

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA DE AMBIENTES

AQUÁTICOS CONTINENTAIS

**Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú
(*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das
Bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai**

Talge Aiex Boni

Maringá - PR

2008

Talge Aiex Boni

**Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú
(*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das
Bacias Amazônica e do Paraná -Paraguai**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli

Maringá - PR

2008

"Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)"
(Biblioteca Setorial - UEM. Nupélia, Maringá, PR, Brasil)

B715c Boni, Talge Aiex, 1980-
Comparação molecular de populações naturais de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das bacias amazônica e do Paraná-Paraguai / Talge Aiex Boni. -- Maringá, 2008.
59 f. : il.

Tese (doutorado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais) - Universidade Estadual de Maringá, Dep. de Biologia, 2008.
Orientador: Prof. Dr. Alberto José Prioli.

1. *Zungaro* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) "jaú" - Filogenia - Brasil - Bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai. I. Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Biologia. Programa de Pós-Graduação em "Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais".

CDD 22. ed. -597.491380981
NBR/CIP - 12899 AACR/2

Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes,
Pimelodidae) das Bacias Amazônica e do Paraná -Paraguai

Talge Aiex Boni

Data da defesa: 25 de janeiro de 2008, no Anfiteatro do Nupélia, bloco G-90, *campus* da
Universidade Estadual de Maringá

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alberto José Prioli – Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof. Dr. Vladimir Pavan Margarido – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

Prof. Dra. Adriana Fiorini – Centro Universitário de Maringá

Prof. Dr. Horácio Ferreira Júlio Júnior - Universidade Estadual de Maringá

Profa. Dra. Carla Simone Pavanelli - Universidade Estadual de Maringá

COM AMOR, DEDICO...

À minha família, em especial à minha mãe,
Talge Galante Aiex Boni, pelo amor e carinho
dispensados em todos estes anos, e por não ter
medido esforços para me dar tudo o que
precisei. Obrigada, pela educação, apoio e
confiança que sempre depositou em mim.

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Ao meu Orientador, Professor Dr. Alberto José Prioli, pela orientação e confiança que depositou em mim nesses oito anos em que convivemos, pela amizade e por todo o ensinamento.

À minha também orientadora, Professora Dra. Sônia Maria A. P. Prioli, pela amizade e apoio em todos esses anos.

À minha mãe, Talge, pela educação, apoio e confiança que sempre depositou em mim.

Aos meus irmãos, João Marcelo e Fernanda, por todos esses anos de cumplicidade e de ajuda mútua.

Ao meu eterno namorado André Andrian Padial, por ter trazido tanta felicidade à minha vida, pelo grande apoio e amor que me deu durante esse período.

Aos amigos do laboratório de genética, todos foram muito importantes nesse trabalho nos períodos de seqüenciamento e estudo, além das nossas conversas. Obrigada pela amizade e consideração.

Aos amigos Léia Carolina Lúcio, Priscilla Carvalho, Iraúza Arroiteia Fonseca e Thiago C. Maniglia, por estarem sempre ao meu lado. Obrigada pelos bons momentos e principalmente pela força para erguer a cabeça nos momentos difíceis e seguir adiante. São pessoas que ficaram marcadas para sempre na minha vida.

Ao Professor e Pesquisador Carlos Sérgio Agostinho *da Universidade Federal de Tocantins* pelas amostras de jaú coletadas no rio Tocantins.

Ao biólogo do Nupelia Dr. Edson K. Okada e sua equipe, pela coleta no rio Manso.

À Professora Dr. Izabel de Fátima Andrian, pelo carinho e colaboração em vários momentos, entre eles nas correções desse texto.

À todos meus amigos e colegas de curso.

À toda a minha família pelo incentivo e torcida,

Aos funcionários do DBC e do Nupelia, especialmente ao Donizete e à Maria José pelo auxílio na parte técnica.

À Professora Dra. Aparecida Fernandes e a Pós-graduanda Juliana Bravo pela ajuda no seqüenciamento.

Aos professores do curso de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais, pelos ensinamentos recebidos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais (PEA) pela oportunidade.

À Universidade Estadual de Maringá (UEM).

À CAPES, pela bolsa de estudo concedida durante o doutorado.

E enfim, a todos que contribuíram para mais esta jornada da minha vida muito obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO GERAL.....	01
ABSTRACT	02
INTRODUÇÃO GERAL	03
Capítulo 1 - Comparação Molecular de Jaú (<i>Zungaro</i>) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das Bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai.	
RESUMO	12
ABSTRACT	13
INTRODUÇÃO.....	14
METODOLOGIA DETALHADA.....	16
Material Biológico e Locais de Coleta	16
Extração de DNA.....	17
Região controle (<i>D-loop</i>) e ATPase6 do DNA mitocondrial	18
Seqüenciamento	18
Seqüências do <i>GenBank</i>	19
RESULTADOS	22
DISCUSSÃO.....	30
AGRADECIMENTOS.....	33
REFERÊNCIAS	34
Capítulo 2 - Diversidade Nucleotídica Mitocondrial de Populações Naturais de <i>Zungaro jahu</i> (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae).	
RESUMO	39
ABSTRACT	40
INTRODUÇÃO.....	41
METODOLOGIA DETALHADA.....	43
Material Biológico e Locais de Coleta	43
Extração de DNA.....	44
Região controle (<i>D-loop</i>) e ATPase6 do DNA mitocondrial	44
Seqüenciamento	45
Seqüências do <i>GenBank</i>	46

RESULTADOS	47
DISCUSSÃO.....	52
AGRADECIMENTOS.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

Essa tese está formatada segundo as normas da revista Genetics and
Molecular Research.

Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das Bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai
Molecular Comparison of “Jaú” (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) Natural Populations from Amazonic and Paraná-Paraguay River Basins.

Resumo

O peixe conhecido popularmente por “jaú” pertence ao gênero *Zungaro*, tem grande importância pesqueira e econômica. Além de ser um dos maiores peixes migradores do Brasil, tem sua distribuição ao longo das bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai. Este sempre foi um peixe encontrado com relativa abundância na bacia do Paraná-Paraguai, mas após a construção de uma série de barragens no rio Paraná tem-se registrado uma diminuição do tamanho efetivo dessa população. Neste trabalho foram caracterizadas molecularmente (variabilidade e estruturação genética), através do genoma mitocondrial, populações de “jaú” das bacias do rio Paraná-Paraguai e Amazônica. As análises das seqüências mitocondriais das regiões *D-loop* e do gene da *ATPase 6* evidenciaram uma diferenciação genética, entre os indivíduos das duas bacias, em níveis equivalentes ao registrado na literatura entre muitas espécies próximas entre si. Portanto, é inevitável concluir que a população de *Zungaro* da bacia do Paraná-Paraguai não pertence à espécie de *Zungaro zungaro* da bacia Amazônica, mas sim à espécie *Z. jahu*. Quando feitas as análises moleculares entre as subpopulações da bacia do Paraná-Paraguai, a AMOVA e o F_{ST} detectaram a identidade dessas populações, que não estão diferenciadas geneticamente, ou seja, apresentam uma variabilidade genética extremamente baixa. Esse fato deve estar relacionado ou ao efeito fundador ou ao efeito *bottleneck*. Como *Z. jahu* é endêmico da bacia Paraná-Paraguai, esses resultados indicam que com a extinção local no rio Paraná (causada pela drástica diminuição dos estoques), só restarão indivíduos dessa espécie no rio Paraguai, com grandes problemas de sobrevivência causados pela falta de diversidade genética.

