações de Zungaro analisadas.....	42
<b>Tabela 2.8.</b> Número de seqüências analisadas, número de haplótipos e sítios polimórficos encontrados nas populações de Zungaro para o fragmento do gene RAG .....	43
<b>Tabela 2.9.</b> Diversidade genética observada nas seqüências do RAG das populações de Zungaro.....	43
<b>Tabela 2.10.</b> Resultados da AMOVA para o fragmento das seqüências do RAG para as populações de Zungaro.....	44
<b>Tabela 2.11.</b> Valores de $F_{ST}$ par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene RAG.....	45
<b>Tabela 2.12.</b> Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento do RAG em cada uma das populações.....	45



<b>Tabela 2.13.</b> Número de seqüências por população que apresentaram cada haplótipo para o fragmento do gene S7 nas populações de Zungaro analisadas.....	48
<b>Tabela 2.14.</b> Número de seqüências analisadas, número de haplótipos e sítios polimórficos encontrados nas populações de Zungaro para o fragmento do gene S7 analisado.....	49
<b>Tabela 2.15.</b> Diversidade genética observada nas seqüências do S7 das populações de Zungaro.....	49
<b>Tabela 2.16.</b> Resultados da AMOVA para o fragmento das seqüências do S7 para as populações de Zungaro.....	50
<b>Tabela 2.17.</b> Valores de $F_{ST}$ par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do S7.....	51
<b>Tabela 2.18.</b> Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento do S7 em cada uma das populações.....	51
<b>Tabela 3.1.</b> Características dos 14 locos isolados de <i>Zungaro jahu</i> .....	67
<b>Tabela 3.2.</b> Caracterização de oito locos microssatélites polimórficos de <i>Zungaro jahu</i> .....	68
<b>Tabela 3.3.</b> Amplificações heterólogas entre cinco espécies relacionadas da família Pimelodidae utilizando os oito locos isolados para <i>Zungaro jahu</i> .....	68
<b>Tabela 3.4.</b> Caracterização genética dos locos isolados na população de Zungaro.....	69
<b>Tabela 4.1.</b> Variação genética entre os indivíduos de Zungaro do Pantanal Sul baseada em oito locos microssatélites de <i>Z. jahu</i> .....	80
<b>Tabela 4.2.</b> Variação genética entre os indivíduos de Zungaro do Pantanal Norte baseada em oito locos microssatélites de <i>Z. jahu</i> .....	81
<b>Tabela 4.3.</b> Valores de P (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) referentes à análise de diferenciação gênica e genotípica entre as amostras de <i>Z. jahu</i> .....	82

**Tabela 4.4.** Variação genética entre os indivíduos de Zungaro do rio Amazonas baseada em oito locos microssatélites de *Z. jahu*.....83

**Tabela 4.5.** Variação genética entre os indivíduos de Zungaro do rio Meta baseada em oito locos microssatélites de *Z. jahu*.....84

**Tabela 4.6.** Valores de P (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) referentes à análise de diferenciação gênica e genotípica entre as amostras de *Z. zungaro*.....85

## Capítulo 1

## 1. Considerações gerais

### 1.1. Introdução

Estima-se que no mundo existam ao redor de 33.000 espécies de peixes. Com cerca de 5000 espécies, a região Neotropical se constitui como uma das maiores ictiofaunas continentais (Hardman e Lundberg, 2006). Schaefer (1998), baseado em tendências históricas de descrição de espécies, afirma que esse número pode ser de 8.000 devido ao fato que aproximadamente 400 novas espécies de peixes são descritas a cada década. Assim, os peixes neotropicais aportariam cerca de 24% do total dos peixes o que representaria 13% da biodiversidade total de vertebrados, embora ocorra em menos de 0,003% (por volume) dos ecossistemas aquáticos do mundo (Agostinho *et al.*, 2005).

O Brasil lidera o número de peixes de água doce com cerca de 21% das espécies do mundo, possuindo 2.122 espécies catalogadas (Menezes e Buckup, 2003). Provavelmente 30 a 40% da fauna de peixes neotropicais de águas interiores ainda não foi descrita e assim um número mais realista para as águas brasileiras pode ser de 5.000 espécies. O número estimado apenas para a região amazônica é de 2.000 espécies (Winemiller *et al.*, 2005).

Dentro do grupo dos peixes, os bagres ou peixes de couro representam aproximadamente uma de cada vinte espécies de vertebrados. Os bagres constituem um grupo monofilético e eles, ou seus fósseis, podem ser encontrados em todos os continentes em águas doces, estuários ou ambientes marinhos. Dentro deste grupo temos bagres que se alimentam de perifiton (loricarídeos), bagres elétricos capazes de gerar 400V ou mais e bagres parasitas que se alimentam nas brânquias, escamas ou sangue de outros peixes (Hardman, 2005).

Nos primeiros seis anos do século XXI, 332 espécies de bagres foram descritas e entre estes os primeiros representantes de nove novos gêneros e uma família nova. Esta taxa elevada de descobertas não mostra nenhum sinal da diminuição (Sullivan *et al.*, 2006).

Dentre os bagres, a ordem Siluriformes apresenta-se como um clado amplamente distribuído nas regiões tropicais com aproximadamente 3000 espécies válidas vivas e uma estimativa de 1750 espécies não descritas. A família Pimelodidae, pertencente a esta ordem, engloba cerca de 30 gêneros e 90 espécies com ampla variação de tamanhos - desde menores que 20 cm até maiores de 200 cm (Lundberg e Littmann, 2003).

O gênero *Zungaro* (Bleeker, 1858), conhecido popularmente como Jaú, está conformado por duas espécies distribuídas pelos rios da América do Sul. *Zungaro jahu* (Ihering, 1888) ocorre mais ao sul, na bacia do Paraná-Paraguai e *Zungaro zungaro* (Humbolt,

1821) que ocorre mais ao norte, na bacia dos rios Amazonas e Orinoco (Lundberg e Littmann, 2003).

No entanto, na literatura ainda não existe clareza sobre a classificação e a distribuição da cada uma das espécies e informações básicas sobre a biologia e história natural dessas espécies são escassas (Agostinho *et al.*, 2003).

O Jaú apresenta a seguinte posição taxonômica:

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Classe: Actinopterygii

Ordem: Siluriformes

Família: Pimelodidae

Gênero: *Zungaro*

Espécie: *Zungaro jahu* Ihering (1888)

*Zungaro zungaro* (Humbolt, 1821)

Nome comum: Jaú (Brasil)

Amarillo (Colômbia)

O jaú é um peixe piscívoro de grande porte que pode alcançar mais de 1 m de comprimento e ultrapassar os 150 kg, sendo um dos maiores peixes de água doce da América do Sul e o maior dos bagres na bacia do Paraná-Paraguai com relevante importância tanto econômica quanto para a pesca esportiva e de subsistência. É um bagre de corpo robusto, cabeça quase triangular e focinho transversalmente truncado. É um peixe liso com coloração que varia do pardo-esverdeado claro a escuro no dorso, mas o ventre é branco. A maxila superior é projetada sobre a inferior, os dentes são villiformes e os barbilhões maxilares são curtos, enquanto que os mentonianos alcançam a base da nadadeira peitoral. Apresenta numerosas pintas indistintas espalhadas pelo corpo, às vezes unidas, formando manchas maiores; as margens das nadadeiras, especialmente da caudal, com listras estreitas, transversais, sinuosas (Mojica *et al.*, 2002) (Fig 1.1.). Realiza migrações reprodutivas e apresenta uma baixa captura por unidade de esforço nos ambientes lóticos e semilóticos, alcança a maturidade por volta dos quatro anos e meio, sendo considerado de maturidade tardia, possui uma baixa velocidade de crescimento, atinge grandes comprimentos e consequentemente alcança alta longevidade (Mateus e Penha, 2007).



Figura 1.1. Exemplar de jaú

Estudos biológicos são escassos para esta espécie, mas pescadores comerciais mencionam que estes são capturados nas partes profundas do rio (Resende, 2003, Agostinho, 2003). Este fato foi confirmado por Mascarenhas-Alves *et al.* (2007) em um estudo de radiotelemetria onde rastream uma fêmea adulta de 1,5 m de comprimento total, encontrando-a principalmente em profundidades que variaram de 8-9 m, na zona de transição reservatório-rio e a 18-21 m no corpo principal.

### 1.1.1. Estado de conservação das espécies

A partir de dados coletados pelo SCPESCA/MS, Catella (2003) realizou estudos na planície do pantanal avaliando o nível de exploração dos estoques para as principais espécies capturadas entre os anos de 1994 e 1999 utilizando o modelo sintético de Schaefer, relacionando a captura anual de cada espécie ao esforço pesqueiro total empreendido pela pesca profissional artesanal e esportiva. Observou-se que a captura total, para a maioria das espécies, respondeu positivamente ao aumento do esforço de pesca, sugerindo que os estoques encontravam-se subexplorados nesse período. Apenas o *jaú Zungaro jahu* (antes *Paulicea luetkeni*) e o pacu *Piaractus mesopotamicus* mostraram tendências diferentes (Catella, 2003; Agostinho *et al.*, 2003).

O *Z. jahu* está listado como sendo vulnerável em dois estados brasileiros, isto é, Minas Gerais e Paraná (Lins *et al.*, 1997). Na lista de Minas Gerais o *Z. jahu* está listado como criticamente ameaçado.

Uma das medidas tomadas para proteger as espécies em risco ou vulneráveis no Brasil foi emitir, por parte do Ministério do Meio Ambiente, a Normativa Nº 5, de 21 de maio de 2004, publicada no DOU de 28 de maio de 2004 na qual a espécie *Z. zungaro*, encontra-se listada como uma das espécies ameaçadas de extinção, sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-exploração. A inclusão do *Z. zungaro* nesta lista, em vez do *Z. jahu*, foi um erro que precisa urgentemente ser retificado (Agostinho *et al.*, 2003; Resende, 2003).

Para o sistema do Pantanal, Agostinho *et al.*, (2005) mencionaram que o jaú está considerado como ameaçado devido à sobre-exploração e está proibido de ser pescado no baixo Paraná.

Para o manejo desta sobre-exploração, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis IBAMA, emitiu a Portaria Nº 3, de 28 de janeiro de 2008, publicada no DOU Nº 20, de 29 de janeiro de 2008, na qual se estabelecem normas para o exercício da pesca na Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e onde seu parágrafo único disse "Entende-se por Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai, o rio Paraguai, seus formadores, seus afluentes" e na qual o tamanho mínimo de captura do Jaú foi incrementado de 90 a 95 cm. No entanto, nesta Portaria ainda persiste o erro de identificar o jaú do Paraguai como *Z. zungaro*. O jaú tem sido ausente da bacia do rio de La Plata desde o início da década de 1980.

Na Colômbia segundo o livro vermelho de espécies de água doce (Mojica 2002), a espécie *Zungaro zungaro*, de distribuição nas bacias do Orinoco e Amazonas, encontra-se declarada como em perigo. A Normativa 1087 de 1981 do Ministerio de Medio Ambiente Vivienda y Desarrollo, estabeleceu um tamanho mínimo de captura 85 cm de comprimento padrão para a bacia do rio Orinoco e a Normativa 75 de 1989 um tamanho mínimo de captura 85cm de comprimento padrão para a bacia dos rios Caquetá e Amazonas.

Além do status frágil da conservação do jaú, sua biologia e ecologia são pobremente conhecidas (Agostinho *et al.*, 2003; Resende, 2003).

### **1.1.2. Características gerais das bacias**

#### **1.1.2.1. Bacia do rio Orinoco**

Cobre aproximadamente 830.000 km<sup>2</sup>, dos quais 640.000 km<sup>2</sup> correspondem ao território venezuelano. Seu canal principal, o rio Orinoco, tem seu nascimento no estado do

Amazonas na Serra Parima, no Cerro Delgado Chalbaud (1.047 m.s.n.m.) no extremo sudeste do Estado do Amazonas no limite com o Brasil. Uns 200 afluentes e 600 subafluentes formam o imponente Orinoco, o terceiro rio mais caudaloso do mundo, cujo percurso é de 2.140 km. Seus principais tributários se encontram no leste dos Andes: rios Meta, Cinaruco, Capanaparo, Apure, Arauca e outros pela sua margem esquerda e Caroní, Caura, Aro, Pao, Cuchivero, Ventuari, entre outros (Lundberg *et al.*, 1998).

Depois de realizar todo seu percurso, desemboca no oceano Atlântico através de uns 300 canais que formam um grande delta de 20.000 km<sup>2</sup>. Na época das chuvas, o rio atinge 22 quilômetros de largura, em San Rafael de Barrancas, e 100 metros de profundidade. É navegável em 1.670 quilômetros, dos quais 341 são utilizados por barcos de um grande tamanho.

#### **1.1.2.2. Bifurcação do Rio Casiquiare**

À altura de Tama-Tama, em um ponto que se conhece como a bifurcação, o rio Orinoco desvia um terço das suas águas para a bacia do Amazonas, através do chamado braço ou rio Casiquiare, de águas agitadas que, após de percorrer 320 km na direção sul, desemboca no rio Guainía, que vem da Colômbia, para formar o Rio Negro, cujo percurso de 800 km é finalizado no rio Amazonas (Lundberg *et al.*, 1998).

#### **1.1.2.3. Bacia do Rio Amazonas**

Do ponto de vista político-administrativo, ambiental e geográfico o rio Amazonas conta com uma extensão aproximada de 7.989.004 km<sup>2</sup> passando por seis países: Brasil (67,9%), Bolívia (11,2%), Colômbia (5,5%), Equador (1,7%), Peru (13%) e Venezuela (0,7); os países de Guiana e Suriname a pesar de pertencer à região amazônica por possuir cobertura de selva, não fazem parte da bacia (Gutiérrez *et al.*, 2004). Limita-se ao norte pelos relevos do escudo guianense, ao oeste pela cordilheira dos Andes, ao sul pelo planalto do escudo brasileiro e a leste pelo oceano Atlântico.

A bacia amazônica é a maior bacia hidrográfica do mundo, com uma drenagem de 5,8 milhões de km<sup>2</sup>, sendo 3,9 milhões no Brasil. Como é atravessado pela linha do Equador, o rio Amazonas apresenta afluentes nos dois hemisférios do planeta. Entre os principais afluentes da margem esquerda encontram-se o Japurá, o Negro e o Trombetas; na margem direita, o Juruá, o Purus, o Madeira, o Xingu e o Tapajós (Lundberg *et al.*, 1998).



Com 6.500 km de extensão, o rio Amazonas é responsável por 20% da água doce despejada anualmente nos oceanos. Embora seja de longe o maior rio do mundo em volume de água, geralmente não é considerado o mais longo. O rio Amazonas é um rio de planície, possuindo baixa declividade. Sua largura média é de 4 a 5 km, mas, em alguns trechos, alcança mais de 50 km. Navios oceânicos de grande porte podem navegar até Manaus, capital do estado do Amazonas, enquanto embarcações menores com até seis metros de calado, podem alcançar a cidade de Iquitos, no Peru, distante 3.700 km do oceano Atlântico (Lundberg *et al.*, 1998).

#### **1.1.2.4. Bacia do Alto Rio Paraguai**

A planície pantaneira localizada no centro da América do Sul (14-22° sul e 53-66° oeste) está totalmente contida na Bacia de drenagem do Alto rio Paraguai (BAP), compreendendo 140 mil quilômetros quadrados. No Brasil, o pantanal abrange os estados de Mato Grosso (35%) e Mato Grosso do Sul (65%), alcançando ainda a Bolívia e o Paraguai (Resende 2003; EMBRAPA, 2004).

O pantanal é a maior planície alagada do mundo. Trata-se de uma área formada por terrenos predominantemente planos e suavemente ondulados, alagados periodicamente por uma série de rios corixos e vazantes entremeadas de lagoas, baías e lmeques aluviais (EMBRAPA, 2004).

A posição geográfica do pantanal é de particular relevância uma vez que representa o elo de ligação entre cerrado, chaco e a floresta amazônica. É limitado ao norte pelas formações mais meridionais da floresta amazônica, a leste pelos cerrados do planalto central brasileiro, a oeste pelas floresta das fronteiras bolívia-paraguaias e ao sul pelas florestas chaquenhas, já na fronteira com o Paraguai (Adamoli, 1982).

Com altitude que varia entre 80 m e 150 m, o relevo do pantanal é praticamente plano, com declividade extremamente pequena, de 1 a 3 cm/km no sentido norte-sul e de 12 a 15 cm/km no sentido leste-oeste (Resende, 2003). Esses fatores, associados a chuvas periódicas anuais que caem na Bacia do Alto rio Paraguai, além da predominância de litologias sedimentares recentes, dificultam o escoamento das águas da superfície, causando inundações periódicas anuais e/ou plurianuais com certa periodicidade, em que se verificam anos mais secos ou mais chuvosos (Silva e Abdon, 1998).

Durante os meses de outubro a abril, as chuvas aumentam o volume das águas dos rios, as águas extravasam seus leitos e inundam a planície pantaneira, fazendo das cheias uma

das principais características do pantanal (Meldau, 2001). É nessa época que a vida se renova no lugar. Animais buscam refúgio nas terras não inundadas, várias espécies de plantas aquáticas entram em floração e peixes se reproduzem (EMBRAPA, 2004). Quando o período das chuvas chega ao final, entre os meses de maio e setembro, as águas baixam lentamente voltando ao seu curso normal. Ficam depositados nos solos os sedimentos, nutrientes e matéria orgânica trazidos pelas cheias, necessários para a fertilização dos vários ecossistemas.

O pantanal tem como principais afluentes os rios São Lourenço (670 Km), Cuiabá (650 Km), ao norte; Miranda (490 Km), Taquari (480 Km), Coxim (280 Km), Aquidauana (565 Km), ao sul, assim como rios de menores extensões - Nabileque, Apa e Negro, os quais formam a trama hidrográfica de todo complexo pantaneiro. São cerca de 175 rios que formam a bacia do rio Paraguai (Geocites, 2008).

#### **1.1.2.5. Bacia do Rio Paraná**

O rio Paraná juntamente com seus tributários forma o maior dos sistemas fluviais que desaguam no estuário do rio La Plata. Seu curso percorre distância aproximada de 4.000 km, sendo o terceiro rio em extensão das Américas, depois do Amazonas e do Mississipi. O rio Paraná estende-se desde a confluência do rio Grande e rio Parnaíba até a sua desembocadura no rio da Plata. No seu trecho inicial recebe muitos tributários em ambas as margens e destes os mais importantes são o Tietê, o Paranapamena e o Iguazu, todos pela margem esquerda. Percorre 877.000 km em território brasileiro e banha as terras dos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo, Paraná, Minas Gerais e Goiás (Almeida, 2003)

O sistema do Alto rio Paraná (doravante Alto rio Paraná) com aproximadamente 900.000 km<sup>2</sup> inclui toda a drenagem do rio Paraná à montante do antigo Salto de Sete Quedas, agora inundado pelo Reservatório de Itaipu. Essa porção da bacia faz parte da face sul do escudo brasileiro (Bonetto, 1996)

Na bacia do rio Paraná, em seu trecho brasileiro, encontra-se a maior densidade demográfica do país. As águas da bacia são utilizadas para consumo humano e também para a indústria e irrigação. A bacia é a que sofreu maior número de represamentos para geração de energia. Existem mais de 130 barragens no seu leito, considerando apenas aquelas com alturas superiores a 10 m, que transformaram o rio Paraná e seus principais tributários em uma sucessão de lagos.

Dos 809 km originais do rio, somente 230 km ainda são de água corrente. O município de Guaíra é o trecho final de uma área navegável, mas também o início do Lago de Itaipu.

Entre os municípios de Guaíra e Foz do Iguaçu, no Estado do Paraná, ocupa 170 quilômetros de trecho contíguo aos territórios brasileiro e paraguaio, onde foi formado o reservatório para o aproveitamento hidrelétrico de Itaipu. A jusante de Itaipu, segue seu curso fazendo divisa entre Argentina e o Paraguai até receber seu maior afluente, o rio Paraguai, formando juntamente com o rio Uruguai a bacia do Prata (Bonetto, 1986)

### **1.1.3. Filogeografia de peixes de água doce**

A filogeografia é um campo de estudo relacionado com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica entre espécies próximas (Avise, 2000), como a deriva genética, fluxo gênico restrito, migração, fragmentação populacional, assim como expansões e colonizações (Cruzan e Templeton, 2000; Emerson *et al.*, 2001). Como o próprio nome diz, a filogeografia considera o espaço e o tempo para mapear a genealogia de genes de interesse, ou seja, a distribuição espacial dos alelos cujas relações filogenéticas são conhecidas ou podem ser estimadas (Avise, 2000). Além disso, análises filogeográficas apropriadas podem fornecer dados importantes com relação aos processos evolutivos que determinam os padrões contemporâneos de diversificação e separação histórica de linhagens gênicas, mesmo que estas tenham comportamento estritamente neutro. Populações historicamente isoladas são as principais candidatas a diferenças na adaptação genética, pois elas teriam tido uma exposição potencialmente longa a pressões de seleção divergentes sem a influência homogeneizadora do fluxo gênico (Avise, 2000).

Por estas razões, a filogeografia é apropriada para estudos de zonas híbridas (Hewitt, 2001, Swenson e Howard, 2005), introgressão (Hubert *et al.*, 2007) e espécies vizinhas, entre outros (Martínez-Ortega *et al.*, 2004).

Investigações moleculares entre os maiores taxons de peixes de água doce na América do Sul estão sendo cada vez mais comuns (Orti and Meyer, 1996; Farias *et al.*, 1999; Hrbek and Larson, 1999; López-Fernández *et al.*, 2005), mais relativamente poucos estudos moleculares são publicados no nível de espécie ou filogeografia intraespecífica (Dergam *et al.*, 1998; Hrbek and Larson, 1999; Lovejoy e de Araújo, 2000; Andrade *et al.*, 2001; Sivasundar *et al.*, 2001; Dergam *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Moyer *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2004; Hrbek *et al.*, 2005a,b; Renno *et al.*, 2006).

Para acessar a influência de fatores ecológicos x históricos na evolução e na biogeografia histórica de espécies amplamente distribuídas em diversos grupos de peixes

neotropicais, atualmente, vêm se usado marcadores moleculares por causa de sua capacidade de traçar eventos passados (Martin e Bermingham, 1998; Lundberg *et al.*, 1998; Strange e Burr, 1997; Lovejoy e De Araújo, 2000; Lovejoy e Collette, 2001; Sivasundar *et al.*, 2001; Montoya-Burgos, 2003; Moyer *et al.*, 2005; Albert *et al.*, 2006; Hubert *et al.*, 2007; Willis *et al.*, 2007), permitindo a construção de elos entre as evoluções geológica e biótica de uma região (Lundberg, 1993; Martin e Bermingham, 1998). Em geral, esses estudos têm concordado com os padrões de diversificação do Mioceno, descritos para táxons terrestres (Hardman e Lundberg, 2006) e com os registros geológicos (Lundberg *et al.*, 1998) e fósseis (Arratia e Cione, 1996; Gayet e Meunier, 1998; Lundberg, 1997, 1998).

Em animais, essas inferências baseiam-se em genealogias de locos de mtDNA (DNA mitocondrial) e foram impulsionadas por avanços metodológicos como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR, Saiki *et al.*, 1988) e o seqüenciamento de DNA (Sanger *et al.*, 1977). O mtDNA tem sido fonte de dados para inferências genealógicas intraespecíficas, pois oferece vantagens para análises filogeográficas no nível microevolutivo (He, *et al.*, 2008).

O código genético mitocondrial é mais degenerado e, portanto, apresenta uma taxa de diversificação maior e evolui mais rapidamente do que o código genético nuclear universal de eucariotos. Vários estudos indicam que o mtDNA possui uma taxa de evolução 5 a 10 vezes mais rápida do que genes nucleares de cópia única (Garcia-Machado *et al.*, 1996).

A utilidade do mtDNA como marcador molecular para estudos filogeográficos foi descoberta na década de 70 por Avise *et al.* (1979) no seu trabalho com camundongos. Já Browm *et al.*, (1979) descobriram a elevada taxa de evolução das seqüências do mtDNA, aproximadamente 2% de divergência por milhão de anos. Esta descoberta vai contra o princípio fundamental da evolução molecular, em que a pressão de seleção sobre um gene funcional implica numa limitação da evolução da estrutura macromolecular. Várias hipóteses foram propostas para explicar a rápida evolução do DNA mitocondrial: i) Relaxamento da restrição funcional, pois o DNA mitocondrial não codifica proteínas que estão envolvidas diretamente na sua própria replicação ou transcrição e também, uma molécula que codifica aproximadamente 13 tipos de polipeptídeos pode tolerar uma menor acuracidade na tradução ii) Elevada taxa de mutação, devido à ineficiência dos mecanismos de reparo de DNA, alta exposição a radicais livres no ambiente mitocondrial oxidativo e também a elevada replicação dentro de linhagens celulares e iii) O fato do mtDNA ser “desprotegido”, ou seja, a falta de histonas e de mecanismos de reparo, os quais são evolutivamente mais conservados e podem atuar como restrição na taxa evolutiva do DNA nuclear. Essas possibilidades não são mutuamente excludentes. Independentemente da causa, a rápida evolução de seqüências é um pré-requisito para a

utilidade do mtDNA como um marcador filogenético microevolutivo (He, *et al.*, 2008), permitindo, por exemplo, traçar histórias evolutivas em análises de alta resolução de eventos recentes (como especiação rápida), estimar a estrutura populacional, analisar eventos de hibridação, avaliar fluxo gênico entre outros (Avise, 1986, Avise *et al.*, 1987; Meyer, 1994; Avise, 2004; Clabaut *et al.*, 2005).

Apesar da rápida taxa de evolução do mtDNA, alguns genes podem ser mais conservados e isto permite uma grande plasticidade em relação às aplicações deste genoma em inferências filogenéticas, pois permite resolver divergências que ocorreram há 100 milhões de anos até variações interpopulacionais (Meyer e Wilson, 1990; Irwin *et al.*, 1991; Cantatore *et al.*, 1994; Lydeard e Roe, 1997; Akihito *et al.*, 2000; Kumazawa e Nishida, 2000; Farias *et al.*, 2001).

Em peixes, a disponibilidade de *primers* universais nas diferentes regiões mitocondriais tem ajudado a responder questões em vários níveis taxonômicos (Kocher *et al.*, 1989; Simon *et al.*, 1994; Kocher e Stepien, 1997; Palumbi *et al.*, 2002). Nesse sentido, os sítios degenerados nos genes codificadores de proteínas e a região controle são particularmente úteis para análise de divergências recentes (entre populações, espécies e gêneros).

Um dos genes mitocondriais considerado de maior utilidade para trabalhos filogenéticos é o citocromo b (Cyt-b) (Farias *et al.*, 2001). Este gene é encontrado no genoma mitocondrial de quase todos os eucariotos e em diversos procariotos, indicando uma origem muito antiga (Esposti *et al.*, 1993). Codifica uma importante proteína transmembrana da cadeia respiratória do metabolismo celular (Kocher e Stepien, 1997; Lydeard e Roe, 1997). A utilidade dele reside no fato de ser um gene com mais informações disponíveis sobre a estrutura e função de suas proteínas e, também, porque apresenta códons que podem evoluir de forma lenta ou rápida e regiões mais conservadas ou mais variáveis (Esposti *et al.*, 1993; Farias *et al.*, 2001). Essas características fazem do citocromo b uma ferramenta importante para a solução de problemas filogenéticos a nível populacional ou acima deste. Conseqüentemente, este gene tem sido utilizado para resolver problemas sistemáticos e de diversidade de filogenias profundas (por exemplo, Meyer and Wilson, 1990; Irwin *et al.*, 1991; Cantatore *et al.*, 1994; Lydeard and Roe, 1997; Kumazawa and Nishida, 2000) a divergências recentes no nível populacional (Kirchman *et al.*, 2000; Lovejoy e de Araujo, 2000). Entretanto, existe um consenso de que ele é mais informativo em escalas de tempo relativamente recentes (10-15 Ma), por conta da rápida saturação na terceira base do códon (Brown *et al.*, 1982; Irwin *et al.*, 1991; Meyer, 1994; Honeycutt *et al.*, 1995; Griffiths, 1997).

Não obstante, o uso do Cyt-b tem apresentado muitos problemas que incluem o viés na composição das bases, variação entre linhagens, saturação da terceira posição do codon, e a variação limitada na primeira e segunda posição, tendo por resultado pouca informação filogenética para perguntas evolutivas “profundas”, ou poucos locais informativos para a terceira posição do codon no nível de população (Meyer, 1994). Por estas razões, a utilidade desse gene como marcador filogenético para todos os níveis filogenéticos tem sido questionado (Hillis and Huelsenbeck, 1992; Meyer, 1994; Honeycutt *et al.*, 1995).

Outro problema é que a herança materna reflete apenas um painel da evolução, ou seja, a história matrilinear da herança, que pode diferir daquela da população ou da espécie. Estas características podem afetar a fidedignidade da estimativa da árvore da espécie entre as possíveis árvores de genes (Moore, 1995; Foster e Hickey, 1999; Lopez *et al.*, 2002).

Entretanto, essas limitações têm sido contornadas pelo crescente uso de locos nucleares em reconstruções filogenéticas. A utilidade desses marcadores tem sido demonstrada em estudos empíricos e, associados aos marcadores mitocondriais, podem revelar diferentes aspectos de uma história complexa em diferentes níveis de percepção (Brower *et al.*, 1996; Hare, 2001). Além desses marcadores, a nova geração de estudos filogeográficos também incorporou metodologias de análises fundamentadas na teoria da coalescência (Kingman, 1982), utilizando cálculos complexos que permitem a interpretação dos padrões filogeográficos dentro do contexto de modelos evolutivos e biogeográficos (Templeton, 1998; Wakeley e Hey, 1997; Wakeley, 1998; Beerli e Felsenstein, 1999; Arbogast e Kenagy, 2001).

Os locos nucleares são a única opção de réplica às genealogias de mtDNA em animais, e fundamentais para abordagens filogeográficas mais amplas, na forma de testes de histórias complexas (Fu e Li, 1999; Hare, 2001).

Em peixes, o uso dessas seqüências em estudos filogenéticos teve início com os genes ribossomais (Stock e Whitt, 1992; Phillip e Oakley, 1997) e, desde então, outros locos têm sido investigados, como o MHC (MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX) (Klein *et al.*, 1997), as quinases (Parker, 1997; Meyer e Lydeard, 1993; Banford *et al.*, 2004), a epidimina (Ortí e Meyer, 1996), o hormônio do crescimento (Bernardi *et al.*, 1993), o fator-1 $\alpha$  de alongação (EF1 $\alpha$ -6, Moyer *et al.*, 2004), o RAG (RECOMBINATION ACTIVATION GENES) (Sullivan *et al.*, 2000; Lovejoy e Collette, 2001; Hardman, 2002; Hardman e Page, 2003; Hardman, 2004; Grande *et al.*, 2004; Lavoué e Sullivan, 2004; López *et al.*, 2004; Quenouille *et al.*, 2004; Calcagnotto *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2005; Hardman e Lundberg, 2006; Sullivan *et al.*, 2006) O gene da ativação da recombinação, Rag 1, junto com o Rag 2,

pensa-se que tenha sido entrado no genoma de um organismo ancestral 450 milhões de anos atrás, logo após da divergência dos vertebrados mandibulados e não mandibulados; ambos os genes tem permanecido juntos um do outro a traves da evolução. Atuando juntas, as proteínas RAG 1 e RAG 2 funcionam similarmente à transponasa bacteriana TN10 e são capazes de clivar o DNA em uma seqüência específica. Eles mediam a recombinação V(D)J, e assim são responsáveis pela produção de anticorpos e receptores de células T. Como resultado, cada célula imune expressada pelo RAG1 apresenta uma identidade diferente, caracterizada por uma permanente mudança no genoma, assim como nas proteínas expressadas na membrana. Mutações no RAG 1 ou RAG 2 leva a imunodeficiência ( Feng *et al.*, 2005) e o gene nuclear S7 que codifica para uma proteína ribossomal (Chow e Hazama 1998; Cooke e Beheregaray, 2007; Gaffney, 2007; He *et al.*, 2008; Musilová, 2008; Ray *et al.*, 2008).

Entretanto, estudos de estrutura populacional e reconstruções filogenéticas entre espécies estreitamente relacionadas exigem regiões de maior variabilidade como os íntrons (Lessa, 1992; He e Haymer, 1997; Friesen, 2000), regiões intercaladas aos éxons de genes eucariotos removidas durante a maturação do RNA precursor (Zhang e Hewitt, 2003), que evoluem três vezes mais rápido que os éxons, em um comportamento semelhante às terceiras posições dos códons (Palumbi, 1995; Venter *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2002).