Palavras-chave: *Zungaro*; *D-loop*; *ATPase 6*; diferenciação molecular; mitocondrial; bacia do Paraná-Paraguai; bacia Amazônica.

Comparação Molecular de Populações Naturais de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das Bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai
Molecular Comparison of “Jaú” (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) Natural Populations from Amazonic and Paraná-Paraguay River Basins.

Abstract

Species of the *Zungaro* genus, popularly known as “jaú”, have great economical importance on the fishing industry. They are among the largest migratory fishes in Brazil, occurring throughout the Amazon and Paraná-Paraguay basins. They have usually been relatively abundant in the Paraná-Paraguay River Basin, but after the enclosure of several dams, a considerable decline on population size was recorded. In this study, *Zungaro* populations of Paraná-Paraguay River and Amazonic basins were molecularly described (variability and genetic structuration) through mitochondrial genome. The analyses of mitochondrial sequences of *D-loop* and *ATPase 6* gene regions evidenced a genetical difference corresponding to intimately related species, as recorded in literature. Therefore, it supports the conclusion that the *Zungaro* population of the Paraná-Paraguay River basin (*Zungaro jahu*) does not belong to the same species found in the Amazonic basin (*Zungaro zungaro*). When molecular analyses of sub-populations of the Paraná-Paraguay basin were made, AMOVA and F_{ST} detected the identicalness of both subpopulations, demonstrating that they are not genetically different, i.e., present a very low genetical variability. This fact may be related to the founder or bottleneck effects. As *Z. jahu* is an endemic species of the Paraná-Paraguay basin, these results indicate that should this species disappear from Paraná River, due to reservoir building, remaining individuals will be located only in Paraguay River, subject to many survival hardships caused by low genetical diversity.

Key-words: *Zungaro*; D-loop; *ATPase 6*; molecularly differentiation; mitochondrial; Paraná-Paraguay River Basin; Amazonic Basin.

Introdução

A caracterização genética de comunidades aquáticas é fundamental para revelar a história evolutiva das populações. Isso é de relevante importância na determinação de áreas prioritárias à conservação, visto que a diversidade filogenética consiste em uma forma profunda de representar a biodiversidade (Sechrest et al., 2002). Hoje estima-se que 20% da ictiofauna continental do mundo esteja extinta ou ameaçada de extinção. Segundo o Ministério do Meio Ambiente (2007) 134 espécies de peixes de água doce estão em risco de extinção no Brasil.

Em geral, dos fatores que levaram a redução ou desaparecimento de muitas espécies de peixes, podem-se destacar a poluição e eutrofização, o assoreamento, a construção de barragens e controle de cheias, a sobrepesca e a introdução de espécies (Vrijenhoek, 1998, Agostinho et al., 2005, Hatanaka et al., 2006). Os represamentos são considerados a maior fonte pontual de interferência do homem nos regimes hídricos naturais (Agostinho et al., 1992). Modificações na variabilidade ou estrutura genética das populações de peixes podem ser causadas pela construção de reservatórios para geração de energia elétrica. Isso pode ocorrer pela eliminação de barreiras geográficas devido ao alagamento de áreas naturais (por exemplo, cachoeiras), que modifica o padrão de dispersão de várias espécies de peixes.

Adicionalmente, a formação de uma nova barreira (por exemplo, a barragem de uma represa) impede a migração de peixes, o que pode levar à extinção espécies menos aptas a suportar esse tipo de alteração. Assim, a construção de barragens exerce impacto direto principalmente sobre espécies migradoras, que necessitam de grandes deslocamentos para alimentarem-se e se reproduzirem.

A série de barragens construídas ao longo da bacia do rio Paraná contribuiu para a redução do volume de captura de várias espécies migradoras, substituindo-as por outras sedentárias e menores. Entre estas podem ser citadas *Zungaro spp* (“jaú”), *Salminus maxillosus* (Dourado), *Brycon orbignyanus* (Piracanjuba), *Pseudoplatystoma corruscans* (Pintado) e outras (Agostinho et al., 2003). Atualmente, estas são capturadas esporadicamente nos rios Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema. Algumas delas já foram

consideradas abundantes e eram espécies de grande importância pesqueira, principalmente a artesanal.

Uma espécie intensamente afetada pelos represamentos ao longo do rio Paraná é um dos maiores bagres presentes nesse rio e na bacia Amazônica. Esse peixe, popularmente conhecido como “jaú”, gênero *Zungaro*, pertence à ordem dos Siluriformes e à família Pimelodidae. São peixes de couro que chegam a pesar 150 kg e podem ter até, aproximadamente, 144 centímetros de comprimento (Agostinho et al., 2003). São piscívoros, de hábito tipicamente migratório, fertilização externa, noturnos e costumam viver em poços profundos de ambientes lóticos (Alves, 2007). Os juvenis são, normalmente, capturados nos reservatórios. Esses peixes foram caracterizados morfologicamente, segundo Lundberg e Littmann (2003), como duas espécies, *Z. jahu* (Ihering, 1898) distribuído pela bacia do rio Paraná-Paraguai, e *Z. zungaro* (Humboldt, 1821), encontrados nas bacia do rio Amazonas e Orinoco. Entretanto, segundo Graça e Pavanelli (2007) todas as populações dessas bacias pertencem à espécie *Z. zungaro*.

As informações sobre a produção da pesca profissional no reservatório de Itaipu revelam a diminuição da pesca de “jaú” desde o início da década de 90, provavelmente pela pesca de indivíduos de tamanho ainda muito reduzido, ou sobre-exploração (Agostinho et al., 2005, Okada et al., 2005). A espécie Amazônica, *Z. zungaro*, está listada como sobre-explorada ou em perigo de sobre-exploração no Brasil (Ministério do Meio Ambiente, 2004). A inclusão da espécie *Z. zungaro* nessa lista ao invés de *Z. jahu*, foi um erro que precisa ser corrigido urgentemente. *Zungaro jahu* está listado como vulnerável nos estados brasileiros de Minas Gerais e Paraná (Mikich e Bérnils, 2004).

Além do frágil *status* de conservação do “jaú”, informações sobre a biologia da espécie são escassas, e em sua maioria ligadas à morfologia, o modo de nutrição e aos parasitas da espécie. Além disso, muitas informações quanto a sua característica migratória são ainda desconhecidas (Agostinho et al., 2003).

Uma possível decorrência da diminuição do tamanho efetivo da população é a perda parcial da variabilidade genética. Populações com base genética estreita tendem a apresentar maior suscetibilidade aos distúrbios ambientais. Assim, com a fragmentação da área de ocupação e com o declínio

populacional, a população de “jaú” do rio Paraná corre o risco de extinção local a médio prazo.

Por cerca de 80 anos a genética de população tem investigado como os atributos da paisagem têm influenciado a variação genética dentro e entre as populações. Esta análise de variabilidade impulsionou a genética de populações e a genética do processo evolutivo. O polimorfismo do DNA, associado aos estudos ecológicos e morfológicos, já tem sido demonstrado como capaz de contribuir fortemente no reconhecimento da diversidade genético-ecológica e na genética do processo evolutivo de espécies e sub-espécies.

A biologia molecular desenvolveu-se de maneira expressiva após a descoberta da estrutura do DNA, em 1953 por Watson e Crick. Desde então, diversas técnicas dessa ciência surgiram possibilitando a detecção de polimorfismo em nível de DNA. As ferramentas básicas para estudos com variabilidade genética são os marcadores moleculares. Esses são seqüências de bases, que podem ou não fazer parte de um gene, tem localização única no genoma e suas variações podem ser rastreadas em diferentes grupos.

Uma das mais marcantes contribuições da biologia molecular foi o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) desenvolvida por Mullis em 1983 (Mullis, 1990). Esta técnica baseia-se na síntese, *in vitro*, de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, com o auxílio da DNA polimerase. A partir da PCR surgiram várias derivações como é o caso do RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), ISSR (*Inter Simple Sequence Repeat*), SSR (*Simple Sequence Repeat*) ou microssatélite e seqüenciamento de fragmentos DNA amplificados.

Esses marcadores permitem a estimativa de parâmetros genético-populacionais para avaliação do fluxo gênico, diferenciação e distância genética entre populações ou espécies. Em uma das modalidades de análise as informações são obtidas pela análise do polimorfismo de comprimento dos fragmentos amplificados, entre populações de mesma espécie ou de espécies próximas. A outra abordagem consiste no seqüenciamento dos fragmentos e a análise do polimorfismo das seqüências nucleotídicas em comparações intra e interespecíficas ou, ainda, na reconstrução filogenética, como é o caso dos marcadores mitocondriais (mtDNA).

Pelo mtDNA ser predominantemente materno, ter uma taxa relativamente rápida de substituição de bases, ter pouca recombinação e ser de fácil isolamento (Avice et al., 1987; Wolstenholme, 1992) várias regiões desse material são utilizadas para estudos genéticos populacionais. O mtDNA provou ser um eficiente marcador para estudos de estrutura de população, variação geográfica e caracterização de espécies (Agnèse et al., 1997; Graves, 1998). A região controle (*D-loop*) e o gene *ATPase 6* estão entre os mais utilizados para estudos populacionais (Meyer, 1994, Machordon e Doadrio, 2001, Perdices e Doadrio, 2001, Sivasundar et al., 2001, Prioli et al., 2002, Avice, 2004). O desenvolvimento de metodologias de análise molecular tem permitido a análise do genoma e das variações existentes, tanto em regiões que codificam produtos gênicos, quanto naquelas cuja função permanece desconhecida (Avice, 2004).

A região conhecida como *D-loop*, ou região controle, tem cerca de 0,8 kb, e é responsável pelo controle da replicação do mtDNA e transcrição do RNA (Avice et al., 1987, Park e Moran, 1994). Uma vez que mutações acumulam-se mais rapidamente na região controle, esta é a melhor para estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações (Meyer, 1994, Faber e Stepien, 1977, Sivasundar et al., 2001, Avice, 2004). Ao contrário, a região codificadora do gene da *ATPase 6* é um pouco mais conservada entre indivíduos de uma mesma espécie.

Fica evidenciada na literatura científica a utilização cada vez maior dos estudos com marcadores moleculares acerca dos grupos taxonômicos e populações de peixes. Segundo Bernatchez e Wilson (1998), os peixes são o grupo mais intensivamente estudado na estrutura genética local e regional. Com o aprimoramento das técnicas de marcadores moleculares, houve uma ampliação de seu uso na ecologia, com outras abordagens além da taxonômica.

Diante da diminuição dos estoques e da ausência quase total de informações sobre *Zungaro*, existe a necessidade de caracterização da diversidade genética das populações naturais. Além do conhecimento básico sobre a espécie, que por si só justificaria o investimento e o esforço necessários, certamente as informações obtidas representarão uma

contribuição importante na formulação e condução de programas consistentes de manejo e preservação da diversidade genética de *Zungaro*. Ainda, divergências em estudos com a espécie têm resultado em constantes mudanças no nome científico da mesma. Assim, a caracterização das populações de “jaú” do rio Paraná e de outras regiões, como as do rio Tocantins, poderá auxiliar na resolução de problemas taxonômicos. Para isso nos capítulos a seguir serão apresentados os resultados dos estudos moleculares do genoma mitocondrial de populações naturais de “jaú” coletados nas bacias do Paraná-Paraguai e do Tocantins.

REFERÊNCIAS

Agnèse, J.F., Adépo-Gourène, B., Abban, E.K. e Fermon, Y., 1997. Genetic differentiations among natural populations of the Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Teleostei, Cichlidae). *Heredity*. 79: 88-96.

Agostinho, A.A., Júlio, Jr H.F., Borguetti, J.R., 1992. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. *UNIMAR*. 14, 89-107.

Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Suzuki, H.I., Júlio, Jr H.F., 2003. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil, in: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust – The World Bank. pp. 19-98.

Agostinho, A.A., Thomaz, S.M, Gomes, L.C., 2005. Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil. *Megadiversidade*. 1:1, 70-78.

Alves, C.B.M., Silva, L.G.M., Godinho, A.L., 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.

Awise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 18, 489-522.

Avise, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, second ed. Sinauer Associates Inc. Publisher, Sunderland, Ma.

Bernatchez, L. & Wilson, C.C., 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Mol. Ecol.* 7:4, 431.

Faber, J.E., Stepien, C.A., 1977. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae, in: Kocher, T.D, Stepien, C.A. (Eds.), *Mol. Syst. Fishes*. Academic Press, New York, pp. 129-143.

Graça, W.J., Pavanelli, C.S., 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. EDUEM - Editora da Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

Graves, J.E., 1998. Molecular insight into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *J. Hered.* 89, 427-437.

Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., Galetti Jr., P.M., 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*. 126, 513-517.

Lundberg, J.G., Littmann, M.W., 2003. Família Pimelodidae, in: Reis, R.E., Kullander S.O., Ferraris, S.J. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 432-446.

Machordom, A., Doadrio, I., 2001. Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proc. Royal Society London*. 268, 1297-1306.

Meyer, A., 1994. DNA technology and phylogeny of fish, in: Beaumont, A.R. (Ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London, pp. 219-249.

Mikich, S. B., Bérnils, R. S., 2004. Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná. CD-ROM.

Ministério do Meio Ambiente., 2004. Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5 (21/maio/2004). Disponível em <http://www.mma.gov.br>.