Embora seja crescente o uso dos polimorfismos de locos nucleares para reconstruções filogenéticas, há desafios analíticos e metodológicos a serem enfrentados como a recombinação, seleção, heterozigosidade, indels e baixas divergências (Brown *et al.*, 1979; Clark, 1990; Palumbi e Baker, 1994; Orti *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999; Schierup e Hein, 2000; Posada, 2001; Antunes *et al.*, 2002; Zhang e Hewitt, 2003), que podem confundir a interpretação dos resultados. Eles podem, ainda, sofrer taxas de mudanças moldadas por forças evolutivas de efeitos amplos (deriva e efeitos gargalos) ou mais localizados (recombinação, seleção) (Avice, 1989; Zhang e Hewitt, 2003), que dificultam a escolha da história evolutiva mais provável do grupo. Além disso, em teoria, espera-se uma estrutura filogeográfica menos pronunciada em locos nucleares autossômicos (Moore, 1995; McCauley, 1995) por causa do maior  $N_e$  (tamanho efetivo populacional) desse genoma, em comparação com o mtDNA, permitindo à deriva genética diferenciar populações mais lentamente (Templeton, 1998). Entretanto, a baixa taxa de evolução do DNA nuclear minimiza homoplasias entre taxons filogeneticamente mais distantes (Avice, 2004; Li *et al.*, 2007), e, embora a separação dos polimorfismos seja mais lenta, a informação temporal retida pelas genealogias nucleares permite que processos populacionais que ocorreram antes, durante e após eventos de especiação sejam estudados (Hoelzer, 1997; Wakeley e Hey, 1997;

Nichols, 2001). Além disso, as genealogias nucleares oportunizam, ainda, o estudo de fluxo gênico diferencial entre locos, podendo explicar os mecanismos de especiação, se houver padrões de diferenciação específicos, mediados por seleção, em alguns deles (Hare, 2001).

#### **1.1.4. Marcadores Moleculares em Estudos Populacionais de Peixes de Águas Continentais**

A utilização de técnicas de biologia molecular em estudos sobre populações naturais e cultivadas de peixes tem aumentado intensivamente, o que permitiu uma exploração da fonte original de variabilidade, abrindo assim, um novo horizonte para o conhecimento dos recursos genéticos existentes na natureza. Desta forma, atualmente, diversos marcadores moleculares estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética, dentre os quais, destacam-se os microssatélites (Tautz e Renz, 1984).

Os marcadores microssatélites vêm sendo intensamente utilizados em estudos populacionais, na identificação de populações de peixes, na verificação de relações filogenéticas entre espécies e na verificação da segregação reprodutiva entre populações reprodutivamente isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (Bernatchez *et al.*, 1998; Triantafyllidis *et al.*, 2002; Chihard *et al.*, 2005; Salgueiro *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2003; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Hatanaka *et al.*, 2006; Sanchez, 2007; Benites, 2008).

Seu sucesso se deve a sua abundância e grande distribuição, detecção de alto grau de polimorfismo, além da herança mendeliana e segregação co-dominante, sendo possível a identificação dos heterozigotos. Esses fatores combinados ao multialelismo dos microssatélites os colocam como o marcador molecular com maior conteúdo de informação de polimorfismo, extremamente útil para caracterização da estrutura genético-populacional de uma espécie (por exemplo, Hatanaka *et al.*, 2006; Sanches, 2007).

O isolamento e caracterização de seqüências microssatélites, apesar de serem ainda escassos no Brasil (Calcagnotto *et al.*, 2001; Hatanaka *et al.*, 2006; Barroso *et al.*, 2003; Farias *et al.*, 2003; Moysés *et al.*, 2005; Revaldaves *et al.*, 2005; Barbosa *et al.*, 2006; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Sanches e Galetti, 2006) são extremamente úteis e importantes principalmente para estudos de conservação da ictiofauna, já que são eficazes na detecção de variabilidade intra e interpopulacional.



O principal inconveniente da utilização de marcadores microsatélites é que eles precisam ser isolados de novo para a maioria das espécies a ser examinada pela primeira vez. Conseqüentemente, a estratégia de desenho de *primers* universais complementares a seqüências conservadas, que foi muito eficaz para o DNA mitocondrial (Kocher et al. 1989), é mais problemática para os microsatélites. No entanto, a presença de regiões flanqueadoras altamente conservadas tem sido relatada para alguns locos microsatélites em cetáceos (Schlotterer *et al.*, 1991), tartarugas (Fitzsimmons *et al.*, 1995) e peixes (Rico *et al.*, 1996), permitindo a amplificação heteróloga a partir de espécies que divergiram, por muito, uns 470 milhões de anos atrás (Ma) (Zane *et al.*, 2002).

Tendo em vista a importância ecológica e econômica dos grandes bagres migradores nos diferentes sistemas hidrográficos e considerando a forte ação antrópica negativa sobre seus habitats, é muito importante reconhecermos as unidades genéticas/populações existentes para contribuirmos em programas de conservação que considerem o pool gênico total da espécie.

## **1.2. Objetivos**

Considerando os aspectos abordados acima, pretende-se responder as seguintes questões:

- Dadas as incertezas taxonômicas encontradas no gênero *Zungaro*, será que este está mesmo conformado por duas espécies ou são simplesmente populações diferentes?
- Considerando o fato do jaú ser um peixe de grande porte e, aparentemente, de grandes migrações, existe estruturação das populações?
- Conhecendo a condição de espécie ameaçada e dadas as alterações de habitat sofridas e a sobrepesca, será que isso já está refletindo numa redução da variação genética desses bagres?

De tal modo, o presente estudo visa fornecer subsídios aos estudos de conservação e manejo deste grupo de peixes, contribuindo de maneira efetiva para a manutenção da biodiversidade deste ecossistema.

### 1.3. Material e métodos

Para o presente estudo foram analisadas amostras das espécies *Z. zungaro* e *Z. jahu* sendo estas as duas únicas espécies pertencentes ao gênero *Zungaro* o qual se encontra distribuído por toda América do Sul.

#### 1.3.1 Área de estudo

Especímenes da espécie *Z. zungaro* foram coletados na bacia do rio Orinoco, especificamente no rio Meta, próximo à cidade de Villavicencio, Colômbia, e na bacia do Amazonas, no rio Amazonas, próximo à cidade de Tabatinga. Foram coletadas amostras de 6 exemplares no rio Meta e 14 exemplares no rio Amazonas (Fig 2.1.). As amostras dos exemplares da espécie *Z. jahu* foram coletadas em duas regiões diferentes. Uma amostra de 26 indivíduos foi coletada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Pantanal durante os anos de 2000 - 2003 na bacia do rio Paraguai, especificamente nos rios Cuiabá, São Lourenço, Taquari e Miranda, as quais se encontravam na coleção de referência da instituição. Outra amostra de 6 indivíduos de cativerio da bacia do Paraná (Fig. 1.2). Os exemplares não foram sacrificados coletando somente fragmentos de nadadeira. Por não serem sacrificados não foi possível verificar o sexo dos exemplares.

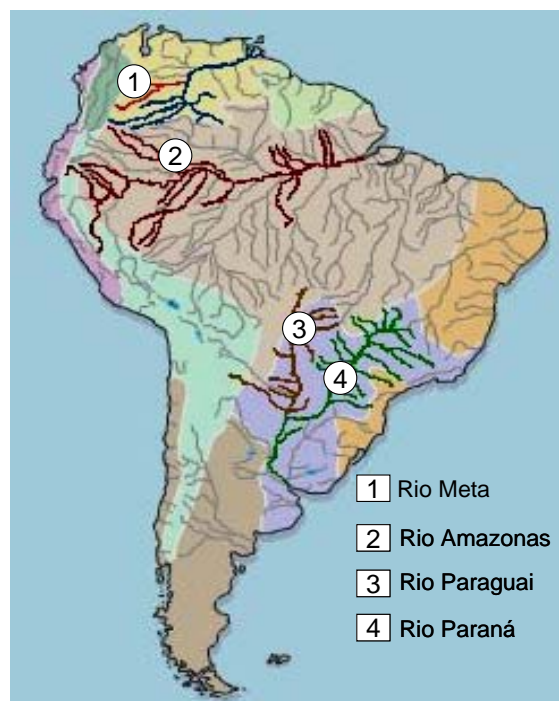


Figura 1.2. Localização dos locais de coleta das amostras de jaú (Mapa copyright © 2003 Marc Elicson).

### 1.3.2. Extração e quantificação do DNA

O DNA foi extraído a partir de tecidos sólidos como músculo e nadadeira fixados em etanol 95 % e seguiu-se o método de Sambrook et al. (1989) com algumas modificações:

Aproximadamente 100 mg de tecido foram macerados em nitrogênio líquido com auxílio de um bastão. Posteriormente, adicionou-se 600 µl de solução de digestão (NaCl 0,4 M; EDTA 0,1 M pH 8,0, Proteinase K 100 µl/ml e SDS 0,1%). Em seguida, esta solução foi levada ao banho-maria a 50°C, durante 4 horas. Após este tempo, foi acrescentado ao tubo de centrífuga um volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) igual ao da solução homogeneizada, e o tubo foi agitado suavemente durante 30 minutos. Em seguida, centrifugado a 10.000 rpm em centrífuga clínica por 10 minutos e o sobrenadante transferido para um tubo limpo. Posteriormente, acrescentou-se NaCl 1M e 2 volumes de etanol absoluto gelado para precipitação do DNA. O material foi centrifugado a 10.000 rpm em centrífuga clínica e em seguida, o sobrenadante foi descartado. O *pellet* lavado com etanol 70%, em seguida centrifugado a 10.000 rpm em centrífuga clínica por 5 minutos e o sobrenadante foi descartado. O DNA deixou-se secar em estufa a 37°C e posteriormente foi ressuscitado em TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM pH 8,0). Em seguida, a amostra foi tratada com 2 µl de RNase (20 mg/ml) a 37°C por 1 hora o DNA foi armazenado em *freezer* a -20°C.

A quantificação e verificação da qualidade do DNA das amostras foram analisadas, após a eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

### 1.3.3. Amplificação das seqüências de DNA mitocondrial e nuclear

#### 1.3.3.1. Gene mitocondrial citocromo b

Foram amplificadas, via PCR, seqüências mitocondriais do gene do citocromo B (cit-b) por meio de *primers* universais: GludgL:5'TGACTTGAARAACCAAYCGTTG3'; H15915: 5'AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC 3' (Palumbi *et al.*, 2002; Irwin *et al.*, 1991) em volume final de 30 µl contendo 10-50 ng de DNA, 100 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (Fermentas Life Sciences, Invitrogen Life Technologies). As reações foram conduzidas em termociclador PTC100 (MJ

Research) e Mastercycler (Eppendorf) e o programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 1 min a 94°C, 45 s a 49 °C, 45 s a 72°C; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 10 min.

### 1.3.3.2 Gene nuclear RAG

O loco nuclear escolhido foi o primeiro íntron do gene RAG1 (gene ativador da recombinação) (int1RAG1) cujos *primers* (RAG1X1F: GCTGGCAGACAAGTGGATCT; RAG1X2:AGGCCATCTAGAAGCCTTGC) foram desenvolvidos por Carvalho-Costa (com. pers). As reações foram feitas em volume final de 30 µl contendo 10-50 ng de DNA, 100 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,2 µM de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (Fermentas Life Sciences, Invitrogen Life Technologies). As reações foram conduzidas em termociclador PTC100 (MJ Research) e Mastercycler (Eppendorf) e o programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 58 °C, 30 s a 72°C; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 5 min. Para cada rodada de reações foi utilizado um controle negativo.

### 1.3.3.3. Gene Nuclear S7

Para a amplificação do primeiro intron (RP1) do gene nuclear que codifica para a proteína ribossomal S7 foram utilizados os *primers*, RPEX1F: 5'-TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC-3' e S7RPEX2R 5'-AACTCGTCTGGCTTTTCGCC-3' (Chow e Hazama, 1998). As reações foram feitas para um volume final de 30 µl contendo 10-50 ng de DNA, 200 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,67 µM de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies). As reações foram realizadas seguindo Chow e Hazama (1998) em um termociclador PTC100 (MJ Research) e Mastercycler (Eppendorf) e o programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 64 °C, 2 min 72°C; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 10 min. Para cada rodada de reações foi utilizado um controle negativo.

Após a cada reação de PCR, 3 µl de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (1 mg/ml), e submetidos à eletroforese (80 Volts por 45

minutos). Posteriormente, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado (Kodak 1D 3.5), tendo como referência de tamanho para os amplicons um marcador de 1 Kb (Kilobase, Invitrogen Life Technologies).

#### 1.3.4. Purificação e seqüenciamento dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados mediante kit de purificação específico (GFX PCR DNA e Gel band, GE inc.) da seguinte maneira:

- 1-Colocou-se uma coluna GFX em um tubo para cada purificação a ser feita;
- 2-Adicionou-se 500 ul de *capture buffer* à coluna GFX;
- 3-O produto da PCR (até 100 ul) foi transferido para a coluna GFX;
- 4-Misturou-se as soluções com micropipeta;
- 5-As amostras foram centrifugadas em velocidade máxima por 30 seg;
- 6-O sobrenadante do tubo foi descartado e a coluna GFX recolocada no mesmo;
- 7-Adicionou-se 250 ul de *wash buffer* à coluna;
- 8-As amostras foram centrifugadas em velocidade máxima por 30 seg;
- 9-O tubo foi descartado e a coluna GFX transferida para um microtubo de 1,5 ml;
- 10-Adicionou-se 10-50 ul de tampão de eluição (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0; TE pH 8,0; ou água autoclavada duplamente destilada) diretamente em cima da matriz de fibra de vidro da coluna GFX;
- 11-A amostra foi incubada à temperatura ambiente por 1 min;
- 12-Centrifugaram-se as amostras, em velocidade máxima, por 1 min para recuperar o DNA purificado.

Os fragmentos foram seqüenciados pelo método enzimático de terminação de cadeia. Para os dois marcadores, utilizou-se os mesmos *primers* da PCR para a reação de seqüenciamento, sendo que apenas para o citocromo foi empregado um *primer* interno, desenhado especialmente para Zungaro nesse trabalho (Zjahu-F: 5' GTACTACCATGGGGACAAAT-3). O *Kit* de seqüenciamento foi o *EtDye* (*GE HealthCare*) e o seqüenciador automático, o ABI 377 (*Applied Biosystems Inc.*). Para cada amostra estabeleceu-se uma seqüência consenso no programa CODONCODE ALIGNER (LI. COR, Inc),

que foram posteriormente alinhadas no aplicativo CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994), presente no BIOEDIT (Hall, 1999).

### 1.3.5. Isolamento e caracterização de microssatélites

Para o isolamento de locos de microssatélite foi utilizado o método baseado no enriquecimento com sondas biotinizadas e captura por meio de *beads* magnéticos (Hamilton et al. 1999), seguindo algumas modificações.

Cerca de 4µg de DNA foi digerido com as enzimas de restrição Rsa I e BstU I (*New England Biolabs Inc.*), seguindo-se as recomendações do fabricante. Os fragmentos com tamanhos entre 300 e 800pb foram isolados (Fig. 1.3) utilizando-se o *kit* Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) *QIA quick Gel Extraction (Quiagen)* e diluídos num volume final de 25µl de H<sub>2</sub>O Nuclease-free 20µl de tampão TE.

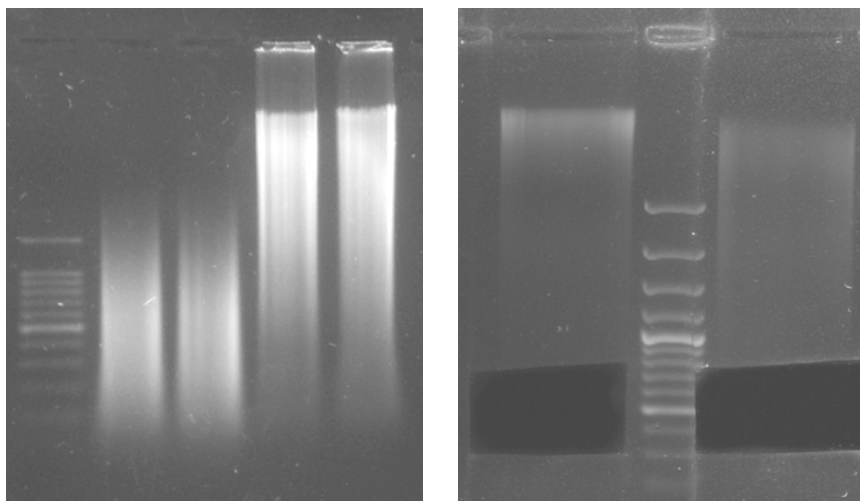


Figura 1.3. Recuperação de fragmentos de DNA digerido de jaú.

Em seguida, os fragmentos de DNA foram ligados a oligonucleotídeos fosfatados dupla fita (5' -GTT TAA GGC CTA GCT AGC AGA ATC- 3' e 3' -CAA ATT CCG GAT CGA TCG TCT TAG- 5' + 4P), em ambas as extremidades, utilizando-se 7,0 µl dos oligonucleotídeos dupla fita; 2,0 µl da enzima T4 DNA ligase (*Promega*); 1,5 µl de tampão da enzima; 4,5 µl de H<sub>2</sub>O e 20µl do DNA digerido anteriormente isolado. Estes componentes foram incubados *overnight* a 16°C.

O DNA contendo os oligonucleotídeos foi hibridizado a um conjunto de oito sondas biotinizadas para microssatélites tetranucleotídeos -(AAAC)<sub>6</sub>; (AAAG)<sub>6</sub>; (AATC)<sub>6</sub>; (AATG)<sub>6</sub>; (ACCT)<sub>6</sub>; (ACAG)<sub>6</sub>; (ACTC)<sub>6</sub>; (ACTG)<sub>6</sub>- utilizando-se 25 µl de solução Hyb (12x SSC, 0,2% SDS); 5 µl de uma mistura das sondas biotinizadas (10 µM de cada uma delas); 10 µl do DNA+oligonucleotídeos e 10 µl de H<sub>2</sub>O.

A hibridização foi realizada em um termociclador PTC 100 (*MJ Research*), programado para uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguido de uma rápida queda de temperatura para 70°C, e reduções de 0,2°C a cada 5 segundos por 99 ciclos, atingindo a temperatura de 50,2°C. Em seguida, a temperatura foi mantida a 50°C por 10 minutos, sendo posteriormente reduzida em 0,5°C a cada 5 segundos até atingir 40°C, e finalmente 15°C.

Após esta etapa, um total de 50 µl de uma suspensão contendo *beads* magnéticos marcados com *streptavidin* (*Streptavidin Magnosphere Paramagnetic Particules-Promega Dynabeads M-280 streptavidin, Dynalbiotech*) previamente preparados (lavados em tampão TE e em solução Hyb, precipitados com coluna magnética e resuspensos em solução Hyb), foi adicionado a 50 µl da mistura de DNA+sondas e incubados temperatura ambiente por 10-15 minutos. Após este tempo, os tubos foram misturados por inversão durante 2 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e os *beads* lavados por 4 vezes com solução de lavagem (0,1xSSC). Depois da lavagem final, o sobrenadante é descartado sem ressuspender as partículas. Posteriormente são adicionados 100 µl de H<sub>2</sub>O misturando suavemente.

Em seguida, os *beads* foram capturados e o DNA eluído foi transferido para um novo tubo onde foi adicionado 25 µl de NaOAc (3M) e 550 µl de etanol 95%. Após uma centrifugação de 10 minutos o sobrenadante foi descartado e o DNA lavado em 0,5 ml de etanol 70%. O *pellet* formado ressuspensionado em 25 µl de tampão TLE.

Cerca de 5 µl do DNA enriquecido foi amplificado utilizando-se 5 µl de tampão de amplificação 10X; 5 µl de BSA, 150 µM de dNTPs; 0,5 µM do oligonucleotídeo não fosfatado; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,3 µl de Taq polimerase (5U/µl) e 25 µl de H<sub>2</sub>O. O termociclador foi programado com uma desnaturação inicial de 95°C por 2 min, e 25 ciclos de 95°C por 20 s, 60°C por 20 s e 72°C por 1,5 min, seguido de uma extensão final de 72°C por 30 min. O produto de PCR foi ligado e clonado utilizando-se o *kit pGEM-T Vector Systems- Promega*.

Para a transformação das bactérias 2 µl da ligação foram adicionados a 200 µl de uma suspensão de bactérias competentes DH5  $\alpha$  (*E.coli*). A mistura foi incubada em gelo por 20 minutos e posteriormente exposta a um choque térmico a 42°C, em banho -Maria por 50

segundos. Em seguida a mistura foi novamente colocada em gelo por 2 minutos. As bactérias transformadas foram postas para crescer em 950 µl de meio líquido CG por uma hora e meia a 37°C com agitação.

Em quanto isso, foram preparadas duas placas para o plaqueamento dos clones.

Cada placa continha 25 ml de meio Lura-Bertani (LB) agar sólido com ampicilina na concentração 1µl/ml. Quinze minutos antes da transferência das bactérias, 125 µl de X-Gal foram espalhados com auxílio de uma Alça de Drigalski sobre o meio sólido das placas. Uma vez secaram as placas foram espalhados 250 µl de IPTG em cada uma delas.

A solução com as bactérias foi centrifugada por 10 minutos e o sobrenadante descartado. O pellet foi diluído em 200 µl de meio CG e 100 µl foram espalhados em cada com auxílio de uma Alça de Drigalski em cada placa. As placas foram colocadas em estufa a 37°C *overnight* para o crescimento das colônias. Cada colônia recombinante (branca) foi transferida a uma placa LB ágar réplica (ampicilina 100 µg/mL) e a 1 poço dos 96 existentes em placas de crescimento (*mega-titer plate – Applied Biosystem*), contendo 1mL de meio líquido *Circle Grow* e ampicilina (100 µg/ml). Foram selecionadas colônias até que se completassem os 96 poços da placa de crescimento. Efetuou-se o crescimento *overnight* a 37°C das colônias de ambas as placas, sendo que a placa de crescimento foi mantida em agitação. A partir dessas colônias positivas foram realizadas minipreparações para purificação dos plasmídeos para então, serem seqüenciados.

As minipreparações em placa foram realizadas seguindo o seguinte protocolo:

- Remover a cultura do shaker e checar a uniformidade do crescimento.
- Centrifugar a 4000 R.P.M. a 20 °C por 6 minutos. Enquanto isso ligar a estufa a 90 °C.
- Remover o adesivo e descartar o sobrenadante. Colocar a placa virada para baixo sobre o papel toalha e deixar por um tempo.
- Adicionar 240 µL de GTE em cada orifício. Selar a placa com adesivo fino e levar ao vortex até ressuspender todas as células.
- Centrifugar a 4000 R.P.M. a 20 °C por 6 minutos.
- Remover o adesivo e descartar o sobrenadante. Colocar a placa virada para baixo sobre o papel toalha e deixar por um tempo.
- Adicionar 80 µL de GTE em cada orifício. Selar a placa e levar ao vortex até ressuspender todas as células.



- Transferir 60  $\mu\text{L}$  das células para a placa fosca c/fundo em U.
- Adicionar 5  $\mu\text{L}$  de RNase (10 mg/ml).
- Adicionar 60  $\mu\text{L}$  da solução de NaOH / SDS em cada orifício.
- Selar a placa com o adesivo e inverter 10 X.
- Deixar a placa sobre a bancada por 10 minutos. Dar um pulso a 700 R.P.M.
- Adicionar 60  $\mu\text{L}$  de Acetato de potássio (KoAc 3M) 4° C, em c/ orifício.
- Selar a placa e inverter 10 X.
- Deixar a placa sobre a bancada por 10 minutos. Dar um pulso a 700 R.P.M.
- Remover o adesivo e deixar a placa a 90°C por EXATAMENTE 30 minutos. OBS: Passado esse tempo, colocar a estufa a 50°C
- Colocar a placa em gelo por 10 minutos. Centrifugar a 4000 R.P.M. a 20°C por 10 minutos.
- Juntar a placa com filtro e a que tem o fundo em V com fita crepe deixando bem alinhado.
- Transferir todo o volume do sobrenadante para a placa com filtro. Cuidado p/não remover o pellet. Centrifugar a 4000 R.P.M. a 20 °C por 6 minutos.
- Remover e descartar o filtro. Adicionar 110  $\mu\text{L}$  de isopropanol gelado.
- Selar a placa com adesivo grosso e misturar por inversão 10-20X
- Centrifugar a 4000 R.P.M. a 20 °C por 45 minutos.
- Remover o sobrenadante e adicionar 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70% gelado.
- Centrifugar a 4000 R.P.M. a 20 °C por 10 minutos. Remover o sobrenadante.
- Inverter a placa sobre um papel toalha embaixo.
- Dar um pulso a 700 R.P.M.
- Deixar a placa secando por 10 minutos a 50° C
- Dissolver o DNA com 20  $\mu\text{L}$  de H<sub>2</sub>O
- Deixar a placa “overnight” a 4° C.

Os insertos foram seqüenciados utilizando-se o kit *DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing* (Amersham Biosciences), seguindo-se as especificações do fabricante em seqüenciador automático AB 377 (Applied Biosystems, Inc) do Laboratório de Biologia Molecular da UFSCar do Prof, Dr. Flávio Henrique da Silva.

### 1.3.6. Validação das seqüências identificadas

A identificação dos diferentes locos de microssatélites foi realizada com a ajuda do software *Tandem Repeats Finder* (Benson, G. 1999) e os pares de *primers* específicos foram construídos com base nas regiões flanqueadoras de cada uma das seqüências isoladas com o auxílio do programa *Primer3*. (Rozen, S. and H. J. Skaletsky. 2000). Alternativamente o set de seqüências foi analisado pelo software CID (Freitas *et al* 2007) que tem por finalidade extrair os vetores, encontrar as seqüências que contém microssatélites e desenhar os *primers* nas regiões flanqueadoras dos mesmos.

Para amplificação dos locos microssatélites, variações no ciclo da PCR e nas concentrações dos reagentes foram testadas. Após estabelecimento do melhor perfil de reação, amostras de DNA pertencentes a diferentes indivíduos foram amplificadas para verificação de polimorfismos.

### 1.3.7. Caracterização dos microssatélites

#### 1.3.7.1. Determinação da temperatura ótima de anelamento.

Inicialmente, foi verificada a temperatura ótima de anelamento dos locos microssatélites mediante reações de PCR realizadas em um termociclador de gradiente Mastercycler (*Eppendorf Inc*).

Posteriormente, as amplificações foram realizadas em termociclador PTC-100 (*MJ Research*) seguindo as seguintes condições, 10-50 nanogramas de DNA amplificado em um volume final de 10  $\mu$ L contendo, 1x PCR buffer ( Tris-HCl 200 mM pH, 8,4, KCL 500mM, *Invitrogen Life Technologies*) 0.75 - 1.5 mM, MgCl<sub>2</sub>, 125 $\mu$ M de cada dNTP, 8 pmol de *primer* reverse, 2 pmol de *primer* forward e 8 pmol de *primer* M13 marcado com fluoroforo e 0,5 U Tag DNA polimerase (*Invitrogen Life Technologies*). As amplificações foram realizadas utilizando um termociclador PTC-100 (*MJ Research*). As condições de amplificação foram 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos na temperatura de *annealing* de cada *primer* e 45 segundos a 72°C seguido de uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

A fim de reduzir os custos na hora da genotipagem durante todas as amplificações foi seguido o protocolo desenvolvido por Schuelke (2000). Este protocolo consiste em adicionar

na posição 5'-3' de um dos *primers* uma cauda universal M-13 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), o *primer* com a cauda dependerá de uma análise prévia de *hairpin* realizada no site da *Integrated DNA Technologies* ([www.idtdna.com](http://www.idtdna.com)). Uma seqüência M-13 marcada com fluorescência e adicionada à reação. Este terceiro *primer* precisa de um novo ciclo de amplificação na mesma PCR realizada para a amplificação do fragmento de interesse. O ciclo consiste de 8 ciclos, a 94°C por 30 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos, com uma extensão final a 72°C por 10 minutos (Schuelke 2000). A incorporação do *primer* M13 à cauda é que permite que o fragmento amplificado seja detectado pelo sistema de laser do seqüenciador automático (Fig. 1.4).

Este método torna-se mais econômico porque permite que um único *primer* universal seja marcado com fluorescência. Adicionalmente, também existe a possibilidade de análise simultânea de diferentes locos. Para tanto, basta solicitar a construção de *primers* universais M13 cada um marcado com uma fluorescência específica (e.g. FAM, HEX, TET, NED).

Os produtos das reações foram verificados em eletroforese horizontal em gel de agarose 1% e visualizados em transluminador de luz ultravioleta. Quando necessário esses géis foram fotografados por sistema de captura de imagem e registrados pelo programa KODAK 1D 3.5 .

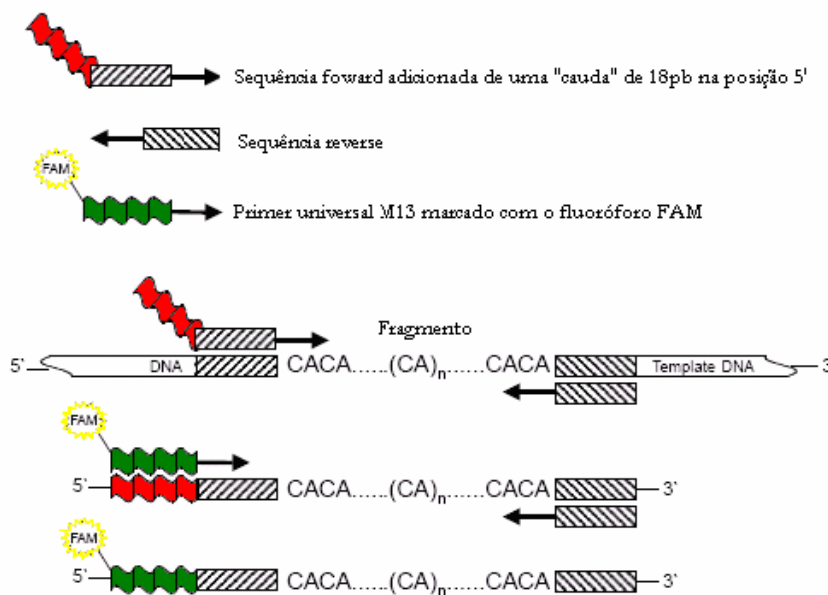


Figura 1.4. Esquema ilustrando o funcionamento do protocolo desenvolvido por Schuelke (2000) para amplificação de um fragmento de interesse juntamente com a cauda M13 marcada com fluorescência. Modificado de Schuelke (2000).

### **1.3.7.2. Padronização das reações**

Definida a temperatura de anelamento ótima de cada par de *primers*, foram testadas concentrações de DNA (5, 10, 25 e 50 ng/μl) e de cloreto de magnésio (0,75 a 2 mM) nas temperaturas de anelamento ótimas determinadas anteriormente para cada par de *primers*.

### **1.3.7.3. Análise do perfil polimórfico dos locos em gel de agarose**

Tendo a reação já otimizada, um mínimo de dez amostras de DNA foram amplificadas para a análise do perfil polimórfico dos locos selecionados, com o intuito de verificar quais eram polimórficos e conseqüentemente candidatos para a futura análise populacional. O exame do polimorfismo de cada loco foi efetuado em gel de agarose 2.5 – 3 %. Os locos polimórficos foram selecionados para a análise populacional.

### **1.3.7.4. Genotipagem dos locos polimórficos**

As reações de genotipagem foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP que utiliza um seqüenciador MegaBACE 1000, com um sistema de análise de DNA de 96 capilares com tecnologia *GE Healthcare* (antiga *Amersham Biosciences*).

## **1.3.8. Análises estatísticas**

### **1.3.8.1. Análise dos dados para os genes mitocondrial e nucleares**

A caracterização do polimorfismo (identificação dos haplótipos, frequências relativas, número de sítios polimórficos, distâncias genéticas) do citocromo b, do íntron 1 da RAG1 e do gene nuclear S7 (exceto a identificação de todos os haplótipos) foi conduzida por meio dos programas MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), DNASP 4.10 (Rozas *et al.*, 2003) e/ou Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). A polaridade das árvores filogenéticas foi

determinada por comparação com grupo externo (Nixon e Carpenter, 1993) com seqüências homólogas de *Pseudoplatystoma sp* e *Brachyplatystoma sp*.

Desvios da premissa de neutralidade seletiva foram estimados pelos testes D de Tajima (Tajima, 1989),  $F^*$  e  $D^*$  (Fu e Li, 1993) e  $F_s$  (Fu, 1997), presentes no programa DnaSP 4.10. (Rozas et al., 2003). 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 “*background selection*”. Valores de  $F_s$  significativos e  $D^*$  e  $F^*$  não significativos indicam expansão demográfica, enquanto que o caso contrario sugere que os efeitos da seleção são mais pronunciados. A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“*mismatch distribution*”) foi calculada como um teste adicional para inferências de expansão populacional (Rogers e Harpending, 1992) utilizando o programa DnaSP. Populações estáveis geralmente apresentam gráficos com padrões de curvas bi- ou multimodais, enquanto que, curvas unimodais são frequentemente observadas em populações que sofreram expansão demográfica recente (Rogers e Harpending, 1992; Harpending, 1994). 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.

Uma rede de haplótipos que ilustra as interações filogenéticas entre os haplótipos observados foi estimada utilizando o programa network (Fluxus Technology Ltd.).

A história evolutiva foi inferida por meio de uma árvore de *neighbor-joining* (software DNAsp). Indels foram considerados apenas para a árvore do primeiro íntron da RAG1 e do gene S7. As análises foram todas feitas no MEGA versão 4.0 (Tamura et al. 2007). O suporte para os nós foi avaliado por *bootstrap* (1000 pseudo-réplicas) (Felsenstein, 1985) e interpretados segundo Hall (2001), que considera um valor igual ou superior a 90-95% para que um agrupamento seja considerado como significativamente apoiado, independentemente da repetibilidade.

### **1.3.8.2. Análise dos dados para a caracterização populacional com microssatélites**

Para as análises baseadas em microssatélites foram utilizados os locos prospectados e validados neste estudo.

### **1.3.8.3. Caracterização da variabilidade genética**

Com a finalidade de se avaliar a variabilidade genética em cada uma das localidades estudadas foram calculados dados sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p \leq 0,05$ ), que tem como hipótese nula a união aleatória de gametas, avaliado por meio de um teste análogo ao exato de Fisher (Guo e Thompson 1992), sendo a significância de “p” calculada pelo método da cadeia de Markov-Monte Carlo, utilizando-se o programa GENEPOP 3.4. Com o mesmo software também foram calculadas as frequências alélicas, heterozigosidades esperadas e observadas, assim como a presença de desequilíbrio de ligação o qual é calculado por meio de tabelas de contingência para cada par de locos, utilizando-se o *Fisher exact test* para estimar se os genótipos de um loco é independente do outro loco em termos de frequência de ocorrência. O mesmo programa foi utilizado para verificar a presença de desequilíbrio de ligação. O programa cria tabelas de contingência para cada par de locos, realiza um teste de probabilidade (ou teste exato de Fisher) para cada tabela e pela cadeia de Markov são estimados os valores de P que indicam se as frequências genotípicas entre os dois locos são independentes.

As estimativas de riqueza alélica (Petit et al. 1998), e os valores de diversidade gênica (Nei, 1987) foram obtidos por meio do programa FSTAT (Goudet, 2001). Estes parâmetros são independentes do tamanho amostral, e por isso podem ser comparados mesmo entre amostras de diferentes tamanhos, ao contrário dos valores obtidos com a heterozigosidade e do número de alelos, a diversidade gênica e a riqueza alélica

Em todas as análises múltiplas efetuadas foi considerada a correção seqüencial de Bonferroni (Rice 1989).

A diferenciação populacional foi estimada pelos índices de fixação de Wright  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  para cada loco entre as populações com a utilização do programa FSTAT.

O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) (Weir e Cockerham, 1984) para cada loco entre as populações foi calculado partindo da hipótese nula de união aleatória de gametas. A proporção de valores de  $F_{IS}$  presentes nesta distribuição que foram maiores que o valor

observado (PL) nos indica se há ou não um déficit de heterozigotos. Ao contrário, a proporção de valores de  $F_{IS}$  menores que o valor observado (PS) nos indica se há excesso de heterozigotos.

A diferenciação genética entre as populações estimada por meio do  $F_{ST}$  foi realizada conforme Weir e Cockerham (1984). Tal estimativa se baseia no modelo de alelos infinitos (*Infinite Alleles Mutation*) (Kimura e Crow, 1964), para seus cálculos recriando populações de genótipos para verificar se os valores diferem significativamente de zero. Nesse modelo cada mutação sempre cria um novo alelo a uma determinada taxa de mutação ( $\mu$ ) e conseqüentemente não admite homoplasia. A significância dos valores encontrados foi avaliada por meio das randomizações implementadas no próprio programa.

Foi utilizado o  $F_{ST}$ , pois além de ser o índice mais utilizado para estimar a distância genética entre populações de peixes (O'Connell e Wright, 1997), é o mais indicado para estudos com amostras de tamanho moderado a pequeno (menor que 50) e que utilize menos do que 10 locos.

A existência de diferenciação significativa quanto à distribuição gênica e genotípica entre as populações foi verificada com a utilização do software FSTAT. Para se testar a hipótese nula de que a “distribuição alélica ou genotípica é idêntica entre as populações” tabelas de contingência são construídas e no caso da diferenciação gênica, é utilizado o teste exato de Fisher e para a diferenciação genotípica o teste G (Goudet *et al.*, 1996) é utilizado, e os valores de “p” estimados pela cadeia de Markov.

A estrutura populacional baseada nos genótipos dos indivíduos foi examinada usando o procedimento Bayesiano modelo-baseado, implementado no software *Structure*, 2.1 (Pritchard *et al.*, 2000). Por meio deste programa é possível a determinação do número de populações genéticas (K) com base nos genótipos fornecidos (X) sem que sejam dadas informações prévias sobre os locais de origem dos indivíduos analisados. Essas populações são *clusters* com distintas frequências alélicas.

Simultaneamente é realizado um *assignment test* onde os indivíduos são direcionados probabilisticamente a um ou a mais de um *cluster* quando as populações são geneticamente misturadas. Por meio da cadeia de Markov- Monte Carlo (período de burn-in 100.000, 1.000.000 réplicas) foram testados modelos com K=1, 2, 3, e 4 populações, replicados por dez vezes, assumindo o modelo de mistura e com frequências alélicas correlacionadas.

## Capítulo 2

### 2. Coesão genética entre populações alopátricas de *Zungaro* revelada pelo seqüenciamento de genes mitocondrial e nucleares

#### 2.1. Introdução

O gênero *Zungaro* (Bleeker, 1858), conhecido popularmente como Jaú, está constituído por duas espécies distribuídas pelos rios da América do Sul. *Zungaro jahu* (Ihering, 1888) ocorre mais ao sul, na bacia do Paraná-Paraguai e o *Zungaro zungaro* (Humbolt, 1821) que ocorre mais ao norte, na bacia dos rios Amazonas e Orinoco (Lunderberg e Littmann, 2003). Este grupo pertence aos denominados grandes bagres que são muito apreciados pela qualidade da sua carne e na pesca esportiva por seu grande tamanho o que tem levado a considerá-los como ameaçados tanto no Brasil como na Colômbia. Agostinho *et al.*, (2005) mencionaram que *Zungaro jahu* está considerado como ameaçado para o sistema do Pantanal devido à sobre-exploração e está proibido de ser pescado no baixo Paraná. A espécie *Zungaro zungaro* encontra-se declarada como em perigo segundo o livro vermelho de espécies de água doce da Colômbia (Mojica 2002). Apesar de seu estado crítico de conservação, na literatura ainda não existe clareza sobre a classificação e a distribuição da cada uma das espécies e informações básicas sobre a biologia e história natural dessas espécies são ainda escassas (Agostinho *et al.*, 2003).

Embora estudos biológicos para os jaús não sejam disponíveis, pescadores comerciais mencionam que estes são capturados nas partes profundas do rio (Resende, 2003, Agostinho, 2003). Este fato foi confirmado por Mascarenhas-Alves *et al.*, (2007) em um estudo de radiotelemetria onde rastream uma fêmea adulta de 1,5 m de comprimento total, encontrando-a principalmente em profundidades que variaram de 8-9 m, na zona de transição reservatório-rio, e a 18-21 m, no corpo principal.

Investigações moleculares em taxa superiores de peixes de água doce na América do Sul estão sendo cada vez mais comuns (Orti and Meyer, 1996; Farias *et al.*, 1999; Hrbek and Larson, 1999; López-Fernández *et al.*, 2005), mais relativamente poucos desses estudos abordaram o nível de espécie ou filogeografia intraespecífica (Dergam *et al.*, 1998; Hrbek and Larson, 1999; Lovejoy and de Araújo, 2000; Andrade *et al.*, 2001; Sivasundar *et al.*, 2001;



Dergam *et al.*, 2002; Montoya-Burgos, 2003; Moyer *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2004; Hrbek *et al.*, 2005a,b; Renno *et al.*, 2006; Cooke and Beheregaray, 2007).

Análises filogeográficas podem fornecer dados importantes com relação aos processos evolutivos que determinam os padrões contemporâneos de diversificação e separação histórica de linhagens gênicas, mesmo que estas tenham comportamento estritamente neutro. Populações historicamente isoladas são as principais candidatas a diferenças na adaptação genética, pois elas teriam tido uma exposição potencialmente longa a pressões de seleção divergentes sem a influência homogeneizadora do fluxo gênico (Avise, 2000).

O mtDNA é o marcador molecular mais popular em estudos filogeográficos (Avise, 2000). O código genético mitocondrial é mais degenerado e, por tanto, apresenta uma taxa de diversificação maior e evolui mais rapidamente do que o código genético nuclear universal de eucariotos. Vários estudos indicam que o mtDNA possui uma taxa de evolução 5 a 10 vezes mais rápida do que genes nucleares de cópia única (Garcia-Machado *et al.*, 1996).

Um dos genes mitocondriais considerado de maior utilidade para trabalhos filogenéticos é o citocromo b (Cyt-b) (Farias *et al.*, 2001). Este gene é encontrado no genoma mitocondrial de quase todos os eucariotos e em diversos procariotos, indicando uma origem muito antiga (Esposti *et al.*, 1993). Além disso, é o gene mitocondrial com mais informações disponíveis sobre a estrutura e função de suas proteínas e, também, porque apresenta códons que podem evoluir de forma lenta ou rápida e regiões mais conservativas ou mais variáveis (Esposti *et al.*, 1993; Farias *et al.*, 2001).

Contudo, o uso do Cyt-b tem apresentado muitos problemas que incluem o viés na composição de bases, variação entre linhagens, saturação da terceira posição do codon, e a variação limitada na primeira e segunda posição, tendo por resultado pouca informação filogenética para perguntas evolutivas mais profundas ou poucos locais informativos para a terceira posição do codon no nível de população (Meyer, 1994). Por estas razões, a utilidade de este gene como marcador filogenético para todos os níveis filogenéticos tem sido questionado (Hillis and Huelsenbeck, 1992; Meyer, 1994; Honeycutt *et al.*, 1995).

Além disso, a herança materna do DNA mitocondrial reflete apenas um painel da evolução, ou seja, a história matrilinear da herança, que pode diferir daquela da população ou da espécie. Estas características podem afetar a fidedignidade da estimativa da árvore da espécie entre as possíveis árvores de genes (Moore, 1995; Foster e Hickey, 1999; Lopez *et al.*, 2002; He *et al.*, 2008).

Essas limitações têm sido contornadas pelo crescente uso de locos nucleares em reconstruções filogenéticas. Estudos da estrutura populacional e reconstruções filogenéticas

entre espécies estreitamente relacionadas exigem regiões de maior variabilidade como os íntrons (Lessa, 1992; He e Haymer, 1997; Friesen, 2000), regiões intercaladas aos éxons de genes eucariotos removidas durante a maturação do RNA precursor (Zhang e Hewitt, 2003), que evoluem três vezes mais rápido do que os éxons, em um comportamento semelhante às terceiras posições dos códons (Palumbi, 1995; Venter *et al.*, 2001; Hassan *et al.*, 2002). Dentre os íntrons utilizados para estudos populacionais de peixes temos o RAG (Recombination Activation Gene) (Sullivan *et al.*, 2000; Lovejoy e Collette, 2001; Hardman, 2002; Hardman e Page, 2003; Hardman, 2004; Grande *et al.*, 2004; Lavoué e Sullivan, 2004; López *et al.*, 2004; Quenouille *et al.*, 2004; Calcagnotto *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 2005; Hardman e Lundberg, 2006; Sullivan *et al.*, 2006) e o gene nuclear S7 que codifica para uma proteína ribossomal (Chow e Hazama 1998; Cooke e Beheregaray, 2007; Gaffney, 2007; He *et al.*, 2008; Musilová, 2008; Ray *et al.*, 2008).

A baixa taxa de evolução do DNA nuclear minimiza homoplasias entre táxons filogeneticamente mais distantes (Avise, 2004; Li *et al.*, 2007), e, embora a separação dos polimorfismos seja mais lenta, a informação temporal retida pelas genealogias nucleares permite que processos populacionais que ocorreram antes, durante e após eventos de especiação sejam estudados (Hoelzer, 1997; Wakeley e Hey, 1997; Nichols, 2001). Além disso, as genealogias nucleares oportunizam, ainda, o estudo de fluxo gênico diferencial entre locos, podendo explicar os mecanismos de especiação, se houver padrões de diferenciação específicos, mediados por seleção, em alguns deles (Hare, 2001).

Tendo em vista a importância ecológica e econômica dos grandes bagres migradores nos diferentes sistemas hidrográficos e considerando a forte ação antrópica negativa sobre seus habitats, é muito importante reconhecermos as unidades genéticas/populações existentes para contribuirmos em programas de conservação que considerem o pool gênico total da espécie. Assim, no presente estudo foram utilizados marcadores moleculares do tipo mtDNA (Cyt b) e nDNA (intron do gene RAG e intron do gene S7) na análise do grau de variabilidade e diferenciação genética de populações naturais de Zungaro. Para tanto, comparamos os níveis de diversidade e estruturação genética das populações de Zungaro do Pantanal, rio Paraná, rio Amazonas e rio Meta. Discutimos os padrões históricos de dispersão das espécies baseado nos dados moleculares e os comparamos com os principais eventos geológicos que atuaram na formação das bacias hidrográficas em estudo. Visamos fornecer subsídios aos estudos de conservação e manejo deste grupo de peixes e contribuir de maneira efetiva para a manutenção da biodiversidade desses ecossistemas.

## 2.2. Material e métodos

Para o presente estudo foram analisadas amostras das espécies *Z. zungaro* e *Z. jahu* sendo estas as duas únicas espécies pertencentes ao gênero *Zungaro* o qual encontra-se distribuído por toda América do Sul,

Especimens da espécie *Z. zungaro* foram coletados na bacia do rio Orinoco, especificamente no rio Meta, próximo à cidade de Villavicencio, Colômbia, e na bacia do rio Amazonas, no rio Amazonas, próximo à cidade de Tabatinga (Fig. 3.1.). As amostras dos exemplares da espécie *Z. jahu*, foram coletadas em duas regiões diferentes. Uma amostra foi coletada pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA – Pantanal- durante os anos de 2000 - 2003 na bacia do rio Paraguai, especificamente nos rios Cuiabá, São Lourenço, Taquari e Miranda as quais se encontravam na coleção de referência da instituição. A outra amostra foi coletada de indivíduos de cativeiro da bacia do Paraná (Fig. 2.1). Os exemplares não foram sacrificados coletando somente fragmentos de nadadeira. Por não serem sacrificados não foi possível verificar o sexo dos exemplares.

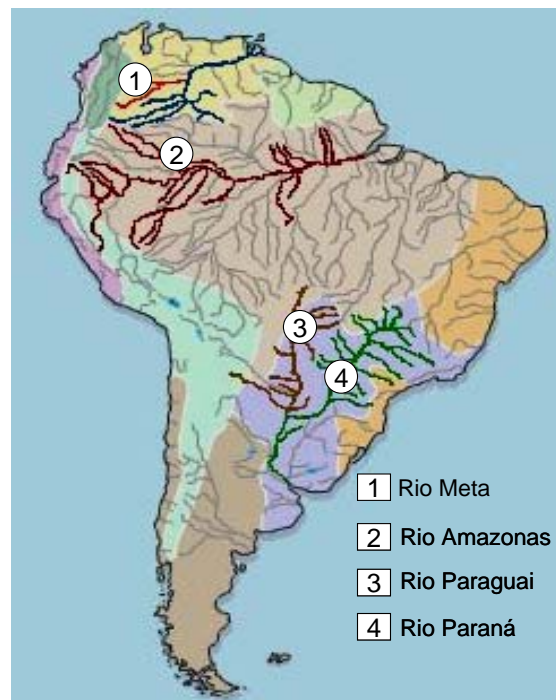


Figura 2.1. Localização dos pontos de coleta das amostras de jaú (Mapa copyright © 2003 Marc Elicson).

O DNA foi extraído a partir de tecidos sólidos como músculo e nadadeira fixados em etanol 95 % e seguindo-se o método de Sambrook et al. (1989). A quantificação e verificação da qualidade do DNA das amostras foram realizadas em eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

As seqüências mitocondriais do gene do citocromo b (Cyt-b) foram amplificadas em reações de PCR utilizando os *primers* universais: GludgL: 5'TGACTTGAARAACCAAYCGTTG3'; H15915: 5'AACTGCAGTCATCTCCGGTTTACAAGAC 3' (Palumbi *et al.*, 2002; Irwin *et al.*, 1991) em volume final de 30 µl contendo 10-50 ng de DNA, 100 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,2 µM de cada *primer*, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (Fermentas Life Sciences, Invitrogen Life Technologies). As reações foram conduzidas em termociclador PTC100 (MJ Research) e Mastercycler (Eppendorf) e o programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 35 s a 49 °C, 40 s a 72°C; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 5 min.

O primeiro íntron do gene nuclear RAG1 (gene ativador da recombinação) (int1RAG1) foi amplificado utilizando os *primers* RAG1X1F: GCTGGCAGACAAGTGGATCT; RAG1X2:AGGCCATCTAGAAGCCTTGC desenvolvidos por Carvalho-Costa (com. pessoal). As reações foram feitas em volume final de 30 µl contendo 10-50 ng de DNA, 100 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x (Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,2 µM de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (Fermentas Life Sciences, Invitrogen Life Technologies). As reações foram conduzidas em termociclador PTC100 (MJ Research) e Mastercycler (Eppendorf) e o programa para amplificação consistiu de desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 58 °C, 30 s a 72°C; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 5 min. Para cada rodada de reações foi utilizado um controle negativo.

Para a amplificação do primeiro intron (RP1) do gene nuclear que codifica para a proteína ribossomal S7 foram utilizados os *primers*, RPEX1F: 5'-TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC-3' e S7RPEX2R 5'-AACTCGTCTGGCTTTTCGCC-3' (Chow e Hazama, 1998). As reações foram realizadas para um volume final de 30 µl contendo 10-50 ng de DNA, 200 µM de dNTPs (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), tampão 1x

(Tris-HCl 200 mM, pH 8,4, e KCl 500 mM), 0,67  $\mu$ M de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub> e 1,5 U da enzima Taq polimerase (Invitrogen Life Technologies). As reações seguiram as recomendações dos autores em um termociclador PTC100 (MJ Research) e um termociclador Mastercycler (Eppendorf) . As condições para a amplificação foram desnaturação inicial a 95°C por 1 min, seguido de 30 ciclos de 30 s a 95°C, 1 min a 64 °C, 2 min 72°C; finalizando à temperatura de extensão de 72°C por 10 min. Para cada rodada de reações foi utilizado um controle negativo.

Após cada reação de PCR, 3  $\mu$ l de cada amostra foram aplicados em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio (1 mg/ml), e submetidos à eletroforese (80 Volts por 45 minutos). Posteriormente, o gel foi visualizado em transiluminador de luz ultravioleta e fotodocumentado (Kodak 1D 3.5), tendo como referência de tamanho para os amplicons um marcador de 1 Kb (Kilobase, Invitrogen Life Technologies).

Os produtos de PCR foram purificados mediante kit de purificação específico (GFX PCR DNA & Gel band, GE inc.).

Os fragmentos foram seqüenciados pelo método enzimático de terminação de cadeia (Sanger *et al.*, 1977). Para os três marcadores, utilizaram-se os mesmos *primers* da PCR para a reação de seqüenciamento, sendo que apenas para o citocromo b foi empregado um *primer* interno (Zjahu-F: 5' GTACTACCATGGGGACAAAT-3), desenhado especialmente para Zungaro nesse trabalho.

Para cada seqüência estabeleceu-se uma seqüência consenso no programa CodonCode Aligner (LI. COR, Inc), que foram posteriormente alinhadas no aplicativo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994), presente no BioEdit (Hall, 1999). O programa PHASE foi utilizado para estabelecer as seqüências heterozigotas dos genes nucleares (Scheet and Stephens, 2006).

A caracterização do polimorfismo (identificação dos haplótipos, freqüências relativas, número de sítios polimórficos do citocromo b, do íntron 1 da RAG1 e do gene nuclear S7 (exceto a identificação de todos os haplótipos) foi conduzida por meio dos programas MEGA versão 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), DNASP 4.10 (Rozas *et al.*, 2003) e/ou Arlequin (Excoffier, *et al.*, 2005).

A polaridade das árvores filogenéticas foi determinada por comparação com grupo externo (Nixon e Carpenter, 1993) com seqüências homólogas de espécies de *Pseudoplatystoma* sp e *Brachyplatystoma* sp.

A distribuição da variação genética dentro e entre populações foi investigada através da análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al., 1992) que utiliza as frequências haplotípicas e as diferenças par-a-par entre as seqüências. A análise hierárquica foi realizada estimando-se os índices de fixação  $\Phi_{st}$ ,  $\Phi_{ct}$  e  $\Phi_{sc}$  para avaliar a proporção de variação entre os grupos e entre as populações dentro dos grupos, respectivamente. Análises de  $F_{st}$  par-a-par foram calculadas baseando-se somente nas frequências haplotípicas.

Desvios da premissa de neutralidade seletiva foram estimados pelos testes D de Tajima (Tajima, 1989),  $F^*$  e  $D^*$  (Fu e Li, 1993) e  $F_s$  (Fu, 1997), presentes no programa DnaSP 4.10. (Rozas et al., 2003). 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 “background selection”. Valores de  $F_s$  significativos e  $D^*$  e  $F^*$  não significativos indicam expansão demográfica, enquanto que o caso contrário sugere que os efeitos da seleção são mais pronunciados. A distribuição das diferenças nucleotídicas pareadas entre indivíduos (“mismatch distribution”) foi calculada como um teste adicional para inferências de expansão populacional (Rogers e Harpending, 1992) utilizando o programa DnaSP. Populações estáveis geralmente apresentam gráficos com padrões de curvas bi- ou multimodais, enquanto que, curvas unimodais são frequentemente observadas em populações que sofreram expansão demográfica recente (Rogers e Harpending, 1992; Harpending, 1994). 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.

Uma rede de haplótipos que ilustra as interações filogenéticas entre os haplótipos observados foi estimada utilizando o programa network (Fluxus Technology Ltd.).

A história evolutiva foi inferida por meio de uma árvore de neighbor-joining (software DNAsp). Indels foram considerados apenas para a árvore do primeiro íntron da RAG1 e do gene S7. As análises foram todas feitas no MEGA versão 4.0 (Tamura et al. 2007). O suporte para os nós foi avaliado por bootstrap (1000 pseudo-réplicas) (Felsenstein, 1985) e interpretados segundo Hall (2001), que considera um valor igual ou superior a 90-95% para que um agrupamento seja considerado como significativamente apoiado, independentemente da repetibilidade.

### 2.3. Resultados

Para a caracterização do polimorfismo e da diversidade genética os resultados serão apresentados separadamente para cada um dos marcadores moleculares utilizados neste trabalho sendo um gene do DNA mitocondrial (citocromo b, Cyt b) e dois genes nucleares, o primeiro íntron do gene ativador da recombinação (RAG) e o primeiro intron do gene nuclear que codifica para a proteína ribossomal S7.

#### 2.3.1. Citocromo b (Cyt b)

##### 2.3.1.1. Estimativas da variabilidade genética

Foram amplificados, purificados e seqüenciados 827 pares de bases do gene mitocondrial do citocromo b de 27 amostras de *Zungaro* (6 indivíduos do rio Meta, 9 indivíduos do rio Amazonas, 7 indivíduos do Pantanal e 5 indivíduos do rio Paraná). A variação nesse marcador gerou sete sítios polimórficos e oito haplótipos que foram distribuídos nas populações analisadas. O haplótipo 1 foi identificado em todas as populações estudadas encontrando-se em 17 dos indivíduos. O haplótipo 4 encontrou-se em duas populações (Meta e Amazonas) enquanto que os haplótipos restantes foram exclusivos para uma das populações (Tabela 2.1).

A população do Pantanal apresentou dois haplótipos e um sítio polimórfico enquanto que foram encontrados quatro haplótipos e três sítios polimórficos nas populações do rio Meta e rio Amazonas e dois haplótipos com dois sítios polimórficos na população do Paraná (Tabela 2.2).

Tabela 2.1. Número de indivíduos por população que apresentaram cada haplótipo.

Localidade	HAPLÓTIPOS								Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	
META	2			2	1	1			6
AMAZONAS	5	1	2	1					9
PANTANAL	6						1		7
PARANÁ	4							1	5
Total	17	1	2	3	1	1	1	1	27

Tabela 2.2. Número de indivíduos (n), número de haplótipos (No Hap) e sítios polimórficos (S) encontrados nas populações de Zungaro para o fragmento do Cyt b analisado.

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Indivíduos (n)	6	9	7	5
Haplótipos (No. Hap)	4	4	2	2
Sítios polimórficos (S)	3	3	1	2

Considerando-se todos os indivíduos analisados, a diversidade haplotípica foi 0,601, a diversidade nucleotídica 0,00087 e o número médio de diferenças nucleotídicas de 0,718. Na Tabela 2.3, estão apresentados os níveis de variabilidade genética para cada uma das populações amostradas. A população do rio Meta apresentou o maior índice de diversidade haplotípica ( $h= 0,8667$ ) e nucleotídica ( $\pi= 0,0014$ ) quando comparada as populações do rio Amazonas, Pantanal e do rio Paraná.

Tabela 2.3. Diversidade genética observada nas seqüências do Cyt b das populações de Zungaro. Diferenças nucleotídicas (k) , diversidade haplotípica ( $h$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
K	4,0627	2,1769	0,5299	2,2254
$h$	0,8667	0,6944	0,4762	0,7000
$\pi$	0,0014	0,0010	0,0006	0,0014

A rede de interações filogenéticas entre os haplótipos observados nas amostras analisadas para o fragmento do Cyt b são apresentados na figura 2.2. Nessa rede podemos observar uma forma de estrela conformada por um haplótipo central constituído por seqüências de todas as populações estudadas e do qual são derivados os outros haplótipos.



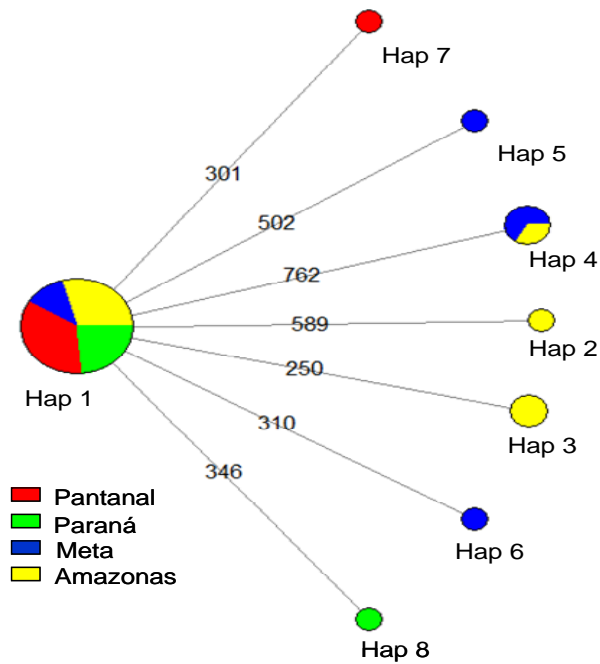


Figura 2.2. Rede de haplótipos utilizando o fragmento do gene Cyt b. Vermelho haplótipos do Pantanal; Verde, haplótipos do rio Paraná; Amarelo, haplótipos do rio Amazonas e Azul, haplótipos do rio Meta. O número nas linhas corresponde à posição da mutação na sequência.

### 2.3.1.2. Estimativas de subdivisão populacional

Os dados da AMOVA global obtidos para o fragmento do gene do Cyt b indicaram que a maior fonte de variação encontra-se dentro das populações com 93,02% , enquanto que a variação entre as populações foi de 6,98%. O índice de fixação  $F_{ST}$  foi de 0,06982 ( $P= 0,03$ ) sugerindo uma diferenciação significativa entre as populações (Tabela 2.4).

Tabela 2.4. Resultados da AMOVA para o fragmento das sequências do Cyt b para as populações de Zungaro.  $P < 0,05$ .

Fonte de Variação	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre populações	3	1,986	0,03316	6,98
Dentro populações	23	10,162	0,44182	93,02
Total	26	12,148	0,47498	

Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par demonstraram a ocorrência de subdivisão populacional significativa somente entre as amostras do Pantanal e do rio Meta (Tabela 2.5)

Tabela 2.5. Valores de  $F_{ST}$  par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene Cyt b de jaú. \* $P < 0,05$ .

Localidade	Amazonas	Meta	Pantanal	Paraná
Amazonas	0,0000			
Meta	0,03116	0,0000		
Pantanal	0,09248	0,13316*	0,0000	
Paraná	0,04539	0,05263	0,08416	0,0000

### 2.3.1.3. Inferências demográficas

Os testes de neutralidade (Tajima's D, Fu and Li's D\*, Fu and Li's F\* e Fu's de F) foram aplicados aos dados relativos ao fragmento da seqüência do gene Cyt b. O teste de Tajima' D= -1.8333 foi significativo ( $P < 0.05$ ), contrário aos testes D\* (-2.11328) e F\* (-2.36304) que não apresentaram resultados significativos quando comparada a população como um todo. Quando foram analisadas as amostras separadamente por região, observaram-se valores negativos, não obstante, os valores encontrados não foram significativos para nenhum dos testes (Tabela 2.6).

Tabela 2.6. Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento do Cyt b em cada uma das populações.

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Tajima's D	-0.4474	-0.9361	-1.0062	-0.81650
Fu and Li's D*	-0.3784	-0.7256	-1.0488	-0.8165
Fu and Li's F*	-0.4102	-0.8597	-1.1015	-0.7715
Fu's de F	-1.454	-1.417	-0.095	0.090

As análises de “*mismatch distribution*” indicaram que as curvas de distribuição das amostras, para todas as populações, apresentam um padrão unimodal o qual coincide com as curvas esperadas segundo o modelo de expansão populacional. Estes resultados são apoiados

com os valores encontrados no teste da soma dos desvios dos quadrados da “*mismatch distribution*” que não tiveram um desvio significativo (Fig. 2.3).

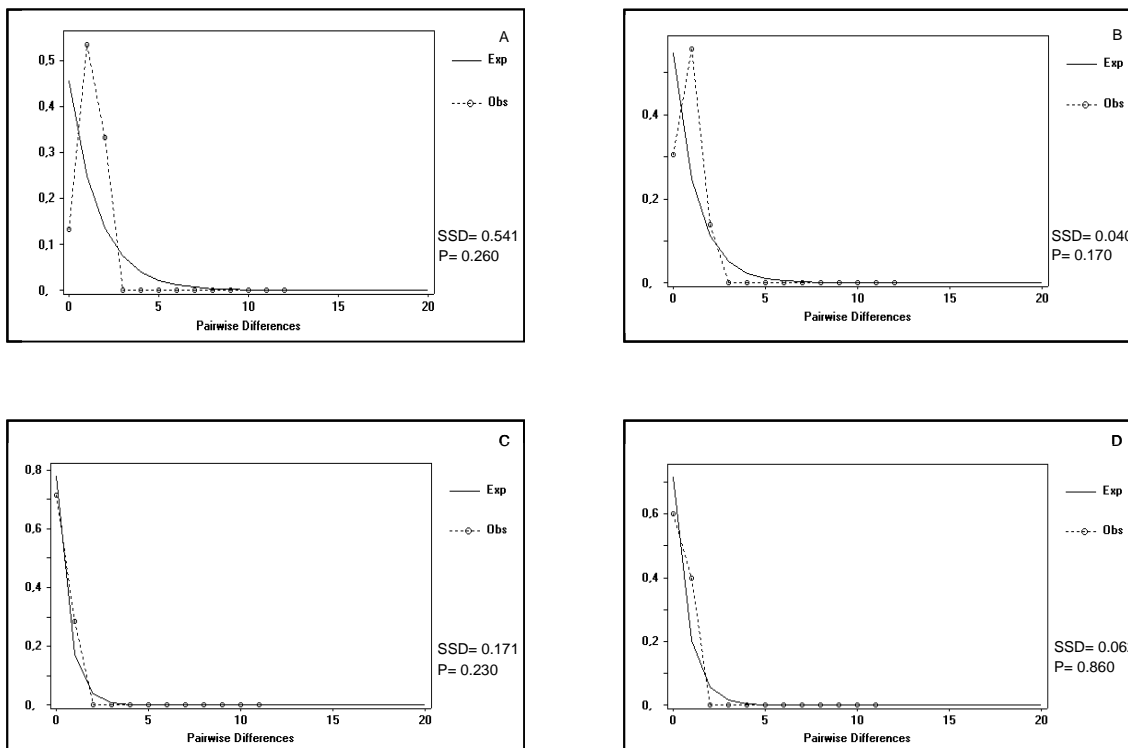


Figura 2.3. Gráficos de “mismatch distribution” obtidos para as seqüências do fragmento do Cyt b de jaú das diferentes localidades estudadas. Rio Meta (A), rio Amazonas (B), Pantanal (C), e rio Paraná (D). A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas pelo modelo de expansão populacional foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

Para a reconstrução filogenética foi realizada uma árvore de *neighbor joining* na qual a topologia mostrou a formação de um clado principal (politomia) que agrupa todos os indivíduos amostrados apresentando um alto valor de suporte, sem nenhum agrupamento evidente por regiões (Fig. 2.4).