Ministério do Meio Ambiente., 2007. Biodiversidade e Florestas: Espécies ameaçadas. Disponível em <http://www.mma.gov.br>. Acessado em 10/2007.

Mullis K.B., 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Amer.* 262, 36-42.

Okada, E.K., Agostinho, A.A., Gomes, L.C., 2005. Spatial and temporal gradients in artisanal fisheries of a large Neotropical reservoir, the Itaipu Reservoir, Brazil. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 62, 714-724.

Park, L.K., Moran, P., 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. Fish.* 4, 272-299.

Perdices, A., Doadrio, I., 2001. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 19, 468–478.

Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., Júlio Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M., Prioli, L.M., 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.* 25, 421-430.

Sechrest, W., Brooks, T.M., Fonseca, G.A.B., Konstant, W.R., Mittermeier, R.A., Purvis, A., Rylands, A.B., Gittleman, J.L., 2002. Hotspots and the conservation of evolutionary history. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 4, 2067-2071.

Sivasundar, A., Bermingham, E., Orti, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10, 407-417.

Vrijenhoek, R.C., 1998. Conservation genetics of freshwater fish. *Journal of Fish Biology.* 53, 394-412.

Wolstenholme, D.R., 1992. Animal mitochondrial DNA structure and evolution. In: Wolstenholme, D.R. e Jeon, K.W. (Eds.), *International Review of Cytology/ A survey of Cell Biology – Mitochondrial Genomes*. V.141. Academic Press, New York, pp. 173-216.

CAPÍTULO 1

Comparação Molecular de Jaú (*Zungaro*) (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae) das Bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai

Running Title: Comparação Molecular de *Zungaro*.

Resumo

O peixe conhecido popularmente por “jaú” pertence ao gênero *Zungaro*, tem grande importância pesqueira e econômica, além de ser um dos maiores peixes migradores do Brasil. Tem sua distribuição ao longo das bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai, com severa diminuição dos seus estoques e apresenta problemas taxonômicos. Neste trabalho foram caracterizadas molecularmente populações de “jaú” das bacias, do Paraná-Paraguai e Amazônica, para auxiliar na resolução de problemas taxonômicos, além de gerar informações, que são quase inexistentes, sobre a diversidade genética das populações naturais desse gênero. As análises das seqüências mitocondriais das regiões *D-loop* e do gene da *ATPase 6* evidenciam uma diferenciação genética em níveis equivalentes ao registrado na literatura entre muitas espécies próximas entre si. Portanto, é inevitável concluir que a população de *Zungaro* da bacia do Paraná-Paraguai não pertence à espécie de *Zungaro zungaro* da bacia Amazônica, mas sim à espécie *Z. jahu*.

Palavras-chave: *Zungaro*; *D-loop*; *ATPase 6*; diferenciação molecular; rio Paraná; Tocantins; Paraguai.

Abstract

Fish species of the *Zungaro* genus, popularly known as “Jaú”, have great economical importance on the fishing industry. Also, *Zungaro* is one of the largest migratory fishes in Brazil. These species, distributed along Amazonic and Paraná-Paraguay River basins, have had a severe decline on their population and present serious taxonomical inconsistencies. In this study, *Zungaro* populations of Paraná-Paraguay River and Amazonic basins were molecularly described to solve taxonomical inconsistencies and generate information, currently almost non-existent, regarding the genetic diversity of natural populations of this genus. Analysis of mitochondrial sequences of D-loop and *ATPase 6* gene regions evidenced a genetic difference corresponding to related, but different, species (i.e., of the same genus), according to existing literature. Therefore, it supports the conclusion that *Zungaro* populations of Paraná-Paraguay River basin (*Zungaro jahu*) do not belong to the same species found in Amazonic basin (*Zungaro zungaro*).

Key-words: *Zungaro*; jaú; D-loop; ATPase 6; molecular differentiation; Paraná river; Paraguai.

1. Introdução

A ordem Siluriformes inclui 37 famílias de bagres amplamente distribuídos em águas doces (Sullivan et al., 2006). Uma dessas famílias é a Pimelodidae, com o gênero *Zungaro*. Esses são peixes de couro que chegam a pesar 150 Kg e podem ter até 144 cm de comprimento (Agostinho et al., 2003). São piscívoros, de hábito migratório, fertilização externa e costumam viver em poços profundos de ambientes lóticos. Os juvenis são, normalmente, capturados nos reservatórios.

O peixe conhecido popularmente como “jaú” é de grande importância pesqueira e altamente apreciado na alimentação humana e na pesca esportiva. Além de ser um dos maiores peixes migradores das bacias do rio Paraná-Paraguai e Amazônica, nessas regiões foram caracterizados morfologicamente como duas espécies diferentes. Até a década de 90 todos os indivíduos de “jaú” eram denominados cientificamente como *Paulicea luetkeni*, sendo depois classificados como gênero *Zungaro*. De acordo com Lundberg e Littmann (2003) a espécie *Zungaro jahu* (Ihering, 1898) é encontrada na bacia do rio Paraná-Paraguai. Segundo os mesmos autores, na bacia do rio Amazonas e Orinoco ocorre a espécie *Zungaro zungaro* (Humboldt, 1821). Por outro lado, em revisão feita por Graça e Pavanelli (2007) foi adotada a interpretação de que todas as populações de “jaú” são da espécie *Zungaro zungaro*, em conformidade com Silfvergrip (1992) e Silvano et al. (2001).

Estima-se que 20% da ictiofauna continental do mundo esteja extinta ou ameaçada de extinção (FAO, 2004). Ainda, segundo o Ministério do Meio Ambiente (2007), 134 espécies de peixes de água doce estão em risco de extinção no Brasil. Em geral, dos fatores que levaram a redução ou desaparecimento de muitas espécies de peixes, podem-se destacar a poluição e a eutrofização, o assoreamento, a construção de barragens e o controle de cheias, a sobrepesca e a introdução de espécies (Vrijenhoek, 1998; Agostinho et al., 2003; Hatanaka et al., 2006).

O jaú ainda não se encontra nas categorias criticamente em perigo, ou em perigo, mas corre o risco de extinção a médio prazo, em função do declínio populacional e da fragmentação da sua área de ocupação (Fonte : IUCN Red

List of Threatened Animals). Segundo Alves (2006) o “jaú” pode ser considerado localmente extinto em vários trechos das bacias dos rios Grande e Paranaíba devido às cascatas de reservatórios nesses rios. Dados mostram que desde 1997 até a presente data, poucos exemplares da espécie foram coletados pela equipe de ictiologia da UNIOESTE, em Toledo-PR (S. Makrakis, comunicação pessoal). As informações sobre a produção da pesca profissional no reservatório de Itaipu revelam a diminuição da pesca de jaú desde o início da década de 90 (Okada et al., 2005). Além disso, informações sobre a biologia da espécie são escassas, e em sua maioria ligadas à morfologia, ao modo de nutrição e parasitas da espécie. Informações quanto a sua característica migratória são ainda desconhecidas (Agostinho et al., 2003).