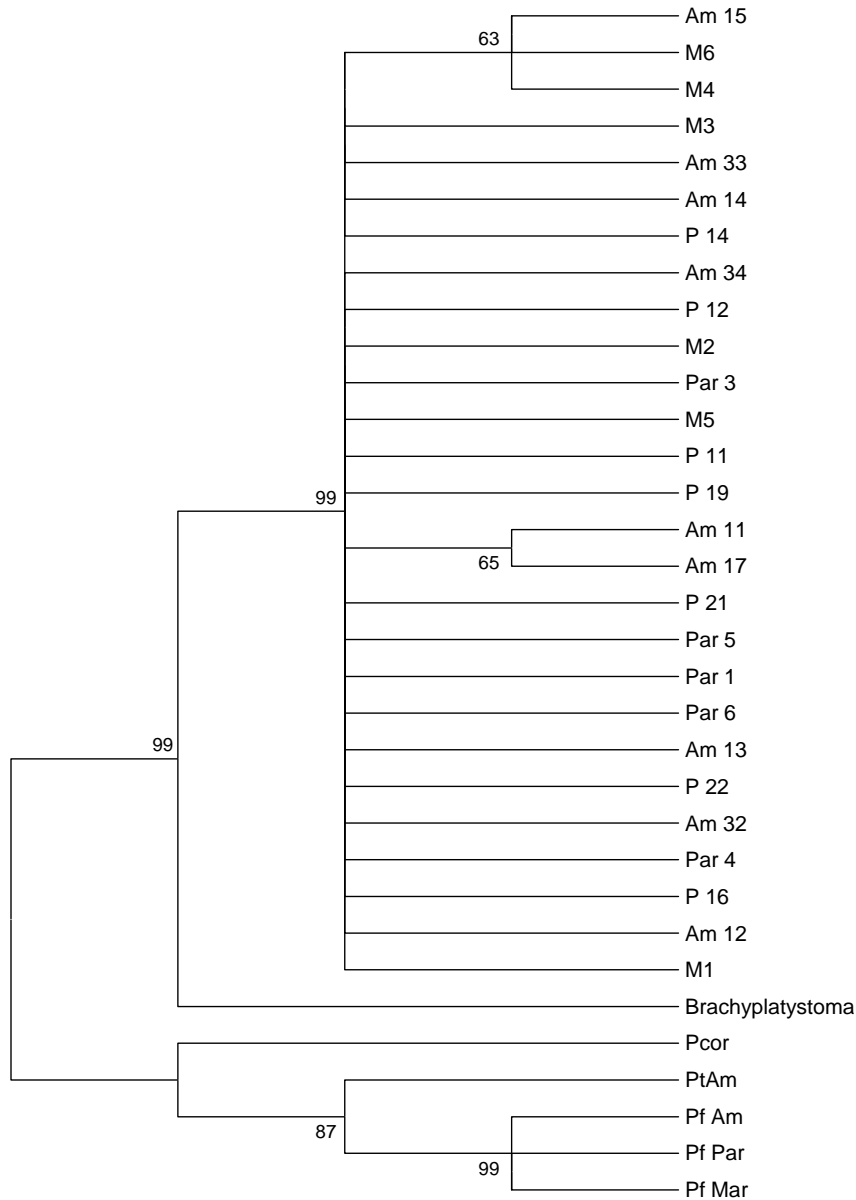


Figura 2.4. Árvore gênica utilizando *neighbor joining* para as seqüências do fragmento do Cyt b de jaú das diferentes localidades estudadas. O número corresponde ao valor de *bootstrap*. Indivíduos do Rio Amazonas (AM), Rio Meta (M), Rio Paraná (Par) e Pantanal (P). Os grupos externos estão conformados por seqüências de *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pcor), *Pseudoplatystoma tigrinum* do Amazonas (PtAm), *Pseudoplatystoma fasciatum* do Amazonas (PfAm), *Pseudoplatystoma fasciatum* do Paraguai (PfPar) e *Pseudoplatystoma fasciatum* do Maranhão (PfMar).

## 2.3.2. Primeiro íntron do Gene Ativador da Recombinação (RAG)

### 2.3.2.1. Estimativas da variabilidade genética

As análises deste gene foram realizadas com 34 seqüências de Zungaro (10 seqüências do rio Meta, 8 seqüências do rio Amazonas, 8 seqüências do Pantanal e 8 seqüências do rio Paraná) com um comprimento total de 448 pares de bases. A variação nesse marcador gerou onze haplótipos que foram distribuídos nas populações analisadas. O haplótipo 1 foi identificado somente nas populações do Pantanal e do rio Paraná. O haplótipo 2 foi compartilhado entre a população do rio Amazonas e do rio Meta em quanto que os haplótipos 3 e 4 foram exclusivos da população do Amazonas. Os haplótipos restantes foram exclusivos da população do rio Meta (Tabela 2.7).

Tabela 2.7. Número de indivíduos por população que apresentaram cada haplótipo para o fragmento do gene RAG nas populações de Zungaro analisadas.

Localidade	HAPLÓTIPOS											Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
META		1			2	2	1	1	1	1	1	10
AMAZONAS		2	4	2								8
PANTANAL	8											8
PARANÁ	8											8
Total	16	3	4	2	2	2	1	1	1	1	1	34

A população do rio Meta apresentou oito haplótipos e quatorze sítios polimórficos, enquanto que três haplótipos e dez sítios polimórficos foram encontrados na população do rio Amazonas. As populações do Pantanal o do rio Paraná só apresentaram um haplótipo e, por conseguinte, não apresentaram sítios polimórficos (Tabela 2.8).

Tabela 2.8. Número de seqüências analisadas (n), número de haplótipos (No. Hap) e sítios polimórficos (S) encontrados nas populações de Zungaro para o fragmento do gene RAG analisado.

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Seqüências (n)	10	8	8	8
Haplótipos (No. Hap)	8	3	1	1
Sítios polimórficos (S)	14	10	0	0

Considerando-se todos os indivíduos analisados, a diversidade haplotípica foi 0,754, a diversidade nucleotídica de 0,00803 e o número médio de diferenças nucleotídicas de 3,5508. Na tabela 2.9 estão apresentados os níveis de variabilidade genética de cada população amostrada. A população do rio Meta apresentou o maior índice de diversidade haplotípica ( $h=0,911$ ) e nucleotídica ( $\pi=0,0076$ ) quando comparada com a população do rio Amazonas. As populações do Pantanal e do rio Paraná não apresentaram polimorfismo estando conformadas por unicamente um haplótipo.

Tabela 2.9. Diversidade genética observada nas seqüências do RAG das populações de Zungaro. Diferenças nucleotídicas (k), diversidade haplotípica ( $h$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
K	3,3778	3,1428	0,000	0,000
$h$	0,911	0,714	0,000	0,000
$\pi$	0,0076	0,0071	0,000	0,000

A rede de interações filogenéticas entre os haplótipos observados nas amostras analisadas para o fragmento do RAG indica que os indivíduos das populações do Pantanal e do rio Paraná compartilham o mesmo haplótipo enquanto que as populações do rio Meta e do rio Amazonas se apresentam com haplótipos derivados (Fig. 2.5).

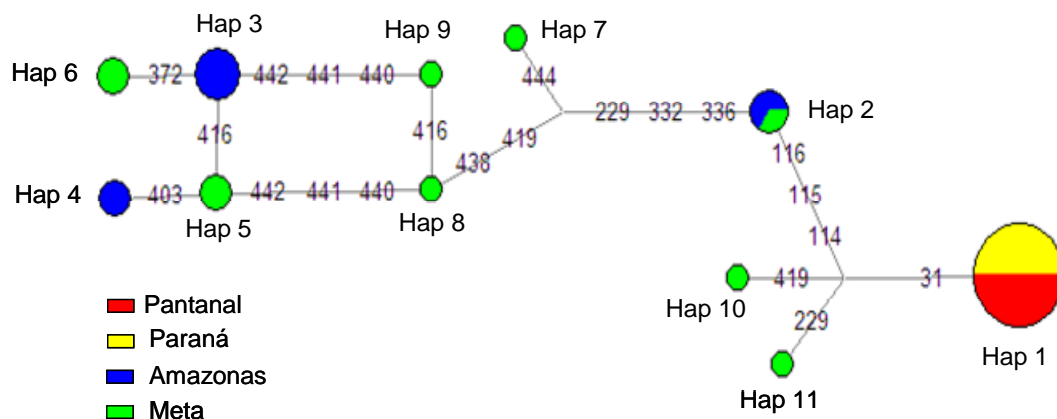


Figura 2.5. Rede de haplótipos utilizando o fragmento do gene RAG. O número nas linhas corresponde à posição da mutação na sequência. Vermelho haplótipos do Pantanal; Amarelo, haplótipos do rio Paraná; Verde, haplótipos do rio Meta; e Azul, haplótipos do rio Amazonas.

### 2.3.2.2. Estimativas de subdivisão populacional

Os dados da AMOVA global obtidos para o fragmento do gene do RAG indicaram que a maior fonte de variação encontra-se entre as populações com um 57,23 % seguida da variação entre os indivíduos dentro das populações com um 33,26 %. O índice de fixação encontrado foi  $F_{ST}=0,5723$  ( $P=0,0049$ ) indicando uma diferenciação significativa entre as populações (Tabela 2.10).

Tabela 2.10. Resultados da AMOVA para o fragmento das seqüências do RAG para as populações de Zungaro. ( $P<0.05$ )

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Componentes de Varianza	Porcentagem de Variação
Entre populações	62.476	2.2153	57.234
Entre indivíduos dentro da população	36.700	1.2351	33.261
Dentro populações	6.000	0.3529	9.505
Total	105.176	3.7133	

Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par demonstraram a ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as populações do rio Meta e do rio Amazonas (*Zungaro zungaro*) com respeito as populações do Pantanal e do rio Paraná (*Zungaro jahu*) (Tabela 2.11).

Tabela 2.11. Valores de  $F_{ST}$  par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene RAG. \* $P < 0,05$

Localidade	Pantanal	Paraná	Amazonas	Meta
Pantanal	0.0000			
Paraná	0.0000	0.0000		
Amazonas	0.7940*	0.7940*	0,0000	
Meta	0.6179*	0.6187*	0.0169	0,0000

### 2.3.2.3. Inferências demográficas

Testes de neutralidade (Tajima's D, Fu and Li's D\*, Fu and Li's F\* e Fu's de F) foram aplicados aos dados relativos ao fragmento da seqüência do gene RAG. Os valores dos testes de Tajima' D (1.3929), Fu and Li's D\* (0.8471) e Fu and Li's F\* (1.1933) encontrados não foram significativos quando comparadas as populações como um todo.

Quando foram analisadas as amostras separadamente por região, observou-se o mesmo comportamento anterior, encontrando valores não significativos para nenhum dos testes nas populações do rio Meta e do rio Amazonas. Não entanto devido à falta do polimorfismo nas populações do Pantanal e do rio Paraná não foi possível estabelecer estes valores nessas populações (Tabela 2.12).

Tabela 2.12. Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento do RAG em cada uma das populações.

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Tajima's D	0.8389	0.7811	0.0000	0.0000
Fu and Li's D*	0.9621	1.4401	0.0000	0.0000
Fu and Li's F*	1.0468	1.4222	0.0000	0.0000
Fu's de F	1.7260	0.249	0.0000	0.0000



As análises de “*mismatch distribution*” indicaram que as curvas de distribuição para as populações do rio Amazonas e do rio Meta 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 da “*mismatch distribution*” que não tiveram um desvio significativo (Fig 2.6). Com as populações do Pantanal e do rio Paraná não foi possível realizar as análises devido à falta de polimorfismo das amostras.

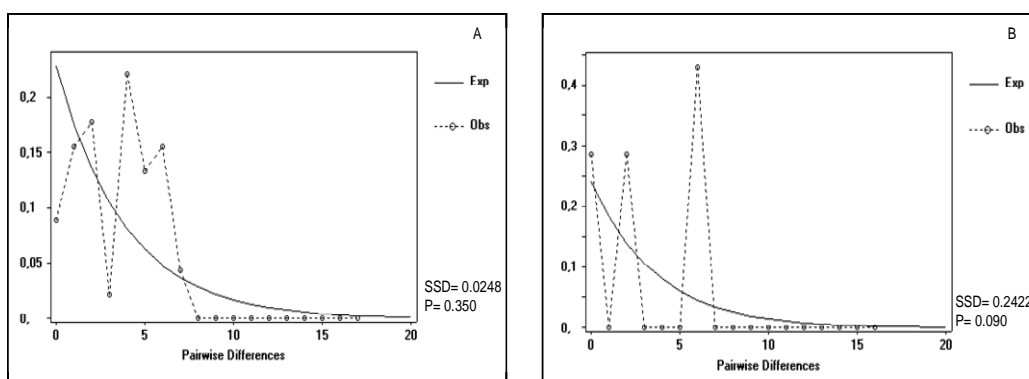


Figura 2.6. Gráficos de “*mismatch distribution*” obtidos para as seqüências do fragmento do gene RAG de jaú das diferentes localidades estudadas. Rio Meta (A), Rio Amazonas (B). A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

Para a reconstrução filogenética foi realizada uma árvore gênica utilizando *neighbor joining* na qual, a topologia mostrou a formação de dois clados com baixo suporte. Um dos clados agrupou todos os indivíduos do Pantanal e do rio Paraná (*Zungaro jahu*) e o outro clado aos indivíduos do rio Meta e rio Amazonas (*Zungaro zungaro*) (Fig. 2.7).

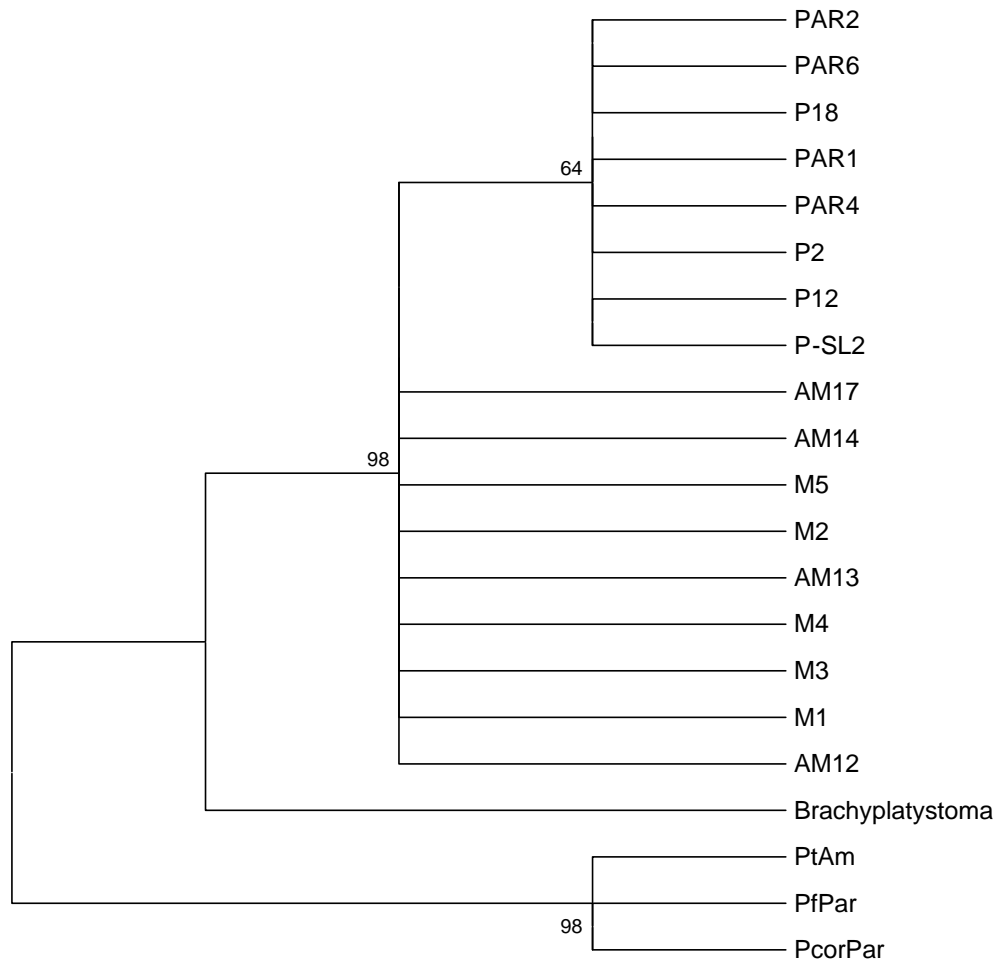


Figura 2.7. Árvore gênica utilizando *neighbor joining* para as seqüências do fragmento do gene RAG de jaú das diferentes localidades estudadas. O número corresponde ao valor de *bootstrap*. Indivíduos do Rio Amazonas (AM), Rio Meta (M), Rio Paraná (PAR) e Pantanal (P). Os grupos externos estão conformados por seqüências de *Brachyplatystoma*, *Pseudoplatystoma tigrumum* do rio Amazonas (PtAm), *Pseudoplatystoma fasciatum* do rio Paraguai (Pf), *Pseudoplatystoma corruscans* do rio Paraguai (PcorPar).

### 2.3.3. Gene da Proteína Ribossomal S7

#### 2.3.3.1. Estimativas da variabilidade genética

As análises deste gene (S7) foram realizadas com 42 seqüências parciais de Zungaro (10 seqüências do rio Meta, 10 seqüências do rio Amazonas, 14 seqüências do Pantanal e 8 seqüências do rio Paraná) com um comprimento total de 460 pares de bases. A variação nesse marcador gerou cinco haplótipos que foram distribuídos nas populações analisadas. O haplótipo 1 foi identificado em todas as populações analisadas. O haplótipo 2 só foi identificado nas populações do Pantanal e do rio Paraná. O haplótipo 3 só foi observado no rio Amazonas, enquanto que o 5 foi detectado somente no rio Meta. O haplótipo 4 foi encontrado nas populações do rio Meta e rio Amazonas (Tabela 2.13).

Tabela 2.13. Número de seqüências por população que apresentaram cada haplótipo para o fragmento do gene S7 nas populações de Zungaro analisadas.

Localidade	HAPLÓTIPOS					Total
	1	2	3	4	5	
META	6			3	1	10
AMAZONAS	7		1	2		10
PANTANAL	10	4				14
PARANÁ	6	2				8
Total	29	6	1	5	1	42

As populações do rio Meta e do rio Amazonas apresentaram três haplótipos e três sítios polimórficos, enquanto que dois haplótipos e um sítio polimórfico foram encontrados nas populações do Pantanal e do rio Paraná. (Tabela 2.14).

Tabela 2.14. Número de seqüências analisadas, número de haplótipos e sítios polimórficos encontrados nas populações de Zungaro para o fragmento do gene S7 analisado.

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Seqüências (n)	10	8	8	8
Haplótipos (No. Hap)	3	3	2	2
Sítios polimórficos (S)	3	3	1	1

Considerando-se todos os indivíduos analisados, a diversidade haplotípica foi 0,499, a diversidade nucleotídica de 0,00169, e o número médio de diferenças nucleotídicas de 0,7758. Na tabela 2.15 estão apresentados os níveis de variabilidade genética de cada população amostrada. As população do rio Meta apresentou o maior índice de diversidade haplotípica ( $h= 0,911$ ) e nucleotídica ( $\pi= 0,0076$ ) quando comparada com as populações do rio Amazonas, rio Paraná e o Pantanal.

Tabela 2.15. Diversidade genética observada nas seqüências do S7 das populações de Zungaro. Diferenças nucleotídicas ( $k$ ), diversidade haplotípica ( $h$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Theta K	1,1333	0,9111	0,4396	0,4286
$h$	0,600	0,5110	0,4400	0,4290
$\pi$	0,0025	0,0020	0,0010	0,0009

A rede de interações filogenéticas entre os haplótipos observados nas amostras analisadas para o fragmento do S7, indica que todas as populações compartilham o haplótipo 1 sendo este o mais comum para a maioria das seqüências (Fig. 2.8).

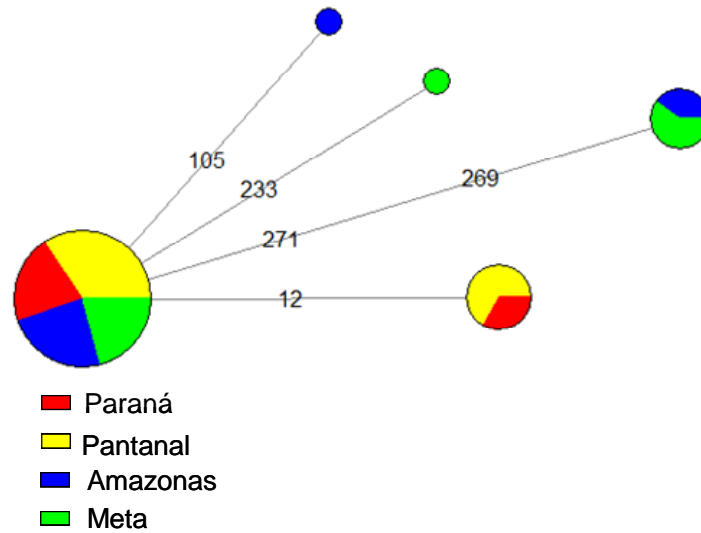


Figura 2.8. Rede de haplótipos utilizando o fragmento do gene S7 de jaú. O número nas linhas corresponde à posição da mutação na sequência. Vermelho haplótipos do Paraná; Amarelo, haplótipos do rio Pantanal; Verde, haplótipos do rio Meta; e Azul, haplótipos do rio Amazonas.

### 2.3.3.2. Estimativas de subdivisão populacional

Os dados da AMOVA global obtidos para o fragmento do gene do S7 indicaram que a maior fonte de variação encontra-se dentro das populações com um 47,90% seguida da variação entre os indivíduos dentro das populações com um 46,74%. O índice de fixação populacional  $F_{ST} = 0,054$  ( $P=0,572$ ) resultou não significativo (Tabela 2.16).

Tabela 2.16. Resultados da AMOVA para o fragmento das seqüências do gene S7 para as populações de Zungaro. ( $P>0.05$ ).

Fonte de Variação	Soma de Quadrados	Componentes de Variância	Porcentagem de Variação
Entre populações	2.348	0.0213	5.35
Entre indivíduos dentro da população	9.957	0.1859	46.74
Dentro populações	4.000	0.1905	47.90
Total	15.905	0.3976	

Os valores de  $F_{ST}$  par-a-par demonstraram a ocorrência de subdivisão populacional significativa entre as populações do Pantanal com relação as populações do rio Meta e do rio Amazonas (Tabela 2.17).

Tabela 2.17. Valores de  $F_{ST}$  par-a-par obtidos para o fragmento das seqüências do gene S7 de jaú. \* $P < 0.05$

Localidade	Pantanal	Paraná	Amazonas	Meta
Pantanal	0.0000			
Paraná	-0.1053	0.0000		
Amazonas	0.1566*	0.0932	0.0000	
Meta	0.2247*	0.16122	-0.0648	0.0000

### 2.3.3.3. Inferências demográficas

Testes de neutralidade (Tajima's D, Fu and Li's D\*, Fu and Li's F\* e Fu's de F) foram aplicados aos dados relativos ao fragmento da seqüência do gene S7. Os valores dos testes de Tajima' D (-0.8363), Fu and Li's D\* (-0.7567) e Fu and Li's F\* (-0.9123) encontrados não foram significativos quando comparada a população como um todo.

Quando foram analisadas as amostras separadamente por região, observou-se o mesmo comportamento anterior, encontrando valores não significativos para nenhum dos testes nas populações analisadas. (Tabela 2.18).

Tabela 2.18. Testes de neutralidade aplicados aos dados das seqüências do fragmento do S7 em cada uma das populações.

	Meta	Amazonas	Pantanal	Paraná
Tajima's D	0.2473	-0.5067	0.8423	0.3335
Fu and Li's D*	0.1746	0.1746	0.7156	0.8878
Fu and Li's F*	0.2149	0.0102	0.8469	0.8253
Fu's de F	0.723	0.300	0.944	0.779

As análises de “*mismatch distribution*” indicaram que as curvas de distribuição para as populações do rio Amazonas e do rio Meta apresentaram um padrão multimodal o qual coincide com as curvas esperadas para populações que se encontram em equilíbrio. No entanto, as populações do Pantanal e do rio Paraná apresentaram um padrão unimodal o qual coincide com as curvas esperadas segundo o modelo de expansão populacional. Estes resultados são apoiados com os valores encontrados no teste da soma dos desvios dos quadrados da “*mismatch distribution*” que não tiveram um desvio significativo (Fig. 2.9).

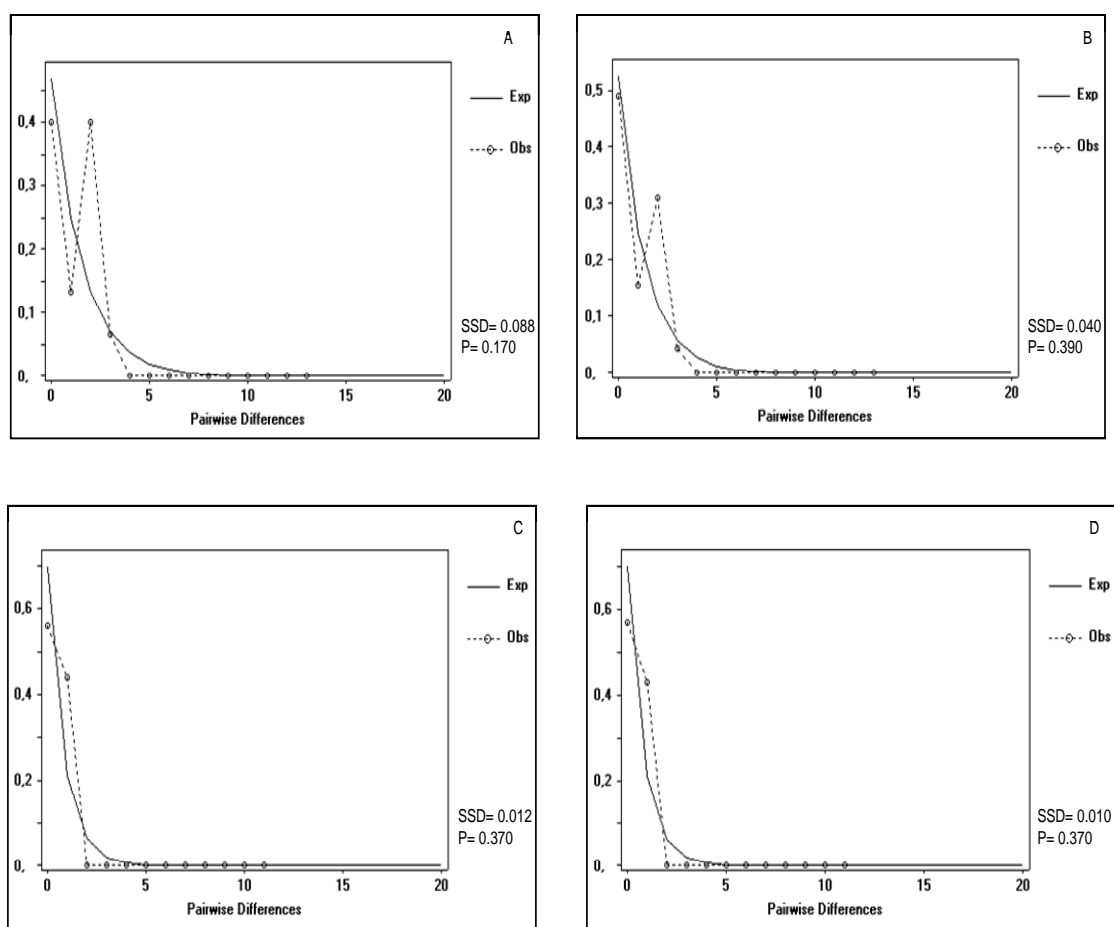


Figura 2.9. Gráficos de “*mismatch distribution*” obtidos para as seqüências do fragmento do S7 das diferentes localidades estudadas. Rio Meta (A), Rio Amazonas (B), Pantanal (C) e Rio Paraná (D). A significância dos desvios entre as curvas observadas e as esperadas foi dada pela soma dos desvios dos quadrados (SSD).

Para a reconstrução filogenética foi realizada uma árvore gênica utilizando *neighbor joining* na qual, a topologia mostrou a formação de dois clados com baixo suporte sem um agrupamento evidente por regiões. Um dos clados agrupou quase todos os indivíduos, enquanto que o outro agrupou dois indivíduos do Pantanal e um do rio Paraná (Fig. 2.10).

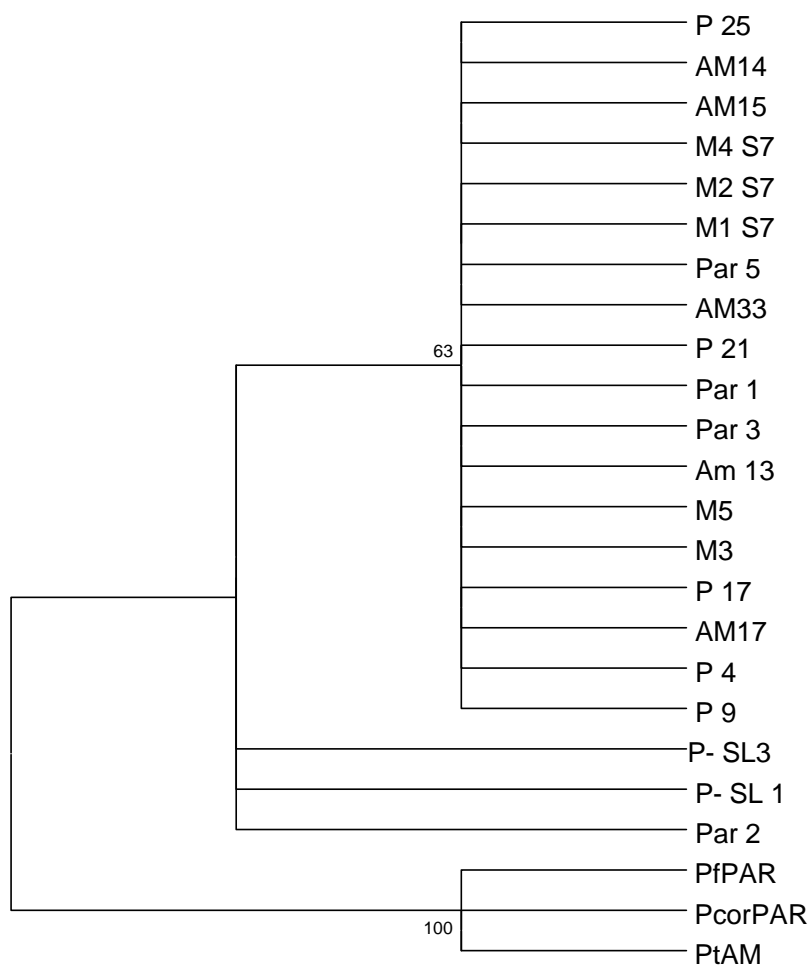


Figura 2.10. Árvore gênica utilizando *neighbor joining* para as seqüências do fragmento do gene S7 de jaú dos diferentes indivíduos nas localidades estudadas. O número corresponde ao valor de *bootstrap*. Indivíduos do Rio Amazonas (AM), Rio Meta (M), Rio Paraná (PAR) e Pantanal (P). Os grupos externos estão conformados por seqüências de *Pseudoplatystoma tigrumum* do rio Amazonas (PtAm), *Pseudoplatystoma fasciatum* do rio Paraguai (PfPAR), *Pseudoplatystoma corruscans* do rio Paraguai (PcorPar).