Várias regiões do DNA mitocondrial são utilizadas para estudos populacionais. Alguns setores da molécula do mtDNA são mais adequados para avaliações de espécies próximas. A região controle (*D-loop*) e o gene *ATPase 6* estão entre os mais utilizados para esse propósito (Meyer, 1994; Machordon e Doadrio, 2001; Perdices e Doadrio, 2001; Sivasundar et al., 2001; Prioli et al., 2002; Avise, 2004). As mutações acumulam-se mais rapidamente na região controle, assim, essa é eficiente em estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações (Meyer, 1994; Faber e Stepien, 1977; Sivasundar et al., 2001; Avise, 2004).

Assim, o objetivo desse trabalho foi caracterizar molecularmente as populações de “jaú” das bacias do Paraná-Paraguai e Amazônica, para auxiliar na resolução de problemas taxonômicos, como as constantes mudanças no nome científico dessa espécie. Ainda, ampliar-se-ão as informações que são quase inexistentes sobre a diversidade genética das populações naturais do gênero *Zungaro*.

2. Metodologia Detalhada

Material Biológico e Locais de Coleta

Indivíduos do gênero *Zungaro* (“jaú”) foram coletados no rio Manso, localizado na bacia do rio Paraná-Paraguai, e no Rio Tocantins, na bacia do Tocantins (Figura 1). Amostras dos seus músculos, assim que coletados, foram fixados em álcool etílico comercial e, em laboratório, mantidos a -20°C . Foram analisados quatro indivíduos do rio Manso e três do rio Tocantins para a região *D-loop*, e 11 do rio Manso e 5 do rio Tocantins para a região da *ATPase 6*.

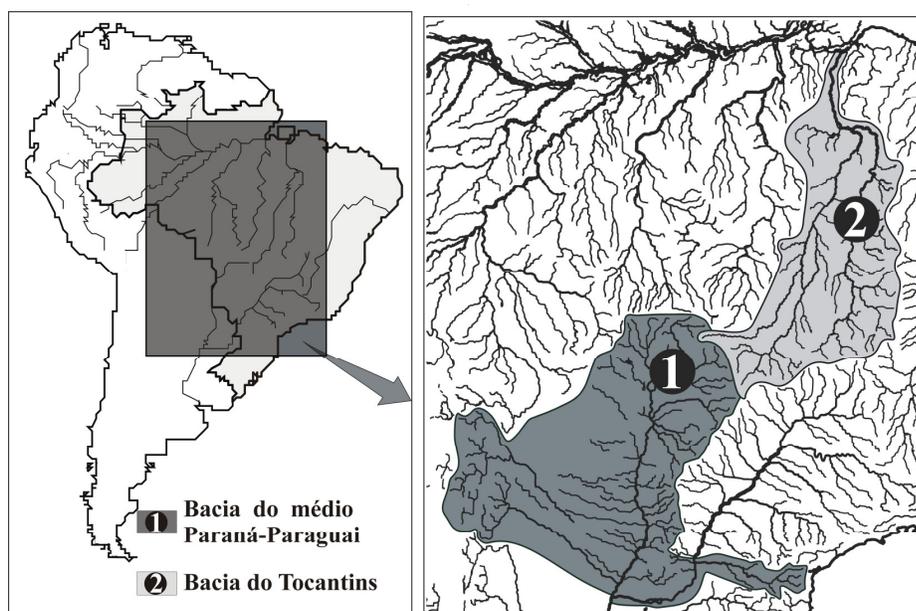


Figura 1. Área de coleta de “jaú” (*Zungaro*). Os números correspondem aos pontos de coleta: (1) Rio Manso, na bacia do rio Paraná-Paraguai; (2) Rio Tocantins, na bacia Amazônica.

- **Rio Manso.** Este rio está localizado na bacia do rio Paraguai. É afluente do rio Cuiabá, um dos formadores do rio Paraguai. As coletas foram realizadas no ponto com as coordenadas geográficas $14^{\circ}48'S$ $56^{\circ}05'W$. Esse ponto está situado no rio Manso, na Chapada dos Guimarães, estado de Mato Grosso. Está na área de influência da APM Manso de Furnas Centrais Elétricas S/A, no rio Manso, pois localiza-se a cerca de 35 km a jusante da barragem do reservatório.

- **Rio Tocantins.** O rio Tocantins possui uma extensão total de aproximadamente 2.500 km, e forma-se a partir dos rios das Almas e Maranhão. Estes rios apresentam suas cabeceiras localizadas no Planalto de Goiás, a mais de 1.000 m de altitude, na região mais central do Brasil. Na região mais baixa a bacia faz parte da floresta amazônica. Entre essas duas regiões do Tocantins há uma zona de transição, com ambientes pré-amazônicos. Esse rio é o afluente da margem direita do rio Amazonas mais próximo de sua foz, no oceano Atlântico. A área de drenagem total da bacia do Tocantins é de 767.000 km² e tem como principal afluente o rio Araguaia. As coletas foram realizadas na altura da barragem da Hidrelétrica Lajeado, nas coordenadas geográficas 09°46'S 48°21'W.

Extração de DNA

Para a extração do DNA total das amostras foi utilizada a metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi et al., 1998). As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e homogeneizadas em tampão PS (Tris-HCl 0,2 M, EDTA 30 mM, SDS 2% e sacarose 5%), tampão TH (Tris-HCl 10 mM, NaCl 60 mM, EDTA 10 mM, sacarose 5%, espermina 0,15 mM e espermidina 0,15 mM) pH 8,0 e proteinase K (20 µg/µL) por 2 horas em banho-maria a 37 °C. Em seguida o DNA foi lavado com fenol/clorofórmio (1:1) e clorofórmio, respectivamente, e precipitado com solução salina (NaCl 5 M) e etanol absoluto gelado para a sua purificação. Após, o tubo foi suavemente invertido para precipitar o DNA e a suspensão foi centrifugada por 10 min a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet*, após ser lavado com etanol 70% gelado e centrifugado por 2 min e estar completamente seco, foi ressuscitado em 50 µL de tampão TE diluído 10 vezes (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM) com RNase (20µg/mL). O DNA foi assim armazenado em *freezer* a -20 °C.

Para a quantificação e avaliação da qualidade do DNA, uma alíquota de cada amostra extraída foi comparada visualmente com uma amostra conhecida de DNA λ. Para isso foi utilizado gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (0,2 µg/1 mL) e fotografado por um sistema de EDAS 290 (*Kodak 1D Image Analysis 3.5*)

Região controle (*D-loop*) e *ATPase6* do DNA mitocondrial

Os fragmentos de DNA mitocondrial foram amplificados via PCR, a partir de amostras de DNA total, de acordo com Prioli et al. (2002). Duas regiões do genoma mitocondrial foram utilizadas. O primeiro fragmento de, aproximadamente, 2000 pares de bases (pb) foi amplificado pelos *primers* H1091 e L15774. Esse é constituído por dois genes e uma seqüência da região hipervariável 5' da fita pesada da região controle do mtDNA. Esses genes são *tRNA^{thr}* e *tRNA^{Pro}*, que codificam o tRNA dos aminoácidos treonina e prolina, respectivamente. O outro fragmento, de cerca de 1000 pb, abrange as regiões dos genes da *ATPase 6* e *8* e um pedaço do *tRNA^{Lys}*, e foi amplificado pelos *primers* H8331 e L9236.

Os fragmentos foram amplificados em duas reações independentes de PCR para depois serem seqüenciados e analisados, utilizando réplicas. A mistura de reação consistiu de tampão Tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50 mM), MgCl₂ 1,5 mM, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U/Reação de *Taq* DNA polimerase, DNA genômico 30 ng e água deionizada e autoclavada para completar 25 µL. As amplificações dos fragmentos de interesse foram executadas em termociclador por 40 ciclos, com os seguintes perfis de temperatura: um ciclo inicial de quatro minutos a 94 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 59 °C e dois minutos a 72 °C, e um último ciclo de 10 min a 72 °C. A eficiência da amplificação foi confirmada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e com a comparação com quantidades conhecidas de DNA do marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Invitrogen).

Seqüenciamento

Os fragmentos resultantes foram novamente amplificados com os *primers* L8331, para a região da *ATPase 6*, e L15774 para a região *D-loop*. Cerca de 50 ng de DNA do produto final de cada reação de PCR foram usados diretamente em reações de seqüenciamento de nucleotídeos em um seqüenciador automático MegaBace (Amersham), seguindo instruções do fabricante. As seqüências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram alinhadas utilizando-se o CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) e

editadas manualmente com o programa BIOEDIT (Hall, 1999). O número de nucleotídeos polimórficos e as distâncias-p (porcentagem de diferenças nucleotídicas) foram calculados com o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância-p, para as duas regiões do genoma mitocondrial, foram utilizadas para o agrupamento com o algoritmo *neighbor-joining*. Análises de *bootstrap* basearam-se em 1.000 reamostragens.

As análises filogenéticas foram processadas com comparações entre indivíduos tomados dois a dois. Admitindo-se que o significado evolutivo das deleções em seqüências do DNA não é bem conhecido (Nei e Kumar, 2000), não foram incluídas nas análises os sítios com deleção em cada uma das comparações.

Com os programas PAUP 4.0 (Swofford, 2002) e Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 1998) foram selecionados os modelos evolutivos, utilizando-se os procedimentos *Akaike Information Criterion* corrigido (AICc) e *Bayesian Information Criterion* (BIC). O modelo escolhido, por máxima-verossimilhança, como o melhor para o ajuste dos dados das regiões da *ATPase6* e do *D-loop* foi o HKY+I. As relações filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais foram obtidas com o programa PHYL (Guindon e Gascuel, 2003). Com o modelo mencionado foi empregado o método da máxima verossimilhança, baseados em 500 reamostragens.

Seqüências do *GenBank*

Foram selecionadas no *GenBank* e analisadas outras seqüências de espécies de peixe para servirem de comparação com as seqüências de “jaú” obtidas nesse trabalho. Para garantir maior confiabilidade nas análises, as seqüências foram alinhadas e só os mesmos pares de bases de cada região, *ATPase 6* ou *D-loop*, foram considerados. Ainda, apenas as seqüências disponibilizadas que faziam parte de artigos já publicados em revistas indexadas na base Thompson-ISI (www.webofscience.com) foram selecionadas para as comparações. Os números de acesso no *GenBank* das seqüências estão listados na Tabela 1.

Tabela 1. Seqüências do mtDNA da região *D-loop* de dois gêneros de Siluriformes, *Pseudobagrus* e *Hypostomus*, e da *ATPase 6* de dois Siluriformes da família Ariidae, *Potamarius* e *Cathorops*, com seus respectivos números de acesso no *GenBank*.

Espécie	Fragmento	Acesso Genbank	Bibliografia
<i>Pseudobagrus taeniatus</i>	<i>D-loop</i>	AB097696	Watanabe e Nishida, 2003
<i>Pseudobagrus aurantiacus</i>	<i>D-loop</i>	AB097694	Watanabe e Nishida, 2003
<i>Pseudobagrus nudiceps</i>	<i>D-loop</i>	AB097693	Watanabe e Nishida, 2003
<i>Pseudobagrus ichikawai</i>	<i>D-loop</i>	AB097692	Watanabe e Nishida, 2003
<i>Pseudobagrus tokiensis</i>	<i>D-loop</i>	AB097691	Watanabe e Nishida, 2003
<i>Hypostomus affinis</i>	<i>D-loop</i>	AJ318358	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus punctatus</i>	<i>D-loop</i>	AJ318357	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus commersoni</i>	<i>D-loop</i>	AJ318356	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus nigromaculatus</i>	<i>D-loop</i>	AJ318355	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus watwata</i>	<i>D-loop</i>	AJ318352	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus plecostomus</i>	<i>D-loop</i>	AJ318351	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus fonchii</i>	<i>D-loop</i>	AJ318350	Montoya-Burgos, 2003
<i>Hypostomus boulengeri</i>	<i>D-loop</i>	AJ318344	Montoya-Burgos, 2003
<i>Potamarius grandoculis</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990657	Betancur et al., 2007
<i>Potamarius nelsoni</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990656	Betancur et al., 2007
<i>Potamarius izabalensis</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990654	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops tuyra</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990652	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops hypophthalmus</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990651	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops multiradiatus</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990650	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops aguadulce</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990648	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops arenatus</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990647	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops spixii</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990646	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops steindachneri</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990644	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops fuerthii</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990641	Betancur et al., 2007
<i>Cathorops dasycephalus</i>	<i>ATPase 6</i>	DQ990639	Betancur et al., 2007

Para a região *D-loop* foram analisados os primeiros 355 pb aproximadamente, de dois gêneros de Siluriformes, *Pseudobagrus* com cinco diferentes espécies e *Hypostomus*, com oito espécies. Já para a *ATPase 6* dois outros gêneros de Siluriformes da família Ariidae foram utilizados, *Potamarius*, com três e *Cathorops* com nove espécies. Para a região da *ATPase 6* foi

utilizada a seqüência correspondente aos 204 pb do início dessa região do mtDNA de “jaú”. Todos os indivíduos tiveram seus nomes conferidos na base de dados *www.fishbase.org* (Froese e Pauly, 2007) para evitar comparações entre espécies sinônimas. Para os indivíduos da família Ariidae a revisão feita por Marceniuk e Menezes (2007) foi consultada. Segundo os autores, a espécie *Potamarius usumacintae* é sinônimo de *Potamarius grandoculis*, que deve ser utilizado. Assim, o nome do indivíduo foi usado na sua forma mais correta, mas com a seqüência disponível no GenBank ainda para *P. usumacintae*.