## 2.4. Discussão

Os valores da AMOVA global com relação ao índice de fixação ( $F_{ST}$ ), bem como os valores par-a-par de  $F_{ST}$  indicaram inequivocamente uma diferenciação significativa entre Pantanal-Paraná e Meta-Amazonas, como esperado para a separação das duas espécies nominais de Zungaro, somente para a análise do gene RAG, embora alguma diferenciação significativa também tenha sido evidenciada em relação aos genes Cyt b e S7, em especial quando se comparou os indivíduos do Pantanal com as populações do rio Meta e do rio Amazonas.

Estes resultados foram apoiados com as análises das árvores gênicas. Os genes Cyt b e do gene S7 não conseguiram mostrar um agrupamento evidente por regiões geográficas nas diferentes populações estudadas, apontando a árvores politômicas, diferentemente do encontrado para o gene RAG onde a árvore mostrou a formação de dois clados, embora com baixo suporte, um deles agrupando os indivíduos do Pantanal e do rio Paraná (*Zungaro jahu*) e outro agrupando os indivíduos do rio Meta e do rio Amazonas (*Zungaro zungaro*).

Com os três marcadores e para todas as populações foi encontrada uma alta diversidade haplotípica e uma baixa diversidade nucleotídica que, segundo Gaffney *et al.*, (2007), é típico de espécies que passaram por uma expansão populacional após um período de baixo tamanho efetivo populacional. As populações do rio Meta e do rio Amazonas apresentaram um maior número de haplótipos com relação às populações do Pantanal e do rio Paraná. Para as seqüências do fragmento do gene Cyt b foi encontrado um haplótipo compartilhado entre todas as populações. Resultado similar também foi verificado para as seqüências do fragmento do gene S7, com um haplótipo compartilhado entre todas as populações estudadas, sugerindo serem haplótipos ancestrais e, ao mesmo tempo, indicando uma coesão genética que pode ser do gênero Zungaro. Para as seqüências do gene RAG as análises mostraram um cenário peculiar. A rede haplotípica indicou um haplótipo central que está presente somente nos indivíduos do Pantanal e do rio Paraná e é único nessas populações. Todos os haplótipos derivados foram observados somente nas populações do rio Meta e do rio Amazonas, sugerindo uma expansão do grupo Zungaro na direção do Pantanal-Paraná para o Meta-Amazonas..

O padrão unimodal observado nas análises de “*mismatch distribution*” para os genes Cyt b e S7, também pode ser indicativo de uma recente expansão populacional (Slatkin and Hudson, 1991; Rogers and Harpending, 1992; Harpending *et al.*, 1998) ou de um certo grau

de expansão com altos níveis de migração entre demes vizinhos (Excoffier 2004). Estes resultados corroboram as redes haplóticas geradas para os genes Cyt b e S7, nas quais podemos observar uma forma de estrela, característica de populações que estão em expansão (Slatkin and Hudson, 1991; Rogers and Harpending, 1992; Harpending *et al.*, 1998; Farias e Hrbek, 2008; Gaffney, 2008 e Vergara *et al.*, 2008).

O padrão de variação das diferenças genéticas nas populações variou dependendo da população e do marcador encontrando-se uma variação de 93,02% dentro das populações para o Cyt b; 57,23% entre as populações para o RAG e um equilíbrio de 47,90% dentro e 46,74% entre as populações para o gene S7.

Esses resultados para os genes RAG e S7 sugerem a existência de estruturação entre as populações do rio Meta e rio Amazonas, bem como entre as populações do Pantanal e rio Paraná. Farias e Hrbek, (2008), estudando várias populações de *Symphysodon* na região do Amazonas, encontraram uma significativa estruturação correlacionada com a distância geográfica. O mesmo foi observado por Vergara *et al.*, (2008), estudando o *Pimelodus albicans* na bacia do rio da Prata, que encontraram um alto nível de estruturação nas análises da AMOVA com a maior porcentagem de variação genética entre os grupos analisados.

A seleção natural atuando no fluxo gênico e na deriva genética aleatória pode ser uma explicação para as disparidades nos resultados dos distintos marcadores utilizados nesse trabalho (Gaffney *et al.*, 2007). Assim, os efeitos da seleção natural podem explicar porque encontramos diferentes padrões de polimorfismo para o intron do gene S7 e o intron do RAG.

Cooke e Beheregaray (2007) mencionaram que a utilidade dos introns para estudos filogeográficos tem apresentado resultados contraditórios. Alguns têm encontrado níveis razoáveis de variabilidade dos introns (Palumbi e Baker, 1994; Lavoue *et al.*, 2003; Banford *et al.*, 2004; Bernardi *et al.*, 2004; Hickerson e Cunningham, 2005; Bensch *et al.*, 2006; Ruzzante *et al.*, 2006). Outros têm detectado baixos níveis de variabilidade dos introns, que excluem o uso destes marcadores para estudos populacionais (Smith *et al.*, 2001; Broughton e Harrison, 2003; Hare e Palumbi, 2003; Caccone *et al.*, 2004; Gay *et al.*, 2004; Spinks e Shaffer, 2005; Berrebi *et al.*, 2006).

Embora a migração com fluxo gênico nestes peixes parece ser uma hipótese plausível, a presença de haplótipos exclusivos em ambos marcadores (RAG e S7) e os valores de  $F_{ST}$  poderia nos dizer que alguma restrição para fluxo gênico existe. Neste cenário, haplótipos compartilhados poderiam refletir algum polimorfismo ancestral, populações não separadas completamente ou classificação incompleta da linhagem que é comum depois de recentes divisões da população.

Este polimorfismo ancestral pode ser analisado desde o ponto de vista da formação das bacias na América do Sul. Avanços recentes da perspectiva paleontológica, confirmaram que a fauna na América do Sul é essencialmente moderna, com uma ampla escala taxonômica e ecológica que data do Mioceno tardio (25-5.2 Ma) (Hubert e Renno, 2006). Lundberg *et al.*, (1998) inferiram que o estabelecimento das drenagens principais do Neotrópico (Amazonas, Orinoco, Paraná) ocorreram durante os últimos 10 Mys, destacando o papel do antepaís andino dinâmico e dos palaeoarcs formando as bacias modernas por eventos de vicariancia e captura de cabeceiras dos rios.

A maioria de eventos relevantes para a diversificação da fauna de peixes da América do Sul parece ser aqueles ligados à história orogênica-neogênica do continente e aos eventos climáticos do Plio-Pleistoceno (Costa *et al.*, 2001). As incursões marinhas no início do Plioceno na bacia oriental do Amazonas constituem alguns dos eventos importantes que formaram as biotas do Amazonas (Marshall e Lundberg, 1996; Hubert e Renno, 2006). O último evento de grande incursão marinha, antes do estabelecimento final do Amazonas, foi previamente datado entre 15 e 10 Ma e foi postulado por elevar uns 150 m o nível do mar. (Marshall e Lundberg, 1996).

As regressões marinhas e a dinâmica do antepaís andino entre 10-8 Ma são associadas com o estabelecimento final da bacia do Amazonas. A separação da bacia do Paraná-Paraguai do proto-Amazonas se deu há uns 10 Ma, mas há evidência de eventos de captura de águas das cabeceiras do sistema de Paraná pelo Amazonas que ocorreram dentro dos últimos 10 Ma (Lundberg *et al.*, 1998; Hubert e Renno, 2006).

Precedendo o estabelecimento dos padrões modernos da drenagem no Mioceno tardio o Amazonas ocidental foi coberto pelo lago Pebas (de água doce) 15-10 Ma, que drenou para o norte ao mar Caribe através do que é agora a bacia de Maracaibo na Venezuela. O lago Pebas também foi conectado intermitentemente à bacia de Paraná e assim conectado ao Atlântico central-sul que é hoje a região do rio de la Plata. Os rios do Amazonas ocidental e central drenavam no lago Pebas, enquanto que os rios do escudo da Guiana oriental e do escudo brasileiro drenavam no oceano Atlântico através do que hoje se conhece como canal baixo do rio Amazonas. A separação da bacia do Orinoco da bacia do Amazonas ocorreu devido a formação do arco Vaupes entre 8 e 5 Ma. Assim, o Amazonas superior foi isolado dos restantes rios do Orinoco, do Paraná situados nos escudos Brasileiro e da Guiana (Hoorn, 1993; Hoorn e *et al.*, 1995; Lundberg *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2001; Alberts, *et al.*, 2006; Hubert e Renno, 2006 e Hubert *et al.*, 2007 e Farias e Hrbek, 2008).

O soerguimento no Mioceno da Cordillera Oriental (~12 Ma) e o soerguimento no Mioceno tardio dos Andes de Mérida (~8 Ma), devido à atividade tectônica, foram responsáveis de determinar os limites da drenagem moderna do Norocidente da América do Sul (NSA), incluindo o Amazonas ocidental (ocidente do arco de Purus) e das bacias do Orinoco, Maracaíbo e Magdalena (Alberts et al, 2006). O arco de Purus é uma característica geológica principal situada rio acima de Coari e está correlacionada com a divisão faunística de bacias ocidentais e orientais do Amazonas.

O arco Purus formou-se durante as últimas fases do levantamento dos Andes Sul-Americanos há 5 Ma e foi rompido provavelmente quando o rio de Amazonas inverteu seu sentido, como consequência da elevação subsequente dos Andes centrais e começou a fluir ao leste (Lundberg et al., 1998; Alberts, et al., 2006 e Hubert et al., 2007), como seu atual curso, e permitiu a conexão do Amazonas ocidental com o Amazonas central e oriental. A independência inicial da bacia do Amazonas ocidental do Amazonas central e oriental poderia ter promovido a diversificação alopátrica, enquanto que a reconecção das bacias permitiria a colonização recíproca da bacia por faunas endêmicas (Hubert e Renno, 2006; Hubert et al., 2007 e Torrico et al., 2008).

Segundo Hubert e Renno, (2006), na América do Sul existiram 11 áreas de endemismo (Paraná-Paraguai, São Francisco, Alto Amazonas, Paranaíba, Guiana, Maranhão, Tocantins-Xingu, baixo Amazonas, Orinoco- Alto Negro, Atrato-Maracaibo e San Juan) e sugerem que apesar das grandes diferenças na composição de espécies das biotas das áreas de endemismo do Paraná-Paraguai, Alto Amazonas e Tocantins-Xingu, as distribuições geográficas indicam a existência de espécies compartilhadas entre elas. Assim, mencionam que, não obstante o grande número de espécies endêmicas restritas ao alto Amazonas, algumas espécies foram compartilhadas entre as áreas do Paraná-Paraguai e do Alto Amazonas devido aos eventos de captura das cabeceiras dos rios que propocionaram uma rota de dispersão entre estas bacias (Fig. 2.11).



Figura 2.11. Possíveis rotas de dispersão de espécies entre as áreas de endemismo do Paraná-Paraguai e do Amazonas. (Retirado de Hubert e Renno, 2006).

Levando estas informações aos resultados obtidos neste trabalho, podemos inferir que a origem das populações estudadas de Zungaro seria a bacia do Paraná-Paraguai como área de endemismo, da qual devido às rotas de dispersão abertas pela captura das cabeceiras entre o Alto Amazonas e o Paraná-Paraguai, migraram às áreas do Amazonas – Orinoco. Cabe lembrar que a separação da bacia do Amazonas e do Orinoco começou há ~11 Ma com a formação do arco do Vaupes, que se estende desde o ocidente do escudo da Guiana até a vizinhança da Serrania da Macarena. No entanto, é importante ter em conta que a divisão dos dois sistemas ainda está incompleta no escudo da Guiana onde o rio Casiquiare conecta o rio Negro (sistema Amazonas) com o rio Orinoco. (Lundberg et al., 1998 e Alberts et al., 2006).

Estudos com marcadores moleculares mais polimórficos e, portanto, mais resolutivos, como os microssatélites, por exemplo, poderão auxiliar na identificação das possíveis diferenças populacionais entre os distintos sistemas hidrográficos onde essas espécies ocorrem.

## Capítulo 3

### 3. Isolamento e caracterização de microsatélites polimórficos no Jaú *Zungaro jahu* (Siluriformes, Pimelodidae) .\*

\*Trabalho publicado na Conservation Genetics .

Carrillo-Avila, M, Resende, EK, Marques DKS, and Galetti Jr, PM. (2009). Isolation and characterization of polymorphic microsatellites in the threatened catfish Jaú, *Zungaro jahu* (Siluriformes, Pimelodidae). *Conserv Genet*. DOI 10.1007/s10592-008-9802-z.

#### 3.1. Introdução

O Brasil lidera o número de peixes de água doce com cerca de 21% das espécies do mundo, possuindo 2.122 espécies catalogadas (Menezes *et al.*, 2003). Provavelmente 30 a 40% da fauna de peixes neotropicais de águas interiores ainda não foram descritas e assim, um número mais realista para as águas brasileiras pode ser de 5.000 espécies (Reis *et al.*, 2003).

Schaefer (1998), baseado em tendências históricas de descrição de espécies, afirma que esse número pode ser de 8.000. O número estimado apenas para a região amazônica é de 2.000 espécies (Winemiller *et al.*, 2005). Aproximadamente 400 novas espécies de peixes são descritas a cada década em águas continentais e Vari e Malabarba (1998) consideram um eventual aumento de 50% na riqueza de peixes do mundo (aproximadamente 33.000 espécies). Os peixes neotropicais (8.000 espécies) contribuiriam com 24% desse total o que representaria 13% da biodiversidade total de vertebrados, embora ocorram em menos de 0,003% (por volume) dos ecossistemas aquáticos do mundo (Agostinho *et al.*, 2005).

Dentro dessa grande porcentagem de peixes, Mateus e Penha (2007) mencionam que os grandes pimelodídeos são um grupo importante nas capturas de peixes de água doce da América do Sul. A família engloba cerca de 30 gêneros e 90 espécies com ampla variação de tamanhos - desde menores que 20 cm até maiores de 200 cm (Lundberg e Littmann, 2003).

O gênero *Zungaro* (Bleeker, 1858) conhecido popularmente como Jaú, tem duas espécies distribuídas pelos rios da América do Sul. *Zungaro jahu* (Ihering, 1888) ocorre mais ao sul, na bacia do Paraná-Paraguai e o *Zungaro zungaro* (Humbolt, 1821) que ocorre mais ao norte, na bacia dos rios Amazonas e Orinoco (Mateus e Penha, 2007). No entanto, na literatura ainda não existe clareza sobre a classificação e a distribuição da cada uma das espécies. Informações básicas sobre a biologia e história natural dessas espécies são escassas (Agostinho *et al.*, 2003).

No Brasil, o Jaú encontra-se listado como uma das espécies ameaçadas de extinção, sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-explotação segundo a Normativa Nº 5, de 21 de maio de 2004 emitida pela Ministra de Estado de Meio Ambiente e publicada no DOU de 28 de maio de 2004. A inclusão do Jaú nesta lista como *Z. zungaro* em vez de *Z. jahu*, foi um grande erro que precisa urgentemente ser emendado (Agostinho *et al.*, 2003; Resende, 2003). Mesmo assim o *Z. jahu* está listado como sendo vulnerável em dois estados brasileiros, Minas Gerais e Paraná (Mascarenhas-Alves, *et al* 2007). A lista de Minas Gerais foi revisada recentemente, mas ainda não foi publicada, e o *Z. jahu* será listado como criticamente ameaçado. Agostinho *et al.*, (2005) mencionaram que o jaú, é considerado como ameaçado no sistema do Pantanal devido à sobre-exploração e sua pesca está proibida no baixo Paraná.

Para o manejo dessa sobre-exploração, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis IBAMA emitiu a Portaria Nº 3 de 28 de janeiro de 2008, publicada no DOU Nº 20, de 29 de janeiro de 2008, na qual se estabelecem normas para o exercício da pesca na Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul. Seu parágrafo único diz "Entende-se por Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai, o rio Paraguai, seus formadores, seus afluentes". O tamanho mínimo de captura do Jaú foi incrementado de 90 a 95 cm. No entanto, nessa Portaria ainda persiste o erro de mencionar o jaú do Paraguai como *Z. zungaro*.

Embora o estado do *Z. jahu* seja considerado como ameaçado, até o presente não existem estudos da variabilidade genética das populações deste peixe e é muito importante o reconhecimento das unidades genéticas/populações existentes para contribuirmos em programas de conservação que considerem o pool gênico total da espécie. Para estes estudos os marcadores moleculares surgem como uma importante ferramenta no auxílio destas pesquisas.

Os marcadores moleculares constituem todo e qualquer fenótipo molecular decorrente de regiões do genoma expressas ou não. Muitas vezes, a função e seqüência de nucleotídeos

dessas regiões são desconhecidas. Um marcador molecular pode ainda constituir-se marcador genético em populações segregantes, apresentando um comportamento tipicamente mendeliano (Freitas, 2003).

O incremento tecnológico na área de marcadores moleculares tem sido fascinante e extremamente rápido (Suganuma, 2004). O desenvolvimento da técnica de amplificação em cadeia de segmentos do DNA (*Polymerase Chain Reaction* ou PCR), utilizando a DNA polimerase, tem possibilitado a descrição de classes de marcadores específicos, permitindo uma análise direta da variação genética (Freitas, 2003).

Desta forma, atualmente, diversos marcadores moleculares estão disponíveis para a detecção de variabilidade genética, dentre os quais, destacam-se os microssatélites (Tautz e Renz, 1984) ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) que são considerados extremamente eficientes para o estabelecimento de pedigrees, de mapas genéticos e para determinação dos níveis de diversidade genética (Freitas, 2003). Os microssatélites são seqüências curtas de 1-6 bases repetidas em *tandem* encontradas em todos os genomas dos eucariotos e procariotos analisados até o presente. Estão presentes nas regiões codificantes e não codificantes e são caracterizados pelo seu alto grau de polimorfismo além de constituírem um comportamento co-dominante e apresentarem um alto número de alelos. A origem de tal polimorfismo está ainda sob debate mas o mecanismo mais provável parece estar relacionado a eventos de *slippage* durante a replicação do DNA (Schlotterer e Tautz, 1992).

Apesar do mecanismo de evolução dos microssatélites ainda não ser claro, devido à alta variabilidade os SSRs tem sido amplamente empregados em diversas áreas, logo após a sua primeira descrição (Litt e Luty 1989; Tautz 1989). Os microssatélites são ferramentas extremamente valiosas para o mapeamento do genoma de vários organismos, mas as suas aplicações vão além de diferentes áreas, desde estudos de DNA forense à genética de populações aplicada à conservação dos recursos biológicos (Zane, 2002).

Os marcadores microssatélites têm sido também amplamente utilizados na identificação de populações de peixes, na verificação de relações filogenéticas entre espécies e na verificação da segregação reprodutiva entre populações reprodutivamente isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (Bernatchez *et al.*, 1998; Triantafyllidis *et al.*, 2002; Triantafyllidis *et al.* 2002b; Chihard *et al.*, 2005; Salgueiro *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005; Hatanaka *et al.*, 2005; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Sanchez *et al.*, 2007; Benites, 2008).



O principal inconveniente da utilização de marcadores microssatélites é que eles precisam ser isolados de novo para a maioria das espécies a serem examinadas pela primeira vez. Conseqüentemente, a estratégia de desenho de *primers* universais complementares a seqüências conservadas, que foi muito eficaz para o DNA mitocondrial (Kocher *et al.*, 1989), é mais problemática para os microssatélites. No entanto, a presença de regiões flanqueadoras altamente conservadas tem sido relatada para alguns locos microssatélites em cetáceos (Schlotterer *et al.*, 1991), tartarugas (Fitzsimmons *et al.*, 1995) e peixes (Rico *et al.*, 1996), permitindo a amplificação heteróloga a partir de espécies que divergiram, por muito, uns 470 milhões de anos atrás (Ma) (Zane *et al.*, 2002).

Vários protocolos estão hoje disponíveis para o isolamento dos locos microssatélites como bibliotecas genômicas, PIMA (PCR *isolation of microsatellite Arrays*), Hibridização seletiva, entre outros. Uma revisão desses métodos pode ser encontrada em Zane *et al.*, (2002).

Assim, o presente estudo visou isolar e caracterizar locos microssatélites espécie-específicos para a espécie *Z. jahu*, potencialmente úteis para estudos genéticos que possam ser aplicados ao manejo da pesca, na piscicultura e na conservação deste grupo de peixes. Além disso, foram realizadas amplificações heterólogas com DNA de outras espécies relacionadas, afim de dar uma maior amplitude de uso desses microssatélites em estudos de populações de diferentes espécies da família Pimelodidae.

### 3.2. Material e métodos

Para o isolamento dos microssatélites foi utilizada uma amostra de um indivíduo de *Z. jahu* do Pantanal, MS.

A caracterização dos microssatélites foi realizada com uma amostra de 26 indivíduos de *Z. jahu*, coletados pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Pantanal durante os anos de 2000 - 2003 na bacia do Paraguai, especificamente nos rios Cuiabá, São Lourenço, Taquari e Miranda, cujos tecidos se encontravam na coleção de referência da instituição (Fig. 3.1).

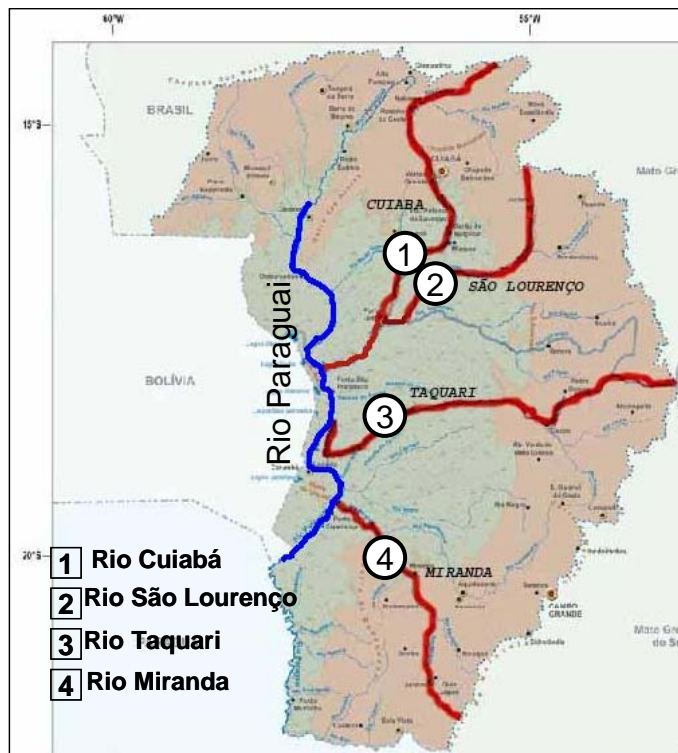


Figura 3.1. Locais de coleta nos rios do Pantanal Brasileiro.

O DNA foi extraído a partir de tecidos sólidos como músculo e nadadeira fixados em etanol 95 % e seguiu-se o método descrito por Sambrook *et al.*, (1989) com algumas modificações.

A quantificação e verificação da qualidade do DNA das amostras foram analisadas após a eletroforese em gel de agarose 0,8% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

Para o isolamento de locos de microsatélite foi utilizado o método baseado no enriquecimento com sondas biotiniladas e captura por meio de *beads* magnéticos (Hamilton *et al.*, 1999), seguindo algumas modificações como mencionado no capítulo anterior.

Para as análises moleculares foram utilizados os locos que se apresentaram polimórficos, prospectados e validados neste estudo.

Com a finalidade de se avaliar a variabilidade genética em cada uma das localidades estudadas foram calculados dados sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p \leq 0,05$ ), que tem como hipótese nula a união aleatória de gametas. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado por meio de um teste análogo ao exato de Fisher (Guo e Thompson 1992), sendo a significância de “p” calculada pelo método da cadeia de Markov-Monte Carlo, utilizando-se o programa GENEPOP 3.4 (Raymond e Rousset, 1995). Com o mesmo software também foram calculadas as frequências alélicas, heterozigosidades esperadas e observadas. O mesmo programa foi utilizado para verificar a presença de desequilíbrio de ligação. O programa cria tabelas de contingência para cada par de locos, realiza um teste de probabilidade (ou teste exato de Fisher) para cada tabela e pela cadeia de Markov estima os valores de P que indicam se as frequências genotípicas entre os dois locos são independentes.

As estimativas de riqueza alélica (Petit *et al.*, 1998) e os valores de diversidade gênica (Nei, 1987) foram obtidos por meio do programa FSTAT (Goudet, 2001). Estes parâmetros são independentes do tamanho amostral e por isso podem ser comparados mesmo entre amostras de diferentes tamanhos ao contrário dos valores obtidos com a heterozigosidade e número de alelos.

Em todas as análises múltiplas efetuadas foi considerada a correção seqüencial de Bonferroni (Rice, 1989).

A diferenciação populacional foi estimada pelos índices de fixação de Wright (1978)  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  para cada locos entre as populações com a utilização do programa FSTAT.

O coeficiente de endocruzamento ( $F_{IS}$ ) (Weir e Cockerham, 1984) para cada loco entre as populações foi calculado partindo-se da hipótese nula de união aleatória de gametas. A proporção de valores de  $F_{IS}$  presentes nesta distribuição que foram maiores que o valor observado ( $P_L$ ) nos indica se há ou não um déficit de heterozigotos. Ao contrário, a proporção de valores de  $F_{IS}$  menores que o valor observado ( $P_S$ ) nos indica se há excesso de heterozigotos.

Quando confirmado o desequilíbrio das expectativas de Hardy - Weinberg em algum dos locos, a presença de alelos nulos, bandas *stutter* ou alelos *dropout* foram avaliadas por meio do programa *Micro-checker* 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004).

### 3.3. Resultados

#### 3.3.1. Prospecção de locos microssatélites

Dos 192 clones seqüenciados, 39 (20,31%) continham seqüências microssatélites (Fig. 3.2). Em 29 (15,10%) das seqüências analisadas foi possível desenhar *primers* nas regiões flanqueadoras. Nas outras 10 seqüências com microssatélites (5,21%) não foi possível construir *primers*, pois alguns estavam localizados nas porções finais das seqüências ou as seqüências flanqueadoras não possuíam qualidade confiável.

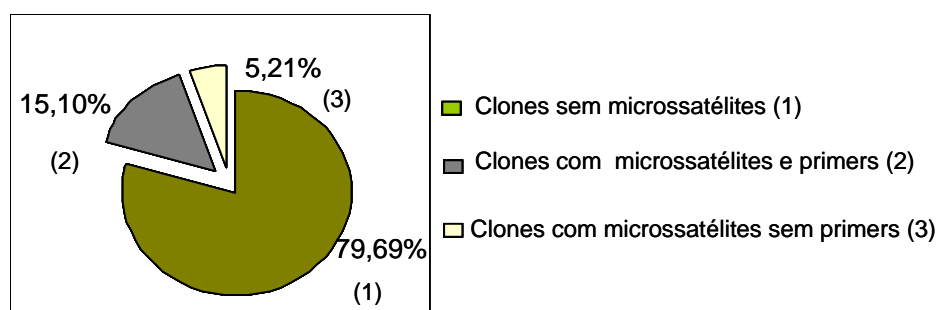


Figura 3.2. Percentagens de clones positivos seqüenciados e analisados para a obtenção de microssatélites.

Os tipos de microssatélites encontrados estiveram representados por 20,51% dinucleotídeos perfeitos, 12,52% dinucleotídeos imperfeitos, 10,26% dinucleotídeos compostos imperfeitos, 41,03% tetranucleotídeos perfeito, 12,82% tetranucleotídeos imperfeitos e 2,56% tetranucleotídeos compostos imperfeitos (Fig. 3.3).

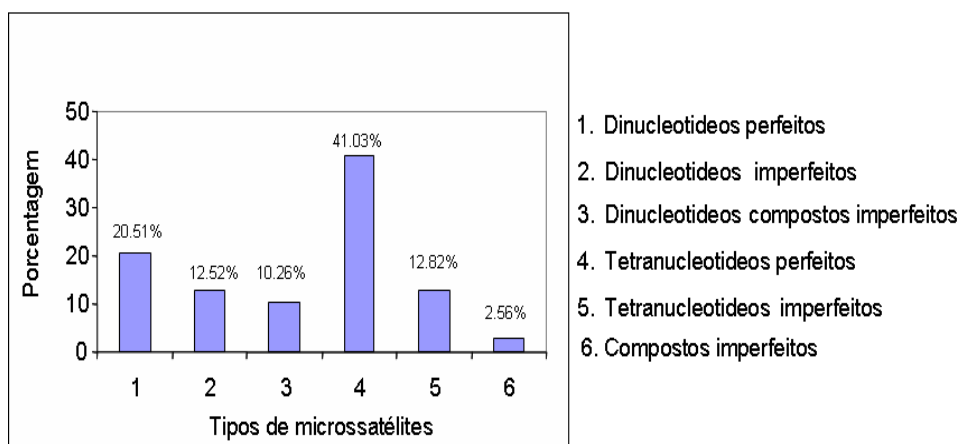


Figura 3.3. Percentagens de cada tipo de microssatélite.

Catorze pares de *primers* foram construídos e testados para a análise da variabilidade e da diferenciação populacional.

Inicialmente, para a padronização das condições das reações de PCR para cada loco, foi utilizado um termociclador de gradiente (*Mastercycler Gradient thermal cycler, Eppendorf*) no intuito de estabelecer as temperaturas ótimas de *annealing*. As PCRs subseqüentes foram realizadas em termociclador PTC-100 MJ (*Research thermal cycler*) em uma reação com um volume final de 10µL contendo 10 - 50 ng de DNA, 1x PCR buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4 e 500 mM KCl; Invitrogen), 10 µM de cada *primer*, 0.75 – 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Tabela 3.2), 0.5 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen). As condições para a amplificação foram 5 min a 94 °C, seguidos por 35 ciclos de 30s a 94 °C, 45s na temperatura de *annealing* de cada *primer* (Tabela 3.2) e 45s 72 °C, seguidos por 10 min de extensão final a 72 °C. Em cada reação de PCR foi utilizando um segundo ciclo de amplificação (Tabela 3.2) seguindo o protocolo proposto por Schuelke (2000), descrito em Sanches and Galetti (2006), no qual um *primer* de cada loco contém uma cauda M13(-18) em seu final 5'.

### **3.3.2. Caracterização dos locos microssatélites prospectados.**

Dos catorze locos que tiveram *primers* desenhados, oito locos resultaram polimórficos, quatro locos foram monomórficos e em dois locos não foi possível obter resposta positiva de amplificação. A unidade repetitiva e o tamanho do fragmento de cada um dos locos são apresentados na tabela 3.1.

Os locos que se apresentaram polimórficos foram selecionados para a caracterização populacional. As seqüências dos *primers*, o número de acesso no GenBank, temperatura ótima de anelamento (*T<sub>a</sub>*), concentração de MgCl<sub>2</sub>, a unidade repetitiva ou *motif*, e as condições do ciclo de PCR são indicadas na tabela 3.2.

Em relação à tentativa de amplificação heteróloga desses locos em cinco espécies relacionadas da família Pimelodidae, foi observado que os locos Zjahu1, Zjahu2, Zjahu5, Zjahu6 e Zjahu8 amplificaram em todas as espécies, enquanto que os locos Zjahu3 Zjahu4 e Zahu7 tiveram ampliações só em algumas delas (tabela 3.3)

Tabela 3.1. Características dos 14 locos isolados de *Zungaro jahu*

Loco	Unidades Repetitivas	Tamanho do Fragmento Amplificado (pb)	Presença de Polimorfismo
Zjahu1	(CA)15	162	Sim
Zjahu2	(TC)19	100	Sim
Zjahu3	(AAGA)25	247	Sim
Zjahu4	(CT)22	98	Sim
Zjahu5	(TG)29CGTGTC(TG)8(AG)17	203	Sim
Zjahu6	(CTTT)16.....(TGGA)5	157	Sim
Zjahu7	(TATC)5TACC(TATC)10	177	Sim
Zjahu8	(TG)13	209	Sim
P1D6	(AC)10	250	Não
P1H6	(GTTT)19CTTG(CTTT)12	387	Não
P2E4	(TACC)7	193	Não
P2G4	(GACT)5	171	Não
P1H8	(AAGT)47	290	-
P1A11	(TTAC)13	194	-

- locos sem resultado satisfatório

### 3.3.3. Análise populacional do *Zungaro jahu* da bacia do Paraguai

Os oito locos polimórficos foram utilizados na análise populacional dos 26 indivíduos coletados na Bacia do Paraguai, dos rios Cuiabá e São Lourenço, (MT) e rios Miranda e Taquari (MS).