3. Resultados

Com a amplificação dos fragmentos de *D-Loop* obteve-se uma seqüência de, aproximadamente, 2000 pb. No entanto, duas seqüências menores, uma compreendendo o início da região controle do D-loop e a outra correspondente aos genes *tRNA^{Thr}* e *tRNA^{Pro}* foram selecionadas para as análises. Essas foram escolhidas por conterem uma melhor qualidade do seqüenciamento após a edição manual, e por serem suficientes para discriminar populações.

As seqüências *D-loop* (~355 pb) foram confirmadas, por similaridade, com acessos disponíveis no *GenBank*, e os tRNAs (140 pb) foram identificados com o programa tRNAScan-SE (Lowe e Eddy, 1997). Após o alinhamento foram identificados dois pontos de substituição nucleotídica ao longo da seqüência dos tRNAs. As duas substituições estavam associadas às localidades onde os indivíduos foram coletados, rio Manso ou Tocantins.

Para a região do *D-loop*, foram analisados quatro indivíduos do Rio Manso e três do Tocantins. A proporção de bases (A = 36,56; C = 17,61; G = 13,78; T = 32,05%) teve uma alta proporção de nucleotídeos AT, o que é esperado para a região controle do DNA mitocondrial. O alinhamento dessas seqüências apontou 19 pontos de substituições nucleotídicas, sendo 15 transversões e quatro transições. Essa maior taxa de transição ($R = si/sv = 3,75$) concorda com o esperado para o fragmento correspondente à região *D-loop* (Nei e Kumar, 2000). Dessas substituições 16 estão associadas aos indivíduos coletados no rio Tocantins. As demais substituições não caracterizam nenhuma região. Além disso, os indivíduos do rio Tocantins apresentam uma inserção de uma citosina.

A Tabela 2 apresenta os polimorfismos da região hipervariável do *D-loop*, em número e em porcentagens, entre os indivíduos de “jáú” dos rios Manso e Tocantins, comparados dois a dois. Entre os indivíduos coletados no Manso as diferenças foram de, no máximo, um sítio polimórfico (0,3%). Já quando esses indivíduos foram comparados aos indivíduos do Tocantins, 16 e 17 sítios polimórficos foram encontrados. Isso representa, em porcentagem, uma distância-*p* de 4,5 a 4,8%. Valores semelhantes são apresentados entre espécies dentro de diversos gêneros para a região *D-loop*.

Tabela 2. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região do *D-loop* (~355 pb) que discriminam espécies de *Zungaro* das bacias do Paraguai (MS) e rio Tocantins (RT).

Espécie	MS04	MS05	MS06	MS09	RT02	RT03	RT05
MS04	—	0,3	0,3	0,3	4,8	4,8	4,8
MS05	1	—	0,0	0,0	4,5	4,5	4,5
MS06	1	0	—	0,0	4,5	4,5	4,5
MS09	1	0	0	—	4,5	4,5	4,5
RT02	17	16	16	16	—	0,0	0,0
RT03	17	16	16	16	0	—	0,0
RT05	17	16	16	16	0	0	—

As Tabelas 3 e 4 também apresentam os valores, em número e em porcentagem, de sítios polimórficos da região *D-loop* entre espécies dentro de dois gêneros de Siluriformes, *Pseudobagrus* e *Hypostomus*. Com a comparação dos valores obtidos para a mesma região *D-loop*, as diferenças entre “jaús” coletados no Manso e no Tocantins mantiveram-se nos mesmos patamares das diferenciações entre espécies dos outros dois gêneros. Metade das relações entre as espécies de *Pseudobagrus* teve valores semelhantes aos encontrados entre os haplogrupos de “jaú”, com distâncias-*p* até, aproximadamente, 5,0%. Situação parecida ocorre na comparação entre os valores das diferenças entre os haplogrupos de “jaú” e entre as diferentes espécies de *Hypostomus*. A partir dos dados percebe-se que várias espécies de *Hypostomus* mantêm distâncias-*p* similares às encontradas entre os indivíduos de “jaú” coletados nos rios Manso e Tocantins.

Tabela 3. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região do *D-loop* (~355 pb) que discriminam espécies de *Pseudobagrus*.

Espécie	<i>P. taeniatus</i>	<i>P. aurantiacus</i>	<i>P. nudiceps</i>	<i>P. iehikawai</i>	<i>P. tokiensis</i>
<i>P. taeniatus</i>	—	1,1	4,7	7,8	5,3
<i>P. aurantiacus</i>	4	—	5,0	8,3	5,5
<i>P. nudiceps</i>	17	18	—	6,6	5,0
<i>P. iehikawai</i>	28	30	24	—	7,5
<i>P. tokiensis</i>	19	20	18	27	—

Tabela 4. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região do *D-Loop* (~355 pb) que discriminam espécies de *Hypostomus*. **Haf** = *H. affinis*, **Hpu** = *H. punctatus*, **Hco** = *H. commersoni*, **Hni** = *H. nigromaculatus*, **Hwa** = *H. watwata*, **Hpl** = *H. plecostomus*, **Hfo** = *H. fonchii*, **Hbo** = *H. boulengeri*.

Espécie	Haf	Hpu	Hco	Hni	Hwa	Hpl	Hfo	Hbo
Haf	—	5,7	6,0	7,4	8,7	7,3	10,3	6,8
Hpu	21	—	4,4	7,4	6,0	4,6	8,4	4,6
Hco	22	16	—	7,2	5,8	6,0	8,8	5,2
Hni	27	27	26	—	9,6	7,9	8,5	6,6
Hwa	32	22	21	35	—	6,8	11,1	6,1
Hpl	27	17	22	29	25	—	9,8	4,6
Hfo	38	31	32	31	41	36	—	9,5
Hbo	25	17	19	24	28	17	35	—

A partir do dendrograma construído com os valores da distância-p para a região *D-loop*, apresentado na Figura 2, é possível a observação da separação dos haplogrupos de “jaú”. Além disso, as espécies dos outros dois gêneros de Siluriformes, *Hypostomus* e *Pseudobagrus*, foram incluídas também nessa figura para facilitar as comparações. O dendrograma agrupou os indivíduos de “jaú” de acordo com as suas localidades, suportada por valores de *bootstrap* de 100%.

Fica claramente apresentada a diferenciação entre os haplogrupos do Manso e de Tocantins, algumas vezes maiores que entre as espécies dos grupos externos.