Juntos, os oito locos produziram um total de 64 alelos diferentes, variando de 4 (Zjahu1) a 12 (Zjahu6) alelos por loco, com uma média de 8,00 (Tabela 3.4).

A heterozigosidade esperada variou de 0,33 (Zjahu2) a 0,87 (Zjahu6 e Zjahu8) com uma média de 0,66, enquanto a heterozigosidade observada variou de 0,32 (Zjahu2) a 0,8333 (Zjahu 6 e Zjahu7) com média de 0,59. (Tabela 3.4).

Os locos Zjahu2 e Zjahu8 não se mostraram sob as expectativas do equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P \leq 0,05$ ) após a correção seqüencial de Bonferroni para o ajuste do valor de P. Estes locos demonstraram uma deficiência significativa no número de heterozigotos estimada pelo  $P_L$  ( $P=0,006$ ) (Tabela 3.4). Esse déficit de heterozigotos pode ser devido, tal como sugerido pela análise no programa *Micro-Checker 2.2.1*, à presença de 28 % e 39 % de alelos nulos ( $P \leq 0,001$ ) para os locos Zjau2 e Zjau8 respectivamente.

Tabela 3.2. Caracterização dos oito locos microssatélites de *Zungaro jahu*. Temperatura de annealing (Ta), Concentração de Cloreto de Magnésio (MgCl<sub>2</sub>).

Loco	No. Acesso Genebank	Unidades Repetitivas	Primers (5'-3')	Ta (°C)	MgCl <sub>2</sub> (mM)	Tamanho alelo (pb)	ciclo inicial	ciclo M13	Concentração DNA (ng)
Zjahu01	FJ159634	(CA)15	F: TTAACCTCACACACACCTACC R: AGTACTGTACACACCACCTG	57,8	1,25	192-200	35 X	8 X	50
Zjahu02	FJ159635	(TC)19	F: AACTTGCTTACCCATGTC R: AAGGTATGTGGTATACGATG	57,8	1,0	68-108	35 X	8 X	25
Zjahu03	FJ159637	(AAGA)25	F: TATACGACATTTGGAGAG R: CGTTCTCAGAGTGGTATG	57,8	1,0	187-227	30 X	8 X	25
Zjahu04	FJ159636	(CT)22	F: TGCAAATCTCAGTTACACCTCAC R: AAACGGTTATGGTCGACTCTTC	48,1	1,25	98-110	35 X	8 X	10
Zjahu05	FJ159638	(TG)29CGTGTC(TG)8(AG)17	F: CAGGAAGTGTTAAAGGTC R: ACTGACAGTTCTCTCTGTTG	55,6	1,0	169-211	35X	8X	10
Zjahu06	FJ159639	(CTTT)16...(TGGA)5	F: CATTTTGTCTTCCATCCAG R: TCTTAATCCATCCATCCATC	59,8	1,0	160-184	35X	8X	10
Zjahu07	FJ159640	(TATC)5TACC(TATC)10	F: ACTCTTGAAGATGTGTGACT R: CCTATGGGTTTAGAATGG	55,6	0,75	109-213	35X	8X	25
Zjahu08	FJ159641	(TG)13	F: GATTTGCACTGTACATCGTC R: CTCAGATTGAACAGTCATGC	61,6	1,25	207-227	35 X	8X	10

Tabela 3.3. Amplificações heterólogas entre cinco espécies relacionadas da família Pimelodidae utilizando os oito locos isolados para *Zungaro jahu*

Espécie	Zjahu1	Zjahu2	Zjahu3	Zjahu4	Zjahu5	Zjahu6	Zjahu7	Zjahu8
<i>Zungaro zungaro</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Goslinia platynema</i>	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	+	+	-	+	+	+	+	+
<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	+	+	-	+	+	+	-	+
<i>Pseudoplatystoma tigrinum</i>	+	+	-	+	+	+	-	+

+ Resultado positivo de amplificação; - Sem resultado de amplificação

A riqueza alélica variou de 4,00 (Zjahu1) a 11,43 (Zjahu6). A diversidade gênica encontrada esteve entre 0,49 (Zjahu2) e 0,88 (Zjahu7) (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Caracterização genética dos locos isolados na população de Zungaro. Número de indivíduos analisados (N), número de alelos (Na), riqueza alélica (Ra), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), coeficiente de cruzamento ( $F_{IS}$ ) e diversidade gênica (DG).  $P_{HW}$  é o valor da significância para o teste de Hardy-Weinberg.  $P_L$  e  $P_S$  são, as probabilidades dos valores de  $F_{IS}$  serem significativamente maiores ou menores que zero (10000 randomizações), respectivamente. Os valores de P foram ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial.

Locus	N	Na	Ra	Ho	He	$P_{HW}$	$F_{IS}$	$P_L$	$P_S$	DG
Zjahu1	23	4	4,00	0,68	0,61	0,8143	-0,121	0,894	0,181	0,62
Zjahu2	26	6	5,42	0,32	0,79	0,0378*	0,454	0,006*	1,000	0,49
Zjahu3	24	8	7,50	0,40	0,33	0,4277	0,115	0,281	0,894	0,57
Zjahu4	22	5	4,91	0,50	0,50	0,3590	-0,058	0,738	0,406	0,56
Zjahu5	24	10	9,50	0,79	0,48	0,3692	0,088	0,263	0,944	0,87
Zjahu6	25	12	11,43	0,83	0,87	0,0538	0,036	0,419	0,806	0,87
Zjahu7	26	10	10,41	0,83	0,82	0,0580	0,038	0,425	0,844	0,88
Zjahu8	21	9	9,00	0,33	0,87	0,0000*	0,585	0,006*	1,000	0,80
Media	23,9	8,00	7,77	0,59	0,66	0,0000*	0,140	0,006*	1,000	0,71

\* Significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ )

As freqüências alélicas e o número de indivíduos analisados de cada um dos locos estão apresentas no anexo 1.

Nenhum dos pares de locos analisados demonstrou estar em desequilíbrio de ligação, indicando que não são ligados, e conseqüentemente, têm segregação independente (Anexo 2).



### 3.4. Discussão

#### 3.4.1. Isolamento dos microssatélites

O método de isolamento de microssatélites baseado no enriquecimento com sondas biotinizadas e captura por meio de *beads* magnéticos (Hamilton *et al.* 1999), mostrou-se eficiente no momento de recuperar as seqüências que continham os microssatélites na amostra analisada de *Zungaro jahu*. Dos 192 clones positivos seqüenciados em 29 (15%) foi possível desenhar *primers* nas regiões flangeadoras dos microssatélites. Dessas 29 seqüências, catorze foram utilizadas para construir os *primers*, dos quais oito resultaram polimórficos. Neste mesmo sentido, Usmai *et al.*, (2003) estudando a estrutura populacional do catfish *Mystus nemurus*, de um total de 150 clones seqüenciados encontraram 66 (44%) com microssatélites, dos quais construíram *primers* para 20 (13.3%). Yue *et al.*, (2003) estudando o catfish *Clarias batracus* seqüenciaram 18 clones e construíram 16 *primers* (89%) altamente polimórficos. Revaldaves *et al.*, (2005), isolando microssatélites no bagre *Pseudoplatystoma corruscans* encontraram em 81 clones positivos, 22 (27%) seqüências com microssatélites e construíram 16 (20%) *primers* sendo 5 (6.2%) altamente polimórficos, 8 sem padrão claro de amplificação e 3 monomórficos. Barbosa *et al.*, (2008), descrevendo novos microssatélites de *Prochilodus argenteus*, mencionam que, de 96 clones seqüenciados em 51 (53%) encontraram microssatélites, e conseguiram desenhar 31 (32.3%) pares de *primers* dos quais 15 (15.6%) foram exitosamente amplificados. Mohindra *et al.*, (2008), isolando *primers* para o catfish *Pangasius pangasius* em um total de 29 seqüências, 25 (86.2%) locos foram amplificados sendo 9 (31%) polimórficos, 3 (10.3%) monomórficos e 13 produziram padrões inespecíficos de amplificação. Paiva e Kalapothakis (2008) na espécie de bagre *Pimelodus maculatus* encontraram 11 locos polimórficos de 15 *primers* desenhados de um total de 118 clones positivos. Estes resultados indicam, de forma geral, que em todos estes trabalhos envolvendo isolamento de microssatélites encontram-se aproximadamente as mesmas porcentagens de locos polimórficos o qual concorda Zane *et al.*, (2002) que mencionam no seu trabalho de revisão das estratégias para o isolamento de microssatélites que a porcentagem média de microssatélites encontrados em peixes é de 3,1%, variando entre 0,066% e 8,92%.

### 3.4.2. Caracterização dos locos microssatélites de *Zungaro jahu*

Um total de 26 indivíduos do bagre do Pantanal *Zungaro jahu* foram utilizados para a caracterização dos oito locos microssatélites polimórficos isolados no presente trabalho.

O número de alelos por loco variou entre 4 e 12, com média de 8 alelos por loco. Os valores médios da heterozigosidade observada e esperada foram de 0,59 e 0,66, respectivamente. O valor encontrado de heterozigosidade média esperada é um pouco maior do que o valor médio de 0,54 reportado por De Woody e Avise (2000) para outras espécies de peixes de água doce. No entanto, são similares aos grupos de peixes estudados por Calcagnotto *et al.*, (2001), Farias *et al.*, (2003), Barroso *et al.*, (2003), Usmai *et al.*, (2003), Yue *et al.*, (2003), Revaldaves *et al.*, (2005), Carvalho-Costa *et al.*, (2006), Barbosa, *et al.*, (2008), Mohindra *et al.*, (2008) e Paiva e Kalapothakis (2008).

Em relação às expectativas do equilíbrio de Hardy - Weinberg, os locos Zjahu2 e Zjahu8 mostraram desvios significativos ao equilíbrio ( $P \leq 0.05$ ) o que pode ser entendido como a presença de um déficit de heterozigotos indicado pelos valores  $F_{IS}$ . Sanches *et al.*, (2007) mencionaram que casos como estes são comumente encontrados em estudos de populações de peixes (De Leon *et al.*, 1997; Salgueiro *et al.*, 2003; Hatanaka *et al.*, 2006; Narum *et al.*, 2006) onde têm sido apontados como os possíveis responsáveis pelo déficit de heterozigotos a ocorrência de alelos nulos, o efeito de Wahlund, o cruzamento não-aleatório, o endocruzamento ou o erro amostral (De Leon *et al.*, 1997; Xu *et al.*, 2001; Trianfayllidis, *et al.*, 2002; Revaldaves *et al.*, 2005; Moeser e Bermingham, 2005; Yazbeck e Kalapothakis, 2007; Barbosa *et al.* 2008; Paiva e Kalapothakis, 2008). Em nosso estudo, o déficit de heterozigotos parece ser devido à ocorrência de alelos nulos presentes nestes dois locos, como é sugerido pela análise no programa *Micro-Checker* ( $P \leq 0.001$ ) no qual os locos Zjahu2 e Zjahu8 teriam, respectivamente, 28% e 39% de alelos nulos presentes na população.

Dakin e Avise, (2004) definem alelos nulos como um alelo em um microssatélite que consistentemente falha na amplificação a níveis detectados através da PCR. Uma causa potencial do surgimento dos alelos nulos é o pobre anelamento do *primer* devido a divergência na seqüência de nucleotídeos (por exemplo, mutações pontuais ou indels) em um ou ambos os *primers* flanqueadores. Observa-se que mutações na extremidade 3', onde começa a extensão, são especialmente prejudiciais para a amplificação via

PCR. Outra fonte de alelos nulos envolve falha na PCR devido à inconsistência na qualidade do DNA (Dakin e Avise 2004).

Quanto à amplificação heteróloga desses locos em cinco espécies relacionadas da família Pimelodidae, foi observado que os locos Zjahu1, Zjahu2, Zjahu5, Zjahu6 e Zjahu8 amplificaram em todas as espécies, enquanto que os locos Zjahu3 Zjahu4 e Zjahu7 tiveram amplificações só em algumas destas. Resultados similares aos encontrados aqui também foram obtidos por Revaldaves *et al.*, (2005) que mencionaram altos níveis de amplificação heteróloga entre espécies da mesma família Pimelodidae quando foram usados locos microssatélites isolados para o bagre *Pseudoplatysyoma corruscans*, no entanto, poucos locos amplificaram quando usados em espécies de outras famílias de peixes.

Bárbara *et al.*, (2007), em uma análise de trabalhos que reportavam amplificações heterólogas, mencionaram que a transferibilidade dos marcadores microssatélites entre espécies é desigualmente distribuída entre os taxos. O sucesso da transferibilidade é avaliado em termos de seu polimorfismo. Testes positivos de transferibilidade de marcadores polimórficos podem ser esperados para muitos grupos de animais entre e dentro gêneros e até mesmo entre diferentes famílias em alguns casos (> 40% sucesso de transferência em mamíferos, > 25% em peixes, e > 10% em aves neste nível). Zane *et al.*, (2002) mencionam que é possível obter um 50% de sucesso na taxa de amplificação heteróloga para a detecção de polimorfismo em espécies que divergiram de 10 a 20 Ma.

Os locos microssatélites isolados e caracterizados neste trabalho poderão ser de grande utilidade para estudar a variação genética nas populações ameaçadas do *Zungaro jahu* e em outras espécies relacionadas, constituindo-se em importantes ferramentas para estudos populacionais e avaliações relacionadas à conservação e manejo de espécies nativas, assim como para o desenvolvimento de programas voltados para a aqüicultura.

## Capítulo 4

### 4. Caracterização populacional de duas espécies do gênero *Zungaro* (Siluriformes, Pimelodidae) utilizando marcadores tipo microssatélites.

#### 4.1. Introdução

Os grandes bagres do gênero *Zungaro* (Bleeker, 1858) têm duas espécies distribuídas pelos rios da América do Sul. *Zungaro jahu* (Ihering, 1888) ocorre mais ao sul, na bacia do Paraná-Paraguay e o *Zungaro zungaro* (Humbolt, 1821) que ocorre mais ao norte, na bacia dos rios Amazonas e Orinoco (Mateus e Penha, 2007). No entanto, na literatura ainda não existe clareza sobre o nome e a distribuição da cada uma das espécies. Informações básicas sobre a biologia e história natural do grupo são escassas (Agostinho *et al.*, 2003).

Esses peixes são caracterizados por apresentarem um corpo robusto, curto e grosso. Cabeça grande a qual é larga e achatada e boca enorme. A largura do corpo é menor que o seu comprimento apresentando olhos muito pequenos. Atinge até dois metros de comprimento e chega a pesar mais de 160 quilos, sendo um dos maiores peixes de água doce dos rios sul-americanos. É um peixe liso com coloração marrom escuro, ventre esbranquiçado, possuindo um enorme barbilhão. Apresenta numerosas pintas indistintas espalhadas pelo corpo, às vezes unidas, formando manchas maiores; as margens das nadadeiras, especialmente da caudal, com listras estreitas, transversais, sinuosas. Vive em rios caudalosos e se esconde em pedreiras submersas. Sua carne é muito apreciada pelos consumidores deste tipo de peixes (Mojica *et al.*, 2002).

As duas espécies do gênero encontram-se catalogadas como ameaçadas ou em perigo nas suas áreas de distribuição. Devido a este fato os governos têm tomado uma série de medidas para tentar protegê-las.

No Brasil, segundo a Normativa Nº 5, de 21 de maio de 2004, emitida pelo Ministério de Meio Ambiente e publicada no DOU de 28 de maio de 2004, o jaú se encontra listado como uma das espécies ameaçadas de extinção, sobre-explotadas ou ameaçadas de sobre-explotação. No entanto, essa Normativa apresenta um grande erro ao considerar a espécie ameaçada como a espécie *Z. zungaro*. A inclusão do *Z. zungaro*

nesta lista, em vez do *Z. jahu*, foi um erro que precisa urgentemente ser corrigido (Agostinho *et al.*, 2003; Resende, 2003).

O *Z. jahu* está listado como sendo vulnerável em dois estados brasileiros, isto é, Minas Gerais e Paraná (Machado *et al.*, 1998; Mikich e Bérnils, 2004). A lista de Minas Gerais recentemente revisada, mas ainda não publicada, coloca o *Z. jahu* como criticamente ameaçado. Agostinho *et al.* (2005) mencionaram que o jaú está considerado como ameaçado no sistema do Pantanal devido à sobre-exploração e está proibido de ser pescado no baixo Paraná.

Para o manejo desta sobre-exploração, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis IBAMA, emitiu a Portaria Nº 3, de 28 de janeiro de 2008, publicada no DOU Nº 20, de 29 de janeiro de 2008, na qual se estabelecem normas para o exercício da pesca na bacia hidrográfica do rio Paraguai, nos estados de Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e onde seu parágrafo único disse "Entende-se por Bacia Hidrográfica do Rio Paraguai, o rio Paraguai, seus formadores, seus afluentes" e na qual o tamanho mínimo de captura do Jaú foi incrementado de 90 a 95 cm. No entanto, nessa Portaria ainda persiste o erro de chamar o jaú do Paraguai como *Z. zungaro*.

Já na Colômbia, a Normativa 1087 de 1981, do *Ministerio de Medio Ambiente Vivienda y Desarrollo*, estabeleceu para jaú (amarillo em espanhol) *Z. zungaro* um tamanho mínimo de captura 85 cm de comprimento padrão para a bacia do rio Orinoco e a Normativa 75 de 1989 como tamanho mínimo de captura 85 cm de comprimento padrão para a bacia dos rios Caquetá e Amazonas. Segundo o livro vermelho de espécies de água doce da Colômbia o jaú encontra-se declarada como em perigo (Mojica *et al.*, 2002). Além do status frágil de conservação do jaú, sua biologia e ecologia são pobremente conhecidas (Agostinho *et al.*, 2003; Resende, 2003).

Até o presente, não existem estudos da variabilidade genética das populações destes peixes e é muito importante reconhecermos as unidades genéticas/populações existentes para contribuirmos em programas de conservação que considerem o pool gênico total da espécie.

Para este tipo de estudos os marcadores moleculares do tipo microssatélites surgem como ferramentas importantes, devido a seu alto polimorfismo e elevada frequência no genoma dos eucariotos (Moreira, 1999; Sukanuma, 2004), além de constituírem um comportamento co-dominante e apresentarem um alto número de alelos.

Os marcadores microssatélites têm sido amplamente utilizados na identificação de populações de peixes, na verificação de relações filogenéticas entre espécies e na verificação da segregação reprodutiva entre populações reprodutivamente isoladas, mesmo quando pertencentes ao mesmo estoque de exploração pesqueira em zona de alimentação comum (Bernatchez *et al.*, 1998; Triantafyllidis *et al.*, 2002; Chihard *et al.*, 2005; Salgueiro *et al.*, 2003; Barroso *et al.*, 2005; Carvalho-Costa *et al.*, 2006; Hatanaka *et al.*, 2005; Sanchez, 2007; Benites, 2008).

Tendo em vista a importância ecológica e econômica dos grandes bagres migradores nos diferentes sistemas hidrográficos e considerando a forte ação antrópica negativa sobre seus habitats, é muito importante começar com os estudos genético/populacionais para este grupo de peixes. Considerando o fato de o jaú ser um peixe de grande porte e, aparentemente, de grandes migrações, é necessário conhecer se existe estruturação das populações nos sistemas onde ele ocorre. Além disso, conhecendo a condição de espécie ameaçada e as alterações do habitat e sobrepesca, é importante saber se esses aspectos podem estar refletindo numa redução da variação genética desses bagres. Assim o presente estudo visou caracterizar a variação genética das populações de *Z. jahu*, em diferentes pontos de coleta no sistema Pantanal (norte e sul) e identificar se existe estruturação nas populações desses bagres naquele ecossistema, além de caracterizar a variação genética das populações de *Z. zungaro* das bacias do rio Orinoco e do rio Amazonas e identificar se existe estruturação entre essas populações. Os resultados devem constituir importantes ferramentas para o manejo das populações destas duas espécies de peixes, contribuindo de maneira efetiva para a manutenção e conservação deste grupo de peixes.

## 4.2. Material e métodos

Para o presente estudo foram analisadas amostras de duas populações de cada uma das espécies pertencentes ao gênero *Zungaro* as quais se encontram distribuídas por toda América do Sul. *Z. zungaro*, ao norte de América do Sul, bacia do rio Amazonas e rio Orinoco e *Z. jahu*, mais ao Sul na bacia do Paraná-Paraguai.

Especimens de *Z. zungaro* foram coletados na bacia do rio Orinoco, especificamente no rio Meta, próximo à cidade de Villavicencio, Colômbia (6 exemplares) e na bacia do rio Amazonas, próximo à cidade de Tabatinga (14 exemplares) (Fig. 4.1). As amostras de exemplares do *Z. jahu*, fazem parte da coleção de referência da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA - Pantanal e foram coletadas durante os anos de 2000 - 2003 na bacia do rio Paraguai. No Pantanal Norte nos rios Cuiabá e São Lourenço foram coletados 18 indivíduos e no Pantanal Sul nos rios Taquari e Miranda foram coletados 8 indivíduos (Fig. 4.1). Os exemplares não foram sacrificados coletando somente fragmentos de nadadeira. Por não serem sacrificados não foi possível verificar o sexo dos exemplares.

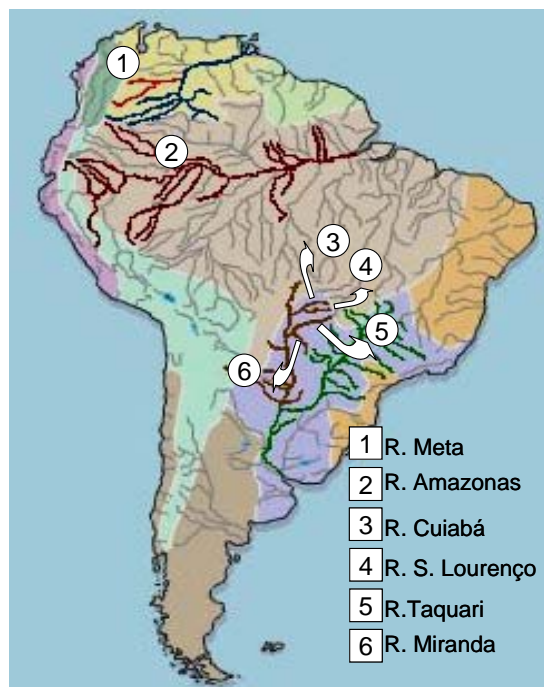


Figura 4.1. Locais de coleta das amostras de jaú. (Mapa copyright © 2003 Marc Elicson).

O DNA foi extraído a partir de tecidos sólidos como músculo e nadadeira fixados em etanol 95 % seguindo-se o método de Sambrook et al. (1989).

A quantificação e verificação da qualidade do DNA das amostras foram realizadas em gel de agarose 0,8% submerso em tampão Tris-Borato-EDTA (1x).

Para a caracterização populacional, foram utilizados oito locos polimórficos previamente isolados e caracterizados neste trabalho, seguindo as condições já descritas no capítulo anterior.

As reações de genotipagem foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), ligado ao Instituto de Biociências da USP que utiliza um seqüenciador MegaBACE 1000, com um sistema de análise de DNA de 96 capilares com tecnologia *GE Healthcare* (antiga *Amersham Biosciences*).

Com a finalidade de se avaliar a variabilidade genética em cada uma das localidades estudadas foram calculados dados sobre o equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco ou globalmente na população como um todo utilizando o teste de probabilidade; também foram calculadas as frequências alélicas, os valores não enviesados da heterozigosidade esperada e observada (Nei 1987), utilizando-se o programa GENEPOP 3.4. (Raymond e Rousset 1995).

As estimativas de riqueza alélica (Petit *et al.*, 1998), os valores de diversidade gênica (Nei, 1987) assim como a presença de desequilíbrio de ligação entre os locos (para cada par de populações ou globalmente) foram obtidos por meio do programa FSTAT (Goudet, 2001). Em todas as análises múltiplas efetuadas foi considerada a correção sequencial de Bonferroni (Rice 1989).

O grau de subdivisão populacional foi testado pelos índices de fixação de Wright (1978)  $F_{IS}$  e  $F_{ST}$  para cada locos entre as populações, com a utilização do programa FSTAT 2.9.1 (Goudet 2001). A proporção de valores de  $F_{IS}$  presentes nesta distribuição que foram maiores que o valor observado ( $P_L$ ) nos indicam déficit de heterozigotos. Ao contrário, a proporção de valores de  $F_{IS}$  menores que o valor observado ( $P_S$ ) nos indica se há excesso de heterozigotos.

A diferenciação genética entre as populações foi estimada por meio do  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984) que calcula as diferenças populacionais em comparações par-a-par, utilizando a estimativa do valor de theta ( $\theta$ ). Tal programa baseia-se no modelo de alelos infinitos (*Infinite Alleles Mutation*) (Kimura e Crow, 1964). A significância dos valores encontrados foi avaliada por meio das randomizações implementadas no próprio programa.



A existência de diferenciação significativa quanto à distribuição gênica e genotípica entre as populações foi verificada com a utilização do software FSTAT (Goudet, 20010).

A estrutura populacional baseada nos genótipos dos indivíduos foi examinada usando o procedimento Bayesiano modelo-baseado, implementado no *software Structure 2.1* (Pritchard *et al.*, 2000). Simultaneamente é realizado um *assignment test* onde os indivíduos são direcionados probabilisticamente a um ou a mais de um *cluster* quando as populações são geneticamente misturadas. Por meio da cadeia de Markov-Monte Carlo (período de *burn-in* 100.000, 1'000.000 réplicas) foram testados modelos com K=1, 2, 3, 4 e 5 populações, replicados por dez vezes, assumindo o “modelo de mistura” e com “frequências alélicas correlacionadas”.

Para verificar a possível causa dos desvios significativos do equilíbrio de Hardy - Weinberg foi utilizado o programa *Micro-Checker 2.2.3* (van Oosterhout *et al.*, 2004).

### 4.3. Resultados

Os resultados foram analisados por espécie e dentro de cada espécie foram analisados por populações, as quais se agruparam por local de captura; assim, as amostras de *Zungaro jahu* estão agrupadas em Pantanal sul (rios Miranda e Taquari) e Pantanal norte (rios Cuiabá e São Lourenço), da mesma forma *Zungaro zungaro* foi dividido em duas populações, rio Meta e rio Amazonas.

#### 4.3.1. Caracterização intrapopulacional das populações do *Z. jahu*

Nos indivíduos do pantanal sul os microssatélites analisados apresentaram um elevado polimorfismo. O número de alelos que variou entre 3 (Zjahu3) e 7 (Zjau5). Para todos os exemplares foi obtido um total de 37 alelos (média de 4,63 alelos/loco) (Tabela 4.1).

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,2747 (Zjahu3) a 0,8787 (Zjahu8) com uma média de 0,6335 para toda a população e a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,2860 (Zjau3) a 0,8750 (Zjau7) com uma média geral de 0,5915. (Tabela 4.1).

Todos os locos se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg ( $P \geq 0,05$ ), após a correção seqüencial de Bonferroni para o ajuste do valor de  $p$ . O índice de endogamia  $F_{IS}$  não evidenciou déficit de heterozigotos o qual foi verificado pelo valor do  $P_L$  para um nível de significância de 95% (Tabela 4.1).

A riqueza alélica variou de 2,00 (Zjau4) a 6,186 (Zjau8) com média de 4,192 alelos. A diversidade gênica encontrada esteve entre 0,274 (Zjau3) a 0,917 (Zjau8) (Tabela 4.1).

As frequências alélicas e o número de indivíduos analisados de cada um dos locos estão mostradas no anexo 3.

Nenhum dos pares de locos analisados nesta população demonstrou estar em desequilíbrio de ligação (Anexo 4).

Tabela 4.1. Caracterização dos oito locos microssatélites de *Z. jahu* nos indivíduos do Pantanal Sul. (N) Número de indivíduos, (Na) Número de alelos, (Ra) riqueza alélica, (Ho) heterozigosidade observada, (He) heterozigosidade esperada, ( $F_{IS}$ ) Coeficiente de endogamia e (DG) diversidade gênica. Valor de significância para equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW).  $P_L$  e  $P_S$  são, respectivamente, as probabilidades dos valores FIS serem significativamente maiores ou menores que zero (10000 randomizações). Os Valores de P foram ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial.

Loco	N	Na	Ra	Ho	He	PHW	$F_{IS}$	$P_L$	$P_S$	DG
Zjahu1	8	4	3,500	0,6250	0,6415	1,0000	0,028	0,5844	0,7188	0,643
Zjahu2	8	5	4,000	0,5000	0,4550	1,0000	-0,120	1,0000	0,6313	0,446
Zjahu3	7	3	2,714	0,2860	0,2747	1,0000	-0,043	1,0000	0,9219	0,274
Zjahu4	7	2	2,000	0,5710	0,4396	1,0000	-0,333	1,0000	0,5344	0,429
Zjahu5	8	7	6,186	0,7500	0,8583	0,2723	0,134	0,3281	0,9406	0,866
Zjahu6	8	4	3,743	0,6250	0,7167	0,5206	0,136	0,4125	0,8500	0,723
Zjahu7	8	6	5,399	0,8750	0,8083	0,2863	-0,089	0,8438	0,5688	0,804
Zjahu8	6	6	6,000	0,500	0,8787	0,0587	0,455	0,0219	0,9969	0,917
Media	7,5	4,63	4,192	0,5915	0,6335	0,7385	0,072	0,1438	0,8625	0,6378

Nos indivíduos do pantanal norte os microssatélites analisados apresentaram um elevado polimorfismo. O número de alelos que variou entre 3 (Zjahu2) e 12 (Zjau6). Para todos os exemplares foi obtido um total de 58 alelos (média de 8,13 alelos/loco) (Tabela 4.2).

A heterozigosidade esperada (He) variou de 0,4889 (Zjahu2) a 0,9144 (Zjahu6) com uma média de 0,7158 para toda a população e a heterozigosidade observada (Ho) variou de 0,1667 (Zjau3) a 0,9418 (Zjau6) com uma média geral de 0,6178 (Tabela 4.2).

Dois locos (Zjau2 e Zjau8) não se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg ( $P \leq 0,05$ ), após a correção seqüencial de Bonferroni para o ajuste do valor de p. O índice de endogamia  $F_{IS}$  sugere déficit de heterozigotos para ambos os locos o qual foi verificado pelo valor do  $P_L$  para um nível de significância de 95% (Tabela 4.2). Foram realizadas análises para estabelecer as possíveis causas desse desequilíbrio das expectativas de Hardy-Weinberg para o qual foi utilizado o *software Micro-Checker*. Essas análises sugeriram uma possível presença de alelos nulos com freqüências que variaram de 48 % (Zjau2) a 41% (Zjau8).

A riqueza alélica variou de 2,00 (Zjau4) a 6,186 (Zjau8) com média de 4,192 alelos. A diversidade gênica encontrada esteve entre 0,274 (Zjau3) a 0,917 (Zjau8) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Caracterização dos oito locos microssatélites de *Z. jahu* nos indivíduos do Pantanal Norte. (N) Número de indivíduos, (Na) Número de alelos, (Ra) riqueza alélica, (Ho) heterozigosidade observada, (He) heterozigosidade esperada, (FIS) Coeficiente de endogamia e (DG) diversidade gênica. Valor de significância para equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW). PL e PS são, respectivamente, as probabilidades dos valores FIS serem significativamente maiores ou menores que zero (10000 randomizações). Os Valores de P foram ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial. \*( $P \leq 0,05$ )

Loco	N	Na	Ra	Ho	He	PHW	F <sub>IS</sub>	P <sub>L</sub>	P <sub>S</sub>	DG
Zjahu1	15	4	3,521	0,7333	0,6230	0,9369	-0,185	0,9000	0,2625	0,61
Zjahu2	18	3	2,554	0,1667	0,4889	0,0063*	0,666	0,0031*	1,0000	0,49
Zjahu3	17	8	4,557	0,5882	0,6542	0,6588	0,104	0,3594	0,8563	0,65
Zjahu4	15	5	3,447	0,6000	0,6184	0,5798	0,031	0,5656	0,6875	0,61
Zjahu5	16	8	6,180	0,8125	0,8669	0,5020	0,065	0,3375	0,8656	0,86
Zjahu6	17	12	7,752	0,9418	0,9144	0,1598	-0,030	0,7625	0,5750	0,91
Zjahu7	18	11	7,071	0,8333	0,8937	0,5551	0,069	0,2625	0,9219	0,89
Zjahu8	15	8	5,033	0,2667	0,6667	0,0024*	0,608	0,0031*	1,0000	0,68
Media	16,38	8,13	5,014	0,6178	0,7158	0,0012	0,141	0,0031*	1,0000	0,71

As frequências alélicas e o número de indivíduos analisados de cada um dos locos estão mostradas no anexo 5.

Um dos pares de locos analisados mostrou-se em desequilíbrio de ligação (Zjau2-Zjahu4) para a população do Pantanal norte (Anexo 6).

#### 4.3.2. Caracterização interpopulacional de *Z. jahu* do Pantanal

Foi observada uma significativa diferenciação gênica em uma das comparações para o loco Zjahu8, indicando que a distribuição dos alelos é significativamente diferente entre as amostras (Tabela 4.3), enquanto à distribuição genotípica não mostrou diferenças significativas entre as populações estudadas (Tabela 4.3). Este resultado foi também revelado através do índice de fixação  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984) calculado

em comparações par-par utilizando a estimativa do valor de theta ( $\theta$ ) que apresentou um valor de 0,040, o qual não foi significativo para um nível de probabilidade do 5%.

Tabela 4.3. Valores de P (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) referentes à análise de diferenciação gênica e genotípica entre as amostras de *Z. jahu*. \* Significativamente diferente ( $P \leq 0,05$ )

Loco	Diferenciação gênica	Diferenciação genotípica
Zjahu1	0,8124	0,7548
Zjahu2	0,0756	0,377
Zjahu3	0,5512	0,4953
Zjahu4	0,8368	0,7047
Zjahu5	0,2943	0,3036
Zjahu6	0,2898	0,1477
Zjahu7	0,2799	0,2323
Zjahu8	0,0176*	0,1148

Quando os dados genotípicos, independente da origem, foram fornecidos na análise Bayesiana implementada no programa *Structure 2,1*, foi encontrada uma grande probabilidade da existência de uma única população genética de *Z. jahu*. O *assignment test* mostrou não existir uma diferença genética entre as populações estudadas indicando a existência de um único *cluster* corroborando a distancia genética encontrada pelo índice de fixação  $F_{ST}$  que não encontrou diferenças significativas entre as duas populações.

#### 4.3.3. Caracterização intrapopulacional das populações do *Z. zungaro*

Dentro desta espécie as amostras foram divididas nas populações do rio Amazonas e do rio Meta.

Nos indivíduos do rio Amazonas os microssatélites analisados apresentaram um elevado polimorfismo. O número de alelos que variou entre 5 (Zjahu1) e 11 (Zjahu2 - Zjahu5). Para todas as amostras foi obtido um total de 66 alelos (média de 8,25 alelos/loco) (Tabela 4.4).

A heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) variou de 0,70 (Zjahu1) a 0,93 (Zjahu2), com uma média de 0,83 para toda a população, enquanto a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) variou de 0,17 (Zjahu8) a 0,86 (Zjahu7), com uma média geral de 0,68 (Tabela 4.4).

Dois dos locos (Zjau5 e Zjau8) não se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg ( $P \leq 0,05$ ), após a correção seqüencial de Bonferroni para o ajuste do valor de  $p$ . O índice de endogamia  $F_{IS}$  sugere déficit de heterozigotos para ambos os locos o qual foi verificado pelo valor do  $P_L$  para um nível de significância de 95% ( $P=0,003$ ) (Tabela 4.4).

Foram realizadas análises para estabelecer as possíveis causas desse desequilíbrio das expectativas de Hardy-Weinberg no *software Micro-Checker*. Essas análises sugeriram uma possível presença de alelos nulos com frequências variaram de 27,7 % (Zjau5) a 65% (Zjau8) ( $P \leq 0,001$ ).

A riqueza alélica variou de 4,26 (Zjahu1) a 8,06 (Zjahu2). A diversidade gênica encontrada esteve entre 0,71 (Zjahu1) e 0,93 (Zjahu2- Zjahu5) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4. Caracterização dos oito locos microssatélites de *Z. jahu* usados nos indivíduos da população do rio Amazonas. (N) Número de indivíduos, (Na) Número de alelos, (Ra) riqueza alélica, ( $H_o$ ) heterozigosidade observada, ( $H_e$ ) heterozigosidade esperada, ( $F_{IS}$ ) Coeficiente de endogamia e (DG) diversidade gênica. Valor de significância para equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW).  $P_L$  e  $P_S$  são, respectivamente, as probabilidades dos valores  $F_{IS}$  serem significativamente maiores ou menores que zero (10000 randomizações). Os Valores de P foram ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial. \*( $P \leq 0,05$ )

Loco	N	Na	Ra	$H_o$	$H_e$	PHW	$F_{IS}$	$P_L$	$P_S$	DG
Zjahu1	11	5	4,26	0,64	0,70	0,2410	0,097	0,409	0,844	0,71
Zjahu2	13	11	8,06	0,85	0,93	0,2269	0,093	0,225	0,931	0,93
Zjahu3	13	8	5,65	0,69	0,78	0,4402	0,122	0,253	0,916	0,79
Zjahu4	11	8	6,35	0,82	0,84	0,4727	0,027	0,603	0,819	0,84
Zjahu5	12	11	7,74	0,50	0,91	0,0035*	0,463	0,003*	1,000	0,93
Zjahu6	12	7	5,39	0,92	0,78	0,5434	-0,180	0,981	0,194	0,78
Zjahu7	14	9	6,57	0,86	0,88	0,3303	0,022	0,575	0,766	0,88
Zjahu8	12	7	5,59	0,17	0,83	0,0000*	0,805	0,003*	1,000	0,86
Media	12,25	8,25	6,20	0,68	0,83	0,0000*	0,190	0,003*	1,000	0,84

As frequências alélicas e o número de indivíduos analisados de cada um dos locos estão mostrados no anexo 7.

Nenhum dos pares de locos analisados mostrou-se em desequilíbrio de ligação para a população do rio Amazonas (Anexo 8).

Nos indivíduos do rio Meta os microssatélites analisados também apresentaram um elevado polimorfismo. O número de alelos que variou entre 3 (Zjahu1) e 9 (Zjahu8), Para todas as amostras foi obtido um total de 48 alelos (média de 6,75 alelos/loco) (Tabela 4.5).

A heterozigosidade esperada (He) variou de 0,62 (Zjahu1) a 0,95 (Zjahu8), com uma média de 0,80 para toda a população, enquanto a heterozigosidade observada (Ho) variou de 0,17 (Zjahu4) a 1,00 (Zjahu3 e Zjahu 8), com uma média geral de 0,73 (Tabela 4.5).

Os locos se mostraram sob as expectativas de Hardy-Weinberg ( $P \geq 0,05$ ), embora o índice de endogamia  $F_{IS}$  sugira excesso de heterozigotos para os locos Zjahu3 ( $P = -0,224$ ) e Zjahu8 ( $P = -0,053$ ) (Tabela 4.5).

A riqueza alélica variou de 3,00 (Zjahu1) a 9,00 (Zjahu8) e a diversidade gênica encontrada esteve entre 0,63 (Zjahu1) e 0,95 (Zjahu8) (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Caracterização dos oito locos microssatélites de *Z. jahu* usados nos indivíduos da população do rio Meta. (N) Número de indivíduos, (Na) Número de alelos, (Ra) riqueza alélica, (Ho) heterozigosidade observada, (He) heterozigosidade esperada, ( $F_{IS}$ ) Coeficiente de endogamia e (DG) diversidade gênica. Valor de significância para equilíbrio de Hardy-Weinberg (PHW).  $P_L$  e  $P_S$  são, respectivamente, as probabilidades dos valores  $F_{IS}$  serem significativamente maiores ou menores que zero (10000 randomizações). Os Valores de P foram ajustados pela correção de Bonferroni sequencial.  $P > 0,05$ .

Locus	N	Na	Ra	Ho	He	PHW	$F_{IS}$	$P_L$	$P_S$	DG
Zjahu1	6	3	3,00	0,50	0,62	0,2117	0,211	0,413	0,909	0,63
Zjahu2	6	7	7,00	0,83	0,92	0,4842	0,107	0,341	0,928	0,93
Zjahu3	6	7	7,00	1,00	0,83	0,8850	-0,224	1,000	0,272	0,82
Zjahu4	6	3	3,00	0,17	0,44	0,0908	0,643	0,081	1,000	0,47
Zjahu5	6	7	7,00	0,67	0,88	0,2053	0,259	0,134	0,988	0,90
Zjahu6	6	6	6,00	0,83	0,88	0,7660	0,057	0,550	0,822	0,88
Zjahu7	6	6	6,00	0,83	0,86	0,8761	0,038	0,594	0,775	0,87
Zjahu8	6	9	9,00	1,00	0,95	0,1000	-0,053	1,000	0,756	0,95
Media	6	6,75	6,00	0,73	0,80	0,6313	0,096	0,091	0,981	0,81

As frequências alélicas e o número de indivíduos analisados de cada um dos locos estão mostrados no anexo 9.

Nenhum dos pares de locos analisados mostrou-se em desequilíbrio de ligação tanto para a população do rio Amazonas como para a população do rio Meta, assim como quando se compararam as populações como um todo indicando que não estão ligados e conseqüentemente segregam independentemente (Anexo 10).

#### 4.3.4. Caracterização interpopulacional em *Z. zungaro*

Foi observada uma significativa diferenciação gênica e genotípica em uma das comparações, loco Zjahu6, indicando que a distribuição dos alelos é significativamente diferente entre as amostras (Tabela 4.6). Este resultado é similar ao encontrado pelo índice de fixação  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984) calculado em comparações par-par utilizando a estimativa do valor de *theta* ( $\theta$ ) que apresentou um valor de 0,059, o qual foi significativo para um nível de probabilidade do 5%.

Tabela 4.6. Valores de P (ajustados pela correção de Bonferroni seqüencial) referentes à análise de diferenciação gênica e genotípica entre as amostras de *Z. zungaro*. \*( $P \leq 0,05$ )

Loco	Diferenciação gênica	Diferenciação genotípica
Zjahu1	0,286	0,388
Zjahu2	0,069	0,074
Zjahu3	0,237	0,313
Zjahu4	0,134	0,279
Zjahu5	0,121	0,146
Zjahu6	0,000*	0,001*
Zjahu7	0,155	0,195
Zjahu8	0,105	0,194

Quando os dados genotípicos, independente da origem, foram fornecidos na análise Bayesiana implementada no programa *Structure* 2,1, foi encontrada uma grande probabilidade da existência de uma única população genética de *Z. zungaro*. O *assignment test* sugeriu não existir uma diferença genética entre as populações estudadas indicando a existência de um único *cluster*, contradizendo a distancia genética encontrada pelo índice de fixação  $F_{ST}$  que mostrou diferenças significativas entre as duas populações.



#### 4.4. Discussão

Os locos microssatélites utilizados neste trabalho, isolados e caracterizados para a espécie *Zungaro jahu*, foram também eficientes na amplificação das populações da espécie *Zungaro zungaro*, como já demonstrado nos testes de amplificação heteróloga (capítulo anterior). Bárbara *et al.* (2007), em uma revisão sobre trabalhos que utilizaram amplificações heterólogas, mencionaram que a transferibilidade dos marcadores microssatélites entre espécies é desigualmente distribuída entre os *taxa*, sendo, no caso dos peixes, de aproximadamente 70 % de sucesso quando utilizados entre espécies dentro do mesmo gênero.

As populações de jaú aqui estudadas apresentaram um alto grau de polimorfismo nas duas espécies, sendo encontrado um número total de alelos 95 de (média de 6 alelos por loco), com heterozigosidade média esperada entre 0,63 e 0,71 para as populações de *Z. jahu* e 114 alelos (média de 7,1 alelos por loco), com heterozigosidade média esperada entre 0,80 e 0,83 para o *Z. zungaro*. Esses valores são similares ao valor médio de 0,54 de heterozigosidade e 7,5 de alelos descritos por De Woody e Avise (2000) para outras espécies de peixes de água doce, assim como aos descritos para *Piaractus mesopotamicus* (Calcagnotto *et al.*, 2001), *Astyanax fasciatus* (Strecker, 2003), *Arapaima gigas* (Farias *et al.*, 2003), *Brycon opalinus* (Barroso *et al.*, 2003), *Pseudoplatystoma corruscans* (Revaldaves *et al.*, 2005), *Prochilodus costatus* (Carvalho-Costa *et al.*, 2006), *Brycon hilarii* (Sanches e Galetti, 2006), *Prochilodus argenteus* (Barbosa, *et al.*, 2008); *Pimelodus maculatus* (Paiva e Kalapothakis, 2008) e *Pseudoplatystoma corruscans* (Benites, 2008).

Porém, é importante observar que o número de amostras é pequeno, 26 para *Z. jahu* e 20 para *Z. zungaro* e que, possivelmente, o número de alelos poderia aumentar com o aumento da amostragem.

O *Z. jahu* apresentou um desvio significativo do equilíbrio de Hardy-Weinberg para a população do pantanal norte (locos Zjahu2 e Zjahu 8) assim como no *Z. zungaro* para a população do rio Amazonas (locos Zjahu5 e Zjahu 8), desvios devidos ao déficit de heterozigotos revelado pelo índice de endogamia  $F_{IS}$  (Wright, 1978). Segundo Sanches (2007), casos como esses são comumente encontrados em estudos com populações de peixes.

Esse déficit de heterozigotos parece ser devido à presença de alelos nulos, como sugerido pelo *software Micro-checker*. Segundo Dakin e Avise (2004), potenciais

causas do surgimento dos alelos nulos são o pobre anelamento do *primer* devido à divergência na seqüência de nucleotídeos (por exemplo, mutações pontuais ou indels) em um ou ambos *primers* flanqueadores, falhas na PCR devido à inconsistência na qualidade do DNA ou mutações na extremidade 3', que podem produzir amplificação preferencial de um dos alelos, onde o alelo de menor tamanho geralmente amplifica mais eficientemente que o maior, de modo que unicamente este poderá ser detectado em um indivíduo heterozigótico

O desequilíbrio de ligação unicamente detectado para os locos *Zjahu2* x *Zjahu4* na população do pantanal norte da espécie *Z. jahu*, que pode estar indicando a não segregação independente destes dois locos nesta população ou um viés populacional relacionado ao tamanho amostral.

Não foi possível detectar algum tipo significativo de estruturação genética entre as populações de *Z. jahu* que foram coletadas no pantanal norte e sul quando foram considerados todos os diferentes parâmetros da diversidade genética (riqueza alélica, heterozigosidade, diversidade gênica e genotípica), fato verificado tanto pelo valor do  $F_{ST}$  (0,040) quanto pelo resultado obtido com o *software Structure* ( $K=1$ ).

Segundo Wright (1978), valores do  $F_{ST}$  entre 0,00 e 0,05 indicam baixa estruturação genética; valores entre 0,05 e 0,15 indicam estruturação genética moderada; valores entre 0,15 e 0,25 estruturação genética alta e valores acima de 0,25 indicam estruturação genética forte. Assim, os valores do  $F_{ST}$  poderiam indicar que existe uma baixa estruturação genética apesar dessa não ser significativa entre as duas populações podendo ser considerada como um único pool gênico.

Esta baixa estruturação poderia ser explicada por várias causas. A distribuição geográfica do pantanal pode ser uma delas. O Pantanal é parte de uma única bacia hidrográfica (rio Paraguai) e é tido como a maior planície alagada do mundo. Trata-se de uma área formada por terrenos predominantemente planos e suavemente ondulados, alagados periodicamente por uma série de rios corixos e vazantes entremeadas de lagoas, baías e leques aluviais (EMBRAPA, 2004). Apresenta uma altitude que varia entre 80 m e 150 m, com uma declividade extremamente pequena, de 1 a 3 cm/km no sentido norte-sul e de 12 a 15 cm/km no sentido leste-oeste (Resende, 2003). Esses fatores, associados as chuvas periódicas anuais que caem na Bacia do Alto Paraguai, além da predominância de litologias sedimentares recentes, dificultam o escoamento das águas da superfície, causando inundações periódicas anuais e/ou plurianuais (Silva e Abdon, 1998). Assim, durante os meses de outubro a abril, as chuvas aumentam o

volume das águas dos rios, as águas extravasam seus leitos e inundam a planície pantaneira, fazendo das cheias uma das principais características do Pantanal (Meldau, 2001). Quando o período das chuvas chega ao final, entre os meses de maio e setembro, as águas baixam lentamente voltando ao seu curso normal.

Outra possível causa da falta de estruturação, além das características de inundação, é a ausência de barreiras geográficas ao longo do rio Paraguai, desde suas cabeceiras no Mato Grosso até sua foz no rio Paraná e daí até o rio da Prata, percorrendo nesse itinerário, territórios do Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina (Catella, 2003). Esses aspectos, juntos ou isoladamente, podem favorecer os peixes como o jaú que fazem migrações durante o período reprodutivo (Agostinho *et al.*, 2003, Resende, 2003), permitindo o fluxo gênico entre as diferentes populações que habitam a bacia do rio Paraguai. Entretanto, o número de locos analisados pode ter sido insuficiente para se conseguir detectar diferenciação por meio da estatística “F” implementada no programa FSTAT, assim como o número de indivíduos genotipados também pode não ter sido o adequado e, conforme Laikre *et al.*, (2005), sob o contexto da conservação, é sempre mais aconselhável considerar a existência de subdivisões populacionais do que tratar uma série de populações distintas como uma única população panmítica, o que poderia resultar em depleção da variação genética.

Diferentemente ao encontrado em *Z. jahu* no Pantanal, nas populações de *Z. zungaro* do rio Meta e o rio Amazonas, os valores do  $F_{ST}$  (0,059) foram significativos para separar as duas populações indicando, segundo os critérios de Wright (1978), uma estruturação genética moderada, embora ao análise Baeynsiana no *software Structure* tenha estabelecido uma única população ( $K=1$ ). No entanto, o  $F_{ST}$  além de ser o índice mais utilizado para estimar a distância genética entre populações de peixes (O’Connell e Wright, 1997), é o mais indicado em estudos que contenham amostras de tamanho moderado a pequeno (menor que 50) e que utilize menos do que 10 locos, bem como quando o número de migrantes é alto, o que torna a migração um fator mais importante do que as mutações (Gaggiotti *et al.*, 1999).

Na literatura existem vários relatos sobre a diferenciação ou estruturação populacional, principalmente em escala espacial, encontrada para peixes dentro um mesmo sistema hidrográfico (Hassanien *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004; Wirth e Bernatchez, 2001). Casos de estruturação populacional também têm sido relatados para peixes brasileiros de água doce. Exemplos de estruturação são os reportados para as espécies *Prochilodus argenteus* (Hatanaka e Galetti, 2003, Hatanaka *et al.*, 2006) e

*Brycon orthotaenia* (Wasko e Galetti, 2002) da Bacia do São Francisco. No caso da espécie *Brycon opalinus*, endêmica da Bacia do Paraíba do Sul, análises do DNA mitocondrial e dos marcadores microssatélites revelaram também uma diferenciação populacional na bacia (Hilsdorf *et al.*, 2002; Barroso *et al.*, 2005). Sanches (2007), com marcadores microssatélites, encontrou diferenças significativas entre pelo menos duas populações de *B. hilarii*. Benites (2008) identificou uma forte diferenciação genética entre 11 populações de *Pseudoplatystoma corruscans* das bacias dos rios Paraná e Paraguai utilizando marcadores microssatélites.

A estrutura populacional encontrada nas populações de *Z. zungaro* pode ter uma explicação histórica, relacionada a origem das bacias hidrográficas amostradas. As bacias do rio Orinoco (Meta) e do rio Amazonas foram separadas durante a atividade tectônica do Mioceno há uns ~8-9 Ma (Albert *et al.*, 2006). Embora atualmente estejam comunicadas pelo braço ou rio Casiquiare que desvia um terço das águas do rio Orinoco e as leva para o rio Guaina na Colômbia ou rio Negro (bacia do rio Amazonas) no Brasil, é possível que o fluxo gênico hoje existente, se houver algum, é reduzido o suficiente para manter a estrutura de uma metapopulação com populações geográficas geneticamente diferenciadas.

Segundo Benites (2008), embora algumas espécies sejam migratórias com grande poder de deslocamento, existe uma capacidade máxima de migração determinada para cada espécie, o que pode fazer com que populações provenientes de localidades geograficamente distantes não se encontrem no período apropriado à reprodução, limitando o fluxo gênico entre as diferentes populações (Narum *et al.*, 2004). Deste modo, a distância geográfica pode ser a importante força atuando na manutenção da diferenciação das duas populações de *Z. zungaro* aqui estudadas.

Os resultados obtidos demonstram um bom estado genético das populações e das espécies em geral, que apesar de se encontrarem catalogadas como ameaçadas, apresentam valores de diversidade genética comparáveis aos descritos para outros peixes. Além disso, nossos resultados ajudaram na identificação de diferentes unidades genéticas, que são as unidades populacionais básicas representadas por indivíduos geneticamente mas homogêneos que se reproduzem aleatoriamente (ou próximo à aleatoriedade) em uma área em particular (Laikre *et al.*, 2005), particularmente em *Z. zungaro* no sistema Orinoco-Amazonas. Assim, acreditamos que os resultados desse trabalho podem ser úteis para a implementação de programas de manejo e conservação de cada uma das unidades genéticas identificadas, permitindo a conservação da

variabilidade genética total e, conseqüentemente, o potencial adaptativo e evolutivo da espécie.

## 5. Conclusões gerais

Com base nos resultados obtidos a partir dos três marcadores moleculares (Cyt b, RAG e S7) utilizados para este estudo nas populações de Zungaro podemos concluir que:

- Existe uma estrutura populacional entre os indivíduos amostrados. Esta estruturação é devida principalmente as diferenças encontradas entre as populações do Pantanal – Paraná com relação às populações do Meta e Amazonas, corroborando a separação das espécies *Z. jahu* e *Z. zungaro*. Estruturação também foi moderadamente observada em *Z. zungaro* entre as populações do rio Meta e do rio Amazonas.
- Segundo as redes haplotípicas, em geral as populações compartilham um haplótipo central, indicando uma coesão genética no gênero. As populações do Meta- Amazonas apresentaram um maior número de haplótipos derivados indicando uma provável expansão populacional.
- A ocorrência de um haplótipo exclusivo e central para as populações do Pantanal-Paraná do qual são derivados os haplótipos do Meta e Amazonas, quando utilizado o gene RAG, suportariam a idéia de que estas populações seriam o centro de dispersão e manteriam o haplótipo ancestral.

Em relação á caracterização populacional realizada mediante o uso dos marcadores microssatélites temos que:

- O protocolo da biblioteca enriquecida resultou eficiente no isolamento de locos microssatélites para o *Zungaro jahu*.
- Os locos microssatélites prospectados foram eficientes na amplificação e verificação de polimorfismo em *Zungaro jahu*
- As análises de amplificação heteróloga dos oitos locos polimórficos mostraram amplificação positiva para grande parte das espécies da família Pimelodidae testadas, obtendo um 100% de amplificação para a espécie *Zungaro zungaro* .

- Os marcadores microssatélites foram eficazes para a análise da diversidade genética em populações selvagens das duas espécies do gênero *Zungaro*, *Z jahu* e *Z zungaro* das bacias do Paraguai, Orinoco e Amazonas,
- As análises estatísticas mostraram evidencia da existência de uma única população da espécie *Z jahu* habitando o pantanal norte e sul. Em contraste, em *Z zungaro* as duas populações estudadas (do rio Meta, bacia do Orinoco, e do rio Amazonas) mostraram-se significativamente diferentes, evidenciando uma estruturação populacional.
- Os resultados de variação genética evidenciaram valores comparáveis a outras espécies de peixes de outras localidades, a despeito do jaú ser uma espécie ameaçada.

## 6. Referências bibliográficas

ADAMOLI, J.O. (1982). Pantanal e suas relações fitogeográficas com os cerrados: Discussões sobre o conceito de complexo do Pantanal. In: Congresso Nacional da Sociedade Botânica do Brasil, 2, Teresina, 1981. Anais. Teresina. Universidade Federal do Piauí.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L.C.; SUZUKI, H.I.; AND JÚLIO, JR, H.F. (2003). Migratory Fishes Of The Upper Paraná River Basin Brazil. Em Migratory Fishes of South America : Biology, Fisheries and Conservation Status / edited by Joachim Carolsfeld .[et al]. Co-published by IDRC and the World Bank.

AGOSTINHO, A. A.; THOMAS, S.M., AND GOMES, L.C. (2005). Conservação da Biodiversidade em águas continentais do Brasil. MEGADIVERSIDADE, Volume 1, Nº 1 70-77, Julho.

AKIHITO, A.; KOBAYASHI, T.; IKEO, K.; IMANISHI, T.; ONO, H.; UMEHARA, Y.; HAMAMATSU, C.; SUGIYAMA, K.; IKEDA, Y.; SAKAMOTO, K.; FUMIHITO, A.; OHNO, S. AND GOJOBORI, T. (2000). Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *Gene*, 259: 5-15.

ALBERT, J.S.; LOVEJOY, N.R. AND CRAMPTON, W.G.R. (2006). Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South America Earth Sciences*, 21: 14–27.

ALMEIDA, F.S.; SODRÉ, L.M.K.; CONTEL, E.P.B. (2003). Population structure analysis of *pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tietê and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genet. Mol. Biol.*, v. 26, p. 301-305.

ANDRADE, F.; SCHNEIDER, H.; FARIAS, I.; FELDBERG, E. AND SAMPAIO, I. (2001). Análise filogenética de duas espécies simpátricas de tucunaré (*Cichla*, Perciformes), com registro de hibridização em diferentes pontos da bacia Amazônica, *Revista Virtual de Iniciação Acadêmica de Universidade Federal do Para* **1**, pp. 1–11.



ANTUNES A.; TEMPLETON, A.R.; GUYOMARD, R. AND ALEXANDRINO, P. (2002). The role of nuclear genes in intraspecific evolutionary inference: genealogy of the transferrin gene in the brown trout. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1272-1287.

ARBOGAST, B. AND KENAGY, G.J. (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*, 28: 819-825.

ARRATIA, G. AND CIONE, A. (1996). The record of fossil fishes of southern South America. In: Arratia, G. (Ed.). *Contributions of Southern South America to Vertebrate Paleontology*. Münchner Geowissenschaftliche Abhandlungen A 30.

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. (1989). Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43: 1192-1208.

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

AVISE, J.C. (2004). *Molecular markers, natural history and evolution*. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers. 541p.

AVISE, J.C. AND SAUNDERS, N.C. (1987). Hybridization and introgression among species of sunfish (*Lepomis*): analysis by mitochondrial DNA and allozyme markers. *Genetics*, 108: 237-355.

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A. AND SAUNDERS, N.C. (1987). Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.

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.

BALLOUX, F. AND LUGON-MOULIN, N. (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11 p. 155-165.

BANFORD, H.M.; BERMINGHAM, E. AND COLLETTE, B.B. (2004). Molecular phylogenetics and biogeography of transisthmian and amphi-Atlantic needlefishes (Belontiidae: Strongylura and Tylosurus): perspectives on New World marine speciation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 833–851

BARBARA, T.; PALMA-SILVA, C.; PAGGI, G. M.; BERED, F.; FAY, M. F. AND LEXER, C. (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations. *Molecular Ecology* doi: 10.1111/j.1365-294X.2007.03439.x

BARBOSA, A C.D.R., GALZERANI, F., CORRÊA, T. C., GALETTI JR. P. M. AND HATANAKA T. (2008). Description of novel microsatellite loci in the Neotropical fish *Prochilodus argenteus* and cross-amplification in *P. costatus* and *P. lineatus*. *Genetics and Molecular Biology*, 31, 1 (suppl), 357-360.

BARROSO, R. M.; HILSDORF, A. W. S.; MOREIRA, H. L. M.; MELLO, A. M.; GUIMARÃES, E. F.; CABELLO, P. H.; TRAUB-CSEKO, Y. M. (2003). Identification and characterization of microsatellites *loci* in *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconinae). *Molecular Ecology Notes*, 3: 297-298.

BEERLI, P. AND FELSENSTEIN, J. (1999). Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics*, 152: 763-773.

BENITES, C. (2008). Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans*, (Spix e Agassiz, 1829) (Siluriformes:Pimelodidae) da Bacia Paraná-

Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microsatélite. Tese doutorado, Centro de Aquicultura da Universidade Estadual Paulista.

BENSCH, S.; IRWIN, D. E.; IRWIN, J. H.; KVIST, L. AND AKESSON, S. (2006). Conflicting patterns of mitochondrial and nuclear DNA diversity in *Phylloscopus* warblers. *Molecular Ecology* 15, 161–171.

BENSON, G. (1999). "Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences" *Nucleic Acids Research*. Vol. 27, No. 2, pp. 573-580.

BERNARDI, G., BUCCIARELLI, G., COSTAGLIOLA, D., ROBERTSON, D. R. AND HEISER, J. B. (2004). Evolution of coral reef fish *Thalassoma* spp. (Labridae). 1. Molecular phylogeny and biogeography. *Marine Biology* 144, 369–375.

BERNARDI, G.; D'ONOFRIO, G.; CACCIO, S. AND BERNARDI, G. (1993). Molecular phylogeny of bony fishes, based on the amino acid sequence of the growth hormone. *Journal of Molecular Evolution*, 37: 644-649.

BERNATCHEZ, L.; DEMPSON, J.B. AND MARTINS, S. (1998). Microsatellite gene diversity analysis in anodromus char, *Salvelinus alpinus*, from Labrador, CANADÁ. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* *J.CAn.Sci. Halieut. Aquat.*, 55: 1264-1272.

BERREBI, P.; XAVIER, R.; FANG, F. AND ZHANG, C.-G. (2006). Population structure and systematics of *Opsariichthys bidens* (Osteichthyes: Cyprinidae) in south-east China using a new nuclear marker: the introns (EPIC-PCR). *Biological Journal of the Linnean Society* 87, 155–166.

BONETTO, A. A. (1996). Panorama sinóptico sobre la ictiofauna, la pesca y la piscicultura en los rios de la Cuenca de la Plata, con especial referencia al Paraná. *Revista de Ictiologia* 6: 3-16.

BROUGHTON, R. E. AND HARRISON, R. G. (2003). Nuclear gene genealogies reveal historical, demographic and selective factors associated with speciation in field crickets. *Genetics* 163, 1389–1401.

BROWER, A.V.Z.; DESALLE, R. AND VOGLER, A. (1996). Gene trees, species tree, and systematics: A Cladistic Perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 27:423–450.

450.

BROWN, W. M.; GEORGE, M. Jr AND 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. AND WILSON, A.C. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 18: 225-239.

CACCONI, A.; GENTILE, G.; BURNS, C. E.; SEZZI, E.; BERGMAN, W.; SALTONSTALL, K. AND POWELL, J. R. (2004). Extreme difference in rate of mitochondrial and nuclear DNA evolution in a large ectotherm, Galapagos tortoises. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31, 794–798.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M. AND DeSALLE, R. (2001). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish. *Molecular Ecology Notes*, 1: 245-247.

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

CANTATORE, P.; ROBERTI, M.; PESOLE, G.; LUDOVICO, A.; MILELLA, F.; GADALETA, M.N. AND 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.

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T. AND GALETTI, P. M. (2006). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. *Molecular Ecology Notes*, 6 (2): 818-819.

CATELLA, A C. (2003). A pesca no pantanal sul: Situação atual e perspectivas. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Documentos 48. Corumbá, M.S. P. 45.

CHIRHART, S.E.; HONEYCUTT, R.L.; GREENBAUM, I.F. (2005). Microsatellite variation and evolution in the *Peromyscus maniculatus* species group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34, p. 408-415.

CHOW, S., AND HAZAMA, K. (1998). Universal primer for S7 ribosomal protein gene intron in fish. *Mol Ecol* 7:1255–1256.

CLABAUT, C.; SALZBURGER, W. AND 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.

CLARK, A.G. (1990). Inference of haplotypes from PCR-amplified samples of diploid populations. *Molecular Biology and Evolution*, 7: 111-122.

COOKE, G.M. AND BEHEREGARAY, L.B. (2007). Extremely high variability in the s72 intron of the amazonian cardinal tetra (*paracheirodon axelrodi*). *Journal of fish biology* 71 (supplement a), 132–140.

COSTA, J.B.; BEMERGUY, S.R.L.; HASUI, Y. AND BORGES, M.D. (2001). Tectonics and paleogeography along the Amazon river. *Journal of South American Earth Sciences* 14, 335-347.

CRUZAN, M.B. AND TEMPLETON, A.R. (2000). Paleoecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *Trends Ecol Evol*. 15:491-496.

DAKIN, E.E. AND AVISE, J.C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93, p. 504-509.

DE LEÓN, F. J. G.; CHIKHI, L. AND BONHOMME, F. (1997). Microsatellite polymorphism and population subdivision in natural populations of European sea bass *Dicentrarchus labrax* (Linnaeus, 1785). *Molecular Ecology*, 6: 51-62.

DE WOODY, J. A. AND AVISE, J. C. (2000). Microsatellite variation in marine, freshwater and anadromous fishes compared with other animals. *Journal of Fish Biology*, 56: 461-473.

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

DERGAM, J.A.; PAIVA, S.R.; SCHAEFFER, C.E.; GODINHO A.L. AND VIEIRA, F. (2002). Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces: Teleostei) in southeastern Brazil, *Genet. Mol. Biol.* 25 (2002), pp. 379–387.

EMBRAPA. O que é o Pantanal. [www.Embrapa.gov.br](http://www.Embrapa.gov.br) (02/05/2004).

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

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

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., SMOUSE, P., AND QUATTRO, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.

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

FARIAS, I. P.; HRBEK, T.; BRINKMANN, H.; SAMPAIO, I.; AND MEYER, A. (2003). Characterization and isolation of DNA microsatellite primers for *Arapaima gigas*, an economically important but severely over-exploited fish species of the Amazon basin. *Molecular Ecology Notes*, 3 (1): 128-130.

FARIAS, I.P. AND HRBEK, T., (2008). Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae), *Mol. Phylogenet. Evol.* doi:10.1016/j.ympev.2008.05.033

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

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* (1999) 48:703–711.

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

FENG, B.; BULCHAND, S.; YAKSI E.; FRIEDRICH, R. W. AND JESUTHASAN, S. (2005). The recombination activation gene 1 (*Rag1*) is expressed in a subset of zebrafish olfactory neurons but is not essential for axon targeting or amino acid detection. *BMC Neuroscience* 2005, 6:46

FITZSIMMONS N.N., MORITZ C., MOORE S.S. (1995). Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300-million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12:432–440.

FOSTER, P.G. AND HICKEY, D.A. (1999). Compositional bias may affect both DNA-based and protein-based phylogenetic reconstructions. *Journal of Molecular Evolution*, 48: 284-290.

FREITAS, P. D.; MARTINS, D. S. AND GALETTI JR. P. M. (2008). CID: a rapid and efficient bioinformatic tool for the detection of SSRs from genomic libraries. *Molecular Ecology Resources* 8, 107–108

FREITAS, P.D. DE (2003). Estudos de diversidade genética em estoques reprodutores de camarões *Litopenaeus vannamei* cultivados no Brasil. Tese de doutorado, Universidade Federal de São Carlos, 120p..

FRIESEN, V. (2000). Introns. In: Baker, A.J. (Ed.). *Molecular Methods in Ecology*. Londres: Blackwell.

FU, Y-X AND 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.

Fu, Y-X. e Li, W-H. (1999). Coalescing into the 21st century: an overview and prospects of coalescent theory. *Theoretical Population Biology*, 56: 1-10.

GAFFNEY, PM, J RUPNOW, AND DOMEIER, ML. (2007). Genetic similarity of disjunct populations of the giant sea bass *Stereolepis gigas*. *J Fish Biol* 70 (Supplement A):111-124.



GAGGIOTTI, E. O.; LANGE, O.; RASSMAN, K.; GLIDDON, C. (1999). A comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. *Molecular Ecology*, 8: 1513-1520.

GARCÍA-MACHADO, E.; DENNEBOUY, N.; SUAREZ, M.O.; MOUNOLOU, J.C. AND MONNFROT, M. (1996). Partial sequence of the shrimp *Penaeus notialis* mitochondrial genome. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Paris*. 319-486.

GAY, L.; DEFOS DU RAU, P.; MONDAIN-MONVAL, J. Y. AND CROCHET, P. A. (2004). Phylogeography of a game species: the red-crested pochard (*Netta rufina*) and consequences for its management. *Molecular Ecology* 13, 1035–1045.

GAYET, M. AND MEUNIER, F.J. (1998). Maastrichtian to early late Paleocene freshwater Osteichthyes of Bolivia: additions and comments. 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. pp. 85–110.

GOUDET, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995).

GOUDET, J.; RAYMOND, M.; DE MEEÛS, T. AND ROUSSET, F. (1996). Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* 144:1933–1940.

GRANDE, T.; LATEN, H. AND LÓPEZ, J.A. (2004). Phylogenetic relationships of extant Esocid species (Teleostei: Salmoniformes) based on morphological and molecular characters. *Copeia*, 4: 743–757.

GRAYBEAL, A. (1995). Naming species. *Systematic Biology*, 44 (2), pp. 237-250.

GRIFFITHS, C.S. (1997). Correlation of functional domains and rates of nucleotide substitution in cytochrome b. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 7: 352–365.

GUO, S. W. AND THOMPSON, W. A. (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 48: 361-372.

HALL, B.G. (2001). *Phylogenetic trees made easy: a how-to manual for molecular biologists*. Sunderland: Sinauer Associates.

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

HAMILTON, M.B.; PINCUS, E.L.; DI FIORI, A. AND FLEISCHER, R.C. (1999). Universal linker and ligation procedures for construction of genomic DNA libraries enriched for microsatellites. *BioTechniques*, 27: 500-507.

HARDMAN, M. (2002). *The Phylogenetic Relationships among Extant Catfishes, with Special Reference to Ictaluridae (Otophysi: Siluriformes)*. Unpublished PhD. *Dissertation*, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana.

HARDMAN, M. (2004). The phylogenetic relationships among *Noturus* catfishes (Siluriformes: Ictaluridae) as inferred from mitochondrial gene cytochrome *b* and nuclear recombination activating gene 2. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30: 395–408.

HARDMAN, M. AND LUNDBERG, J.G. (2006). Molecular phylogeny and a chronology of diversification for “phractocephaline” catfishes (Siluriformes: Pimelodidae) based on mitochondrial DNA and nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40: 410–418.

HARDMAN, M. AND PAGE, L.M. (2003). Phylogenetic relationships among bullhead catfishes of the genus *Ameiurus* (Siluriformes: Ictaluridae). *Copeia*, 1: 20–33.

HARE, M. P. AND PALUMBI, S. R. (2003). High intron sequence conservation across three mammalian orders suggesting functional constraints. *Molecular Biology and Evolution* 20, 969–978.

HARE, M.P. (2001). Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 700–706.

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

HARTL, D.L. AND CLARK, A.G. (2006). *Principles of Population Genetics*. Sinauers Associates, Sunderland, MA.

HASSAN, M.; LEMAIRE, C.; FAUVELOT, C. AND BONHOMME, F. (2002). Seventeen new exon-primed intron-crossing polymerase chain reaction amplifiable introns in fish. *Molecular Ecology Notes*, 2: 334–340.

HASSANIEN, H. A.; ELNADY, M.; OBEIDA; A.; ITRIBY, H. (2004). Genetic diversity of Nile tilapia populations revealed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Aquaculture Research*, 35: 587-593.

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

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

HE, M AND HAYMER, D.S. (1997). Polymorphic intron sequences detected within and between populations of the Oriental fruit fly (*Diptera: Tephritidae*). *Annals of the Entomological Society of America*, 90: 825–831.

HE, S.; MAYDEN, R.L.; WANG, X.; WANG, W.; TANG, K.L.; CHEN, W.J. AND; CHEN, Y. (2008). Molecular phylogenetics of the family Cyprinidae (Actinopterygii: Cypriniformes) as evidenced by sequence variation in the first intron of S7 ribosomal

protein-coding gene: further evidence from a nuclear gene of the systematic chaos in the family. *Mol Phylogenet Evol.* Mar;46 (3):818-29.

HEWITT, G.M. (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time, *Mol. Ecol.* 10 , pp. 537–549.

HICKERSON, M. J. AND CUNNINGHAM, C. W. (2005). Contrasting quaternary histories in an ecologically divergent sister pair of low-dispersing intertidal fish (*Xiphister*) revealed by multilocus DNA analysis. *Evolution* 59, 344–360.

HILLIS, D. M., AND. HUELSENBECK. J. P. (1992). Signal, noise, and reliability in molecular phylogenetic analyses. *J. Hered.* 83:189–195.

HILSDORF, A. W. S.; AZEREDO-ESPIN, A. M. L.; KRIEGER, M. H.; KRIEGER, J. E. (2002). Mitochondrial DNA diversity in wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Curvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconinae) from the Paraíba do Sul Basin, Brazil. *Aquaculture*, 214: 81-91.

HOELZER, G.A. (1997). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees revisited. *Evolution*, 51: 622–626.

HONEYCUTT, R.L.; NEDBAL, M.A.; ADKINS, R.M. AND JANECEK, L.L. (1995). Mammalian mitochondrial DNA evolution: a comparison of the cytochrome b and cytochrome c oxidase II genes. *Journal of Molecular Evolution.*, 40: 260–272.

HOORN, C. (1993). Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*, 105, 267–309.

HOORN, C.; GUERRERO, J.; SARMIENTO, G.A. AND LORENTE, M.A. (1995). Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology*, 23, 237–240.

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

HRBEK, T.; FARIAS, I.P.; CROSSA, M.; SAMPAIO, I.; PORTO, J.I.R. AND MEYER, A. (2005a). Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation, *Anim. Conserv.* 8, pp. 297–308.

HRBEK, T.; TAPHORN, D.C.; AND THOMERSON, J.E. (2005b). Molecular phylogeny of *Austrofundulus* Myers (Cyprinodontiformes: Rivulidae), with revision of the genus and the description of four new species, *Zootaxa* 825, pp. 1–39.

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

HUBERT, N.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ, J.; GARCIA-DAVILA, C.; PAUGY, D.; RENNO, J.F. (2007). Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus* : implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 16: 2115-2136.

IRWIN, D.M.; KOCHER, T.D. AND WILSON, A.C. (1991). Evolution of cytochrome *b* gene in mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 2: 13–34.

KIMURA, M. AND CROW, F. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 49: 725-738.

KINGMAN, J.F.C. (1982). The coalescent. *Stochastic Processes Applied*, 13: 235–248.

KIRCHMAN, J.J.; WHITTINGHAM, L.A. AND SHELDON, F.H. (2000). Relationships among cave swallow populations (*Petrochelidon fulva*) determined by comparisons of microsatellite and cytochrome *b* data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 14: 107–121

KLEIN, J.; KLEIN, D.; FIGUEIROA, F.; SATO, A. AND O'HUIGIN, C. (1997). Major Histocompatibility Complex genes in the study of fish phylogeny. *In*: Kocher, T.D. e Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press.

KOCHER, T.D. E STEPIEN, C.A. (1997). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press.

KOCHER, T.D., THOMAS, W.K., MEYER, A., EDWARDS, S.V., PAABO, S., VILLABLANCA, F.X. AND WILSON, A.C., (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, pp. 6196–6200

KUBITZA, F. (1998). Produção Intensiva de Surubins no Projeto Pacu Ltda e Agropeixe Ltda. *Anais do Aqüicultura Brasil'98*. Volume I. p. 393-405. Recife, 2 a 6 de novembro.

KUMAZAWA, Y. E NISHIDA, M. (2000). Molecular phylogeny of Osteoglossoids: a new model for Gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana. *Molecular Biology and Evolution*, 17: 1869–1878.

LAIKRE, L.; PALM, S. AND RYMAN, N. (2005). Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio* 34 (2): 111- 119.

LAMB, T., AND LYDEARD. C. (1994). A molecular phylogeny of the gopher tortoises, with comments on familial relationships within the Testudinoidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 3:283–291.

LAVOUÉ, S. AND SULLIVAN, J.P. (2004). Simultaneous analysis of five molecular markers provides a well-supported phylogenetic hypothesis for the living bony-tongue fishes (Osteoglossomorpha: Teleostei). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 171–185.

LAVOUE, S., SULLIVAN, J. P. AND HOPKINS, C. D. (2003). Phylogenetic utility of the first two introns of the S7 ribosomal protein gene in African electric fishes

(Mormyridae: Teleostei) and congruence with other molecular markers. *Biological Journal of the Linnean Society* 78, 273–292.

LESSA, E.P. (1992). Rapid surveying of DNA sequence variation in natural populations. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 323–330.

LI, C.; ORTÍ, G.; ZHANG, G. AND LU, G. (2007). A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 44-54.

LINS, L.V.; MACHADO, A.B.M.; COSTA, C.N.R. AND HERMANN, G. (1997). Roteiro metodológico para elaboração de listas de espécies ameaçadas de extinção: contendo a lista oficial de fauna ameaçada de Minas Gerais. Belo Horizonte Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas. 55 p.

LITT, M. AND LUTY, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetic*, 44: 398-401.

LÓPEZ, J.A.; CHEN, W.-J. AND ORTÍ, G. (2004). Esociform phylogeny. *Copeia*, 449–464.

LOPEZ, P.; CASANE, D. AND PHILIPPE, H. (2002). Heterotachy, an important process of protein evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 1-7.

LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H.; HONEYCUTT, R.L. AND 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: 227-244.

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

LOVEJOY, N.R. AND COLLETTE, B.B. (2001). Phylogenetic relationships of new world needlefishes (Teleostei: Belontiidae) and the biogeography of transitions between marine and freshwater habitats. *Copeia*, 324–338.

LUNDBERG, J.G. (1993). African-South American freshwater fish clades and continental drift: problems with a paradigm. In: Goldblatt, P. (Ed.). *Biological Relationships Between Africa and South America*. New Haven: Yale University Press. pp. 156–199.

LUNDBERG, J.G. (1997). Freshwater Fishes and their Paleobiotic Implications. In: Kay, R.F.; Madden, R.H.; Cifelli, R.L.; Flynn, J.J. (Eds.). *Vertebrate Paleontology in the Neotropics, The Miocene Fauna of La Venta, Colombia*. Washington: Smithsonian Inst. Press.

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. 49-68.

LUNDBERG, J.G. AND LITTMANN, M.W (2003). Family Pimelodidae (Long-whiskered catfish). In *CheckList of the Freshwater Fishes of South and Central America*. Edipucrs, Porto Alegre, pp 432-455.

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*. Museu de Ciências e Tecnologia, PUCRS, Porto Alegre, Brazil (Chapter 1).

LYDEARD, C. AND ROE, K.J. (1997). The phylogenetic utility of the mitochondrial cytochrome *b* gene for inferring relationships among Actinopterygian fishes. In: Kocher, T.D. e Stepien, C.A. (Eds.). *Molecular systematics of fish*. New York: Academic Press. pp. 285-303.



MACHADO, A. B. M.; FONSECA, G. A. B. DA; MACHADO, R. B.; AGUIAR, L. M. DE S. AND LINS, L. V. (1998). Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.

MARTIN, A.P. AND BERMINGHAM, E. (1998). Systematics and evolution of lower Central American cichlids inferred from analysis of cytochrome *b* gene sequence. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 9: 192-203.

MARTÍNEZ-ORTEGA, M.M.; DELGADO, L.; ALBACH, D.C.; ELENA-ROSSELLO, J.A.; RICO, E. (2004). Species boundaries and phylogeographic patterns in cryptic taxa inferred from AFLP markers: *Veronica* subgen. *Pentasepalae* (Scrophulariaceae) in the western Mediterranean. *Systematic Botany*, 29, 965–986.

MASCARENHAS-ALVES, C.B, L.; MARTINS DA SILVA G. AND LIMA-GODINHO A. (2007). Radiotelemetry of a female jaú, *Zungaro jahu* (Ihering, 1898) (Siluriformes:Pimelodidae), passed upstream of Funil Dam, rio Grande, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 5(2):229-232.

MATEUS, L. A. F. AND PENHA, J. M. F. (2007). Dinâmica Populacional de Quatro Espécies de Grandes Bagres na Bacia do Rio Cuiabá, Pantanal norte, Brasil (Siluriformes, Pimelididae) *Revista Brasileira de Zoologia* 24 (1): 87-98, março.

McCAULEY, D.E. (1995). The use of chloroplast DNA polymorphism in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 10: 198–202.

MELDAU DE CAMPOS, C. (2001). Viabilidade sócio-econômica e ambiental da piscicultura em tanque-rede no Pantanal de Matogrosso do Sul. Universidade de Brasília. Centro de Desenvolvimento Sustentável. Dissertação de Mestrado. Brasília, p. 85

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

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

MEYER, A. AND LYDEARD, C. (1993). The evolution of copulatory organs, internal fertilization, placentae and viviparity in killifishes (Cyprinodontiformes) inferred from a DNA phylogeny of the tyrosine kinase gene x-src. *Proceedings: Biological Sciences*, 254: 153-162.

MEYER, A. AND WILSON, C. (1990). Origin of tetrapods inferred from their mitochondrial DNA affiliation to lungfish. *Journal of Molecular Evolution*, 31: 359–364.

MIKICH, S. B. AND BERNILS, R. S. (Eds) (2004). Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Instituto Ambiental do Paraná, Curitiba.

MOESER, A.A. AND BERMINGHAM E. (2005). Isolation and characterization of eight microsatellite loci for the Neotropical freshwater catfish *Pimelodella chagresi* (Teleostei: Pimelodidae) *Molecular Ecology Notes* 5, 363–365

MOHINDRA, V.; SINGH, R.K.; PUNIA, P.; SHANKAR GUPTA, H.; LAL, K. K.; MISHRA, A.; KUMAR, R.; SHAH, R. and LAKRA W. S. (2008). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in yellowtail catfish, *Pangasius pangasius* (Hamilton, 1822). *Molecular Ecology Resources* 8, 864–866

MOJICA, J.I.; C. CASTELLANOS; S. USMA Y R. ALVAREZ. (Eds). (2002). Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia. La serie de Libros Rojos de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales Universidad Nacional de Colombia, Ministerio del Medio Ambiente, Bogotá, Colombia.

MONTOYA-BURGOS, J.I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12: 1855–1867.

MOORE, W.S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.

MOORE, W.S. AND DEFILIPPIS, V.R. (1997). The window of taxonomic resolution for avian phylogenies based on mitochondrial cytochrome b DNA sequences. In *Avian molecular evolution and systematics* (ed. D.P. Mindell), pp. 83-119. Academic Press.

MOREIRA, H.L.M. (1999). Análise da estrutura de populações e diversidade genética de estoques de reprodutores de tilápia do Nilo (*O. niloticus*) estimadas por microsatélite. Porto Alegre. Tese de doutorado. U. Federal do Rio Rio Grande do Sul.

MORITZ, C.; LAVERY, S.; SLADE, R. (1995). Using Allele Frequency and Phylogeny to Define Units for Conservation and Management. In: Nielsen, J. & Powers, D. (Eds.). *Evolution and the Aquatic Ecosystem, Defining Unique Units in Population Conservation*. Maryland: American Fisheries Society. pp 249-262.

MOYER, G.R.; BURR, B.M.; KRAJEWSKI, C. (2004). Phylogenetic relationships of thorny catfishes (Siluriformes: Doradidae) inferred from molecular and morphological data *Zoological Journal of the Linnean Society*, 140: 551–575.

MUSILOVÁ, Z.; RÍCAN, O.; JANKO, K. AND NOVÁK, J. (2008). Molecular phylogeny and biogeography of the Neotropical cichlid fish tribe Cichlasomatini (Teleostei: Cichlidae: Cichlasomatinae). *Mol Phylogenet Evol.* Feb;46(2):659-72.

NARUM, S. R.; BOE, S.; MORAN, P. AND POWELL, M. (2006). Small-scale genetic structure and variation in steelhead of the Grande Ronde River, Oregon, USA. *Transactions of American Fisheries Society*, 135: 979-986.

NAYLOR, G.J.P.; RYBURN, J.A.; FEDRIGO, O. AND LOPEZ, J.A., (2005). Phylogenetic relationships among the major lineages of modern elasmobranchs. In: Hamlett, W.C. (Ed.). *Reproductive Biology and Phylogeny of Chondrichthyes: Sharks, Batoids and Chimaeras*. Science Publishers, EnWeld, NH, pp. 1–25.

NEI M.AND KUMAR , S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics.* , Oxford University Press, Oxford

NEI, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics.* Columbia University Press,New York.

NEI, M. AND GOJOBORI, T. (1986). Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution*, 3: 418-426.

NICHOLS, R. (2001). Gene trees and species trees are not the same. *Trends in Ecology and Evolution*, 16: 358–364

NIXON, K. ANS CARPENTER, J. 1(993). On outgroups. *Cladistics*, 9: 413–426.

NUNN, G.B. AND STANLEY, S.E. (1998). Body size effects and rates of cytochrome b evolution in tube-nosed seabirds. *Mol. Biol. Evol.* 15: 1360-1371.

O’CONNELL, M. AND WRIGHT, J. M. (1997). Microsatellite DNA in fishes. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 7: 331-363.

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

ORTÍ, G.; HARE, M.P. AND AVISE, J.C. (1997). Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP. *Molecular Ecology*, 6: 575-580.

PAIVA, A.L.B. AND KALAPOTHAKIS, E. (2008). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pimelodus maculatus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Molecular Ecology Resources* 8, 1078–1080

PALUMBI, S., CIPRIANO, F. AND HARE, M. P. (2001). Predicting nuclear gene coalescence from mitochondrial data: the three-times rule. *Evolution* 55, 859–868.

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

PALUMBI, S.R. (1995). Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: Hillis, D. & Moritz, C. (Eds.). *Molecular Systematics*. Sunderland: Sinauer. pp. 205– 247.

PALUMBI, S.R. AND BAKER, C.S. (1994). Contrasting population structure from nuclear introns sequences and mtDNA of humpback whales. *Molecular Biology and Evolution*, 11: 426-435.

PARKER, A. (1997). Combining molecular and morphological data in fish systematics: examples from the Cyprinodontiformes. In: Kocher, T.D. e Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press.

PETIT, R. J.; EL MOUSADIK, A. AND PONS, O. (1998). Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, 12: 844-855.

PHILLIPS, R.B. AND OAKLEY, T.H. (1997). Phylogenetic relationship among the salmonidae based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. In: Kocher, T.D. e Stepien, C.A. (Eds). *Molecular Systematics of Fishes*. San Diego: Academic Press.

POSADA, D. (2001). Unveiling the molecular clock in the presence of recombination. *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1976-1978.

PRETTI, V. Q.; CALCAGNOTTO, D.; TOLEDO-PIZA, M.; DE ALMEIDA-TOLEDO, L. F. (2009). Phylogeny of the Neotropical genus *Acestrorhynchus* (Ostariophysi: Characiformes) based on nuclear and mitochondrial gene sequences and morphology: A total evidence approach. *Mol. Phylogenet. Evol.* doi:10.1016/j.ympev.2008.12.025

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotypic data. *Genetic*, 155: 945-959.

QUENOUILLE, B.; BERMINGHAM, E. AND PLANES, S. (2004). Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 66–88.

RAY, J. M.; LANG, N. J.; WOOD R. M.; AND MAYDEN. R. L. (2008). History repeated: recent and historical mitochondrial introgression between the current darter *Etheostoma uniporum* and rainbow darter *Etheostoma caeruleum* (Teleostei: Percidae). *Journal of Fish Biology* Volume 72, p. 418 – 434.

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

REIS, R. E.; KULLANDER, S.O. AND FERRARIS, C. (2003). CheckList of the Freshwater of South and Central América (CLOFFSCA). Edipucrs, Porto Alegre.

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

RESENDE, E.K. (2003). Migratory Fishes Of The Paraguay–Paraná Basin Excluding The Upper Paraná Basin. Em *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.; PEREIRA, L H. G.; FORESTI F. AND OLIVEIRA, C. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 5, 463–465.

- REVALDAVES, E.; PEREIRA, L H. G.; FORESTI F. AND OLIVEIRA, C. (2005). Isolation and characterization of microsatellite loci in *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 5, 463–465.
- RICE, W. R. (1989). Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223- 225.
- RICO, C., RICO, I., AND HEWITT, G. (1996). 470 millions years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc R Soc Lond B* 263:549–557.
- ROGERS, A.R.; HERPENDING, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*. N. 9, p. 552-569.
- ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J.C.; MESSEGUER, X. AND ROZAS, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19: 2496-7.
- ROZEN, S. AND SKALETSKY, H. J. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- RUZZANTE, D. E.; WALDE, S. J.; CUSSAC, V. E.; DALEBOUT, M. L.; SIEBERT, J.; ORTUBAY, S. AND HABIT, E. (2006). Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology* 15, 2949–2968.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R.; HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. (1988). Primer-Directed Enzymatic Amplification Sof DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- SALGUEIRO, P.; CARVALHO, G.; COLLARES-PEREIRA, M. J.; COELHO, M. M. (2003). Microsatellite analysis of genetic population structure of the endangered

cyprinid *Anaecypris hispânica* in Portugal: implications for conservation. *Biological Conservation*, 109: 47-56.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F AND MANIATIS, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold-Spring Harbor Laboratory Press. New York.

SANCHES, A. (2007). Estrutura genética populacional de *Brycon hilarii* (Characidae) da sub-bacia do Rio Miranda, e seu significado para programas de conservação. Tese Doutorado. Universidade Federal de São Carlos.

SANCHES, A. AND GALETTI, P. M. (2006). Microsatellites loci isolated in the freshwater fish *Brycon hilarii*. *Molecular Ecology Notes*, 6: 1045-1046.

SANGER, F.; NICKLEN, S. AND COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 74: 5463-5467.

SANGER, F.; NICKLEN, S. AND COULSON, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.* 74: 5463-5467.

SCHAEFER, S.A. (1998). Conflict and resolution: impact of new taxa on phylogenetic studies of the neotropical Cascudinhos (Siluroidei: Loricariidae). *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. pp. 363–374.

SCHEET, P. AND M. STEPHENS (2006). A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: Applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. *American Journal of Human Genetics* 78, 629–644.

SCHIERUP, M.H. AND HEIN, J. (2000). Consequences of recombination on traditional phylogenetic analysis. *Genetics*, 156: 879–891.



SCHLÖTTERER C, AMOS B, TAUTZ D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature* 354:63-65.

SCHLOTTERER, C. AND TAUTZ, D. (1992). Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 20: 211-215.

SCHNEIDER, S., AND 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* 152:1079-1089.

SCHUELKE, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.

SILVA L. G. (2005). La cuenca del río Orinoco: visión hidrográfica y balance hídrico. *Revista Geográfica Venezolana*.

SILVA, J. DOS S.V. DA; ABDON, M. DE M. (1998). Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas subregiões. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. V. 33 n.esp., out, p 1703 – 1711.

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: 651-701.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E. AND ORTI, G. (2001). Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*) in major South American rivers, *Mol. Ecol.* 10, pp. 407–417.

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

SMITH, B. J.; SCHNEIDER, C. J. AND HOLDER, K. (2001). Refugial isolation versus ecological gradients. *Genetica* 112–113, 383–398.

SPINKS, P. Q. AND SHAFFER, H. B. (2005). Range-wide molecular analysis of the western pond turtle (*Emys marmorata*): cryptic variation, isolation by distance, and their conservation implications. *Molecular Ecology* 14, 2057–2064.

STOCK, D.W. AND WHITT, G.S. (1992). Evidence from 18S ribosomal RNA sequences that lampreys and hagfishes form a natural group. *Science*, 257: 787-789.

STORZ, J. F., RAMAKRISHNAN, U. AND ALBERTS, S. C. (2001). Determinants of effective population size for loci with different modes of inheritance. *Journal of Heredity* 92, 497–502.

STRANGE, R.M. AND BURR, B.M. (1997). Intraspecific phylogeography of north American highland fishes: A test of the Pleistocene vicariance hypothesis. *Evolution*, 51: 885–897.

STRECKER, U. (2003). Polymorphic microsatellites isolated from the cave fish *Astyanax fasciatus*. *Mol Ecol Notes* 3:150-151.

SUGANUMA, C.H. (2004). Caracterização de estoques de tilápia de Nilo (*Oreochromis niloticus*) através do uso de microssatélites. Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista, Centro de Aqüicultura - CAUNESP. p. 72.

SULLIVAN, J.P.; LAVOUÉ, S. AND HOPKINS, C.D. (2000). Molecular systematics of the African electric fishes (Mormyroidea: Teleostei) and a model for the evolution of their electric organs. *Journal of Experimental Biology*, 203: 665–683.

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

SWENSON, N.G. AND HOWARD, D.J. (2005). Clustering of contact zones hybrid zones and phylogeographic breaks in North America. *Am. Nat.* 166: 581–591.

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

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

TAUTZ, D. (1989). Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6364-6471.

TAUTZ, D. AND RENZ, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucl. Acids Res.*,12: 4126-4138.

TEMPLETON, A.R. (1998). Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; AND GIBSON, 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 Acids Res.* 1994 November 11; 22(22): 4673–4680.

TORRICO, J.P.; HUBERT, N.; DESMARAIS, E.; DUPONCHELLE, F.; NUÑEZ RODRIGUEZ, J.; MONTOYA-BURGOS, J.; GARCIA DAVILA, C.; CARVAJAL-VALLEJOS, F.M.; GRAJALES, A.A.; BONHOMME, F. AND RENNO, JF. (2008). Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma*: Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* (2008), doi: 10.1016/j.ympev.2008.11.019

TRIANAFYLLIDIS, A.; ABATZOPOULOS T.J.; LEONARDOS J. AND GUYOMARD, R. (2002). Microsatellite analysis of the genetic population structure of

native and translocated Aristotle's catfish (*Silurus aristotelis*) Aquat. Living Resour. 15 351–359

TURNER, T.F.; MCPHEE, M.V.; CAMPBELL, P. AND WINEMILLER, K.O. (2004). Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America, J. Fish Biol. 64, pp. 186–201.

USMANI, S.; TAN, S.G.; SIRAJ S.S. AND YUSOFF, K. (2003). Population structure of the Southeast Asian river catfish *Mystus nemurus*. International Society for Animal Genetics, Animal Genetics, 34, 462–464

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON W.; DEREK P .; WILLS M., AND SHIPLEY, P. (2004). MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes 4, 535–538

VARI R.P., AND MALABARBA, L.R. (1998). Neotropical Ichthyology: an overview. In: Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. Eds. Malabarta, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S. Edipucrs, Porto Alegre, p. 1-11.

VENTER, J.C.; ADAMS, D.M.; MYERS, E.W. et al. (2001). The sequence of the human genome. Science, 291: 1304-1350.

VERGARA, J.; AZPELICUETA, M. M. AND GARCIA, G. (2008). Phylogeography of the Neotropical catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. Neotropical Ichthyology, 6(1):75-85

WAKELEY, J. (1998). Segregating sites in Wright's island model. Theoretical Population Biology, 53: 166-174.

WAKELEY, J. AND HEY, J. (1997). Estimating ancestral population parameters. Genetics, 145: 847-855.

WANG, R.L.; STEC, A.; HEY, J.; LUKENS, L. AND; DOEBLEY, J. (1999). The limits of selection during maize domestication. *Nature*, 398: 236-239.

WASKO, A. P. AND GALETTI, P. M. (2002). RAPD analysis in the Neotropical fish *Brycon lundii*: genetic diversity and its implications for the conservation of the species. *Hydrobiologia*, 474 (1-3):131-137.

WEIR, B. S. AND COCKERHAM, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

WILLIS, SC.; NUNES, MS.; MONTAÑA, CG.; FARIAS, IP.; LOVEJOY, NR. (2007). Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44: 291-307.

WINEMILLER, K.O. (2005). Live History, Population Regulation, and implication for fisheries management. *Canada Journal Fisheries Aquatic Science* 62: 872-885.

WIRTH, T. AND BERNATCHEZ, L. (2001). Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature*, 409 (22): 1037-1040.

WRIGHT, S. (1978). Variability within and among natural populations. v.4. The University of Chicago Press.

www. Geocities.com/RainForest:/1820/inex.html. 17-08-07. Os pantanais matogrossenses.

XU, Z.; PRIMAVERA, J. H.; DE LA PENA, L. D.; PETIT, P.; BELAK, J.; ALCIVAR-WARREN, A. (2001). Genetic diversity of wild and cultured Black Tiger Shrimp *Penaeus monodon* in the Philippines using microsatellites. *Aquaculture*, 199: 13-40.

YAMAMOTO, S.; MORITA, K.; KOIZUME, I.; MAEKAWA, K. (2004) Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conservation Genetics*, 5: 529-538.

YAZBECK, G.M. AND KALAPOTHAKIS, E. (2007). Isolation and characterization of microsatellite DNA in the piracema fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes) Genet. Mol. Res. 6 (4): 1026-1034.

YUE, G.H.; KOVACS, B. AND ORBAN, L. (2003). Microsatellites from *Clarias batrachus* and their polymorphism in seven additional catfish species. Molecular Ecology Notes 3, 465–468.

ZANE, L.; BARGELLONI, L. AND PATARNELLO, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1-16.

ZARDOYA, R. AND DOADRIO, I. (1999). Molecular evidence on the evolutionary and biogeographical patterns of European cyprinids. *Journal of Molecular Evolution*, 49: 227–237.

ZHANG, D. AND HEWITT, G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563-584.