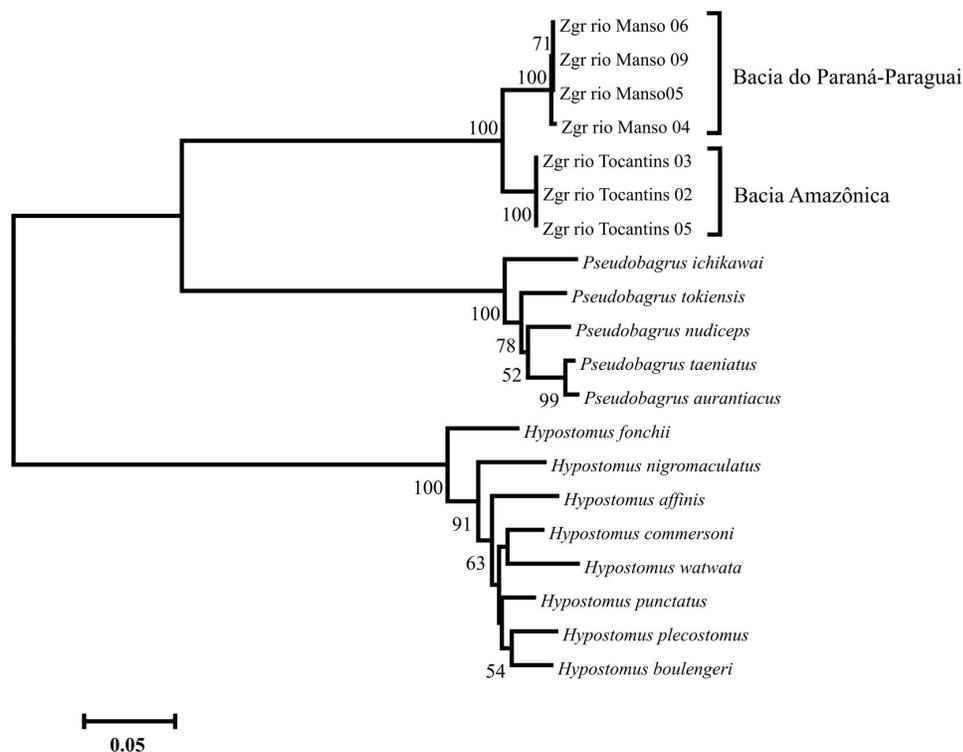


Figura 2. Dendrograma das distâncias-p da região *D-loop* de oito espécies do gênero *Hypostomus*, cinco espécies do gênero *Pseudobagrus* e de indivíduos de “jaú” coletados nos rios Tocantins (ZgrTO) e Manso (ZgrMS). As seqüências dos indivíduos dos gêneros *Hypostomus* e *Pseudobagrus* foram obtidas no GenBank.

A região da *ATPase 6* é mais conservada e, portanto, apresenta menos diferenças entre grupos próximos. Após a amplificação dessa região foi gerado um fragmento com, aproximadamente, 1000 pb, correspondente às seqüências parciais dos genes *tRNA^{Lys}* e *CO3* e às seqüências completas dos genes da *ATPase 8* e *ATPase 6*. As seqüências foram identificadas com acessos disponíveis no *GenBank*, por similaridade.

Uma seqüência de 204 pb com boa qualidade, foi selecionada para as análises, que corresponde à região do início do gene *ATPase 6*. Foram analisados onze indivíduos coletados no rio Manso, identificados como *Z. jahu*, e cinco do rio Tocantins, identificados como *Z. zungaro*. Entre as localidades foram encontradas cinco substituições nucleotídicas para essa região da *ATPase 6*,

sendo que uma dessas substituições estava também em dois indivíduos do rio Manso. Essa seqüência parcial da *ATPase 6* corresponde a 68 aminoácidos. Entre os indivíduos de “jaú” das duas localidades não foi evidenciada nenhuma substituição aminoacídica no polipeptídeo previsto.

Nas comparações dos indivíduos de “jaú” tomados dois a dois não foi evidenciada nenhuma substituição nucleotídica dentro das localidades para a região da *ATPase 6*. Ou seja, entre os indivíduos coletados na mesma região, rio Manso ou rio Tocantins, não houve diferenças nas seqüências nucleotídicas, a não ser nos dois indivíduos do Manso que revelaram um base diferente.

Tabela 5. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região da *ATPase 6* (~204 pb) que discriminam espécies de *Potamarius*.

Espécie	<i>P. grandoculis</i>	<i>P. nelsoni</i>	<i>P. izabalensis</i>
<i>P. grandoculis</i>	—	0,5	1,0
<i>P. nelsoni</i>	1	—	1,5
<i>P. izabalensis</i>	2	3	—

Quando as comparações entre os indivíduos, também tomados dois a dois, são feitas entre as localidades (Manso e Tocantins) essa diferenciação torna-se constante, com cinco sítios polimórficos. Essa diferença representa uma distância-p de 2,5% entre os haplótipos das bacias do Paraná-Paraguai e Amazônica. Esses valores são maiores que os encontrados na diferenciação entre as três espécies de Siluriformes do gênero *Potamarius* (Tabela 5), e similares a algumas distâncias-p entre certas espécies do gênero *Cathorops* (Tabela 6). As diferenciações entre as espécies desse último gênero têm uma variação ampla, de 1,5%, entre as espécies menos diferenciadas, a 17,6% entre as mais distantes.

Tabela 6. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos da região da *ATPase 6* (~341 pb) que discriminam espécies de Ariidae do gênero *Cathorops*. **Ctu** = *C. tuyra*; **Chy** = *C. hypophthalmus*, **Cmu** = *C. multiradiatus*, **Cag** = *C. aguadulce*; **Car** = *C. arenatus*; **Csp** = *C. spixii*; **Cst** = *C. steindachneri*; **Cfu** = *C. fuerthii*; **Cda** = *C. dasycephalus*.

Espécie	Ctu	Chy	Cmu	Cag	Car	Csp	Cst	Cfu	Cda
Ctu	—	2,9	9,3	7,4	10,3	9,8	5,9	9,8	18,1
Chy	6	—	10,3	6,4	10,3	9,8	4,9	9,8	17,6
Cmu	19	21	—	11,3	12,7	13,2	10,3	8,3	16,7
Cag	15	13	23	—	8,3	6,9	6,4	8,8	13,2
Car	21	21	26	17	—	1,5	9,3	6,4	15,7
Csp	20	20	27	14	3	—	8,8	6,9	14,7
Cst	12	10	21	13	19	18	—	7,8	16,2
Cfu	20	20	17	18	13	14	16	—	14,7
Cda	37	36	34	27	32	30	33	30	—

A Figura 3 apresenta o dendrograma construído com os valores da distância-p da região da *ATPase 6* dos indivíduos de “jaú” dos rios Manso e Tocantins, e dos grupos de comparação. A divergência genética entre os dois haplogrupos, além dos valores das tabelas, também foi demonstrada com a figura. Pode-se notar a maior diferenciação entre os indivíduos de “jaú” coletados nas duas localidades do que entre as três espécies do gênero *Potamarius*. Essa diferença é similar a encontrada, também, entre espécies de *Cathorops*. As seqüências da *ATPase 6* também foram utilizadas para uma análise filogenética de máxima verossimilhança (Figura 4) com o modelo HKY+I que foi selecionado com o programa Modeltest 3.7. Os dois gráficos (Figuras 3 e 4) são congruentes quanto aos resultados, mostrando a diferenciação, em níveis interespecíficos, entre as populações de “jaú” das bacias do Paraná-Paraguai e Amazônica, suportadas por valores de *bootstrap* de 100%.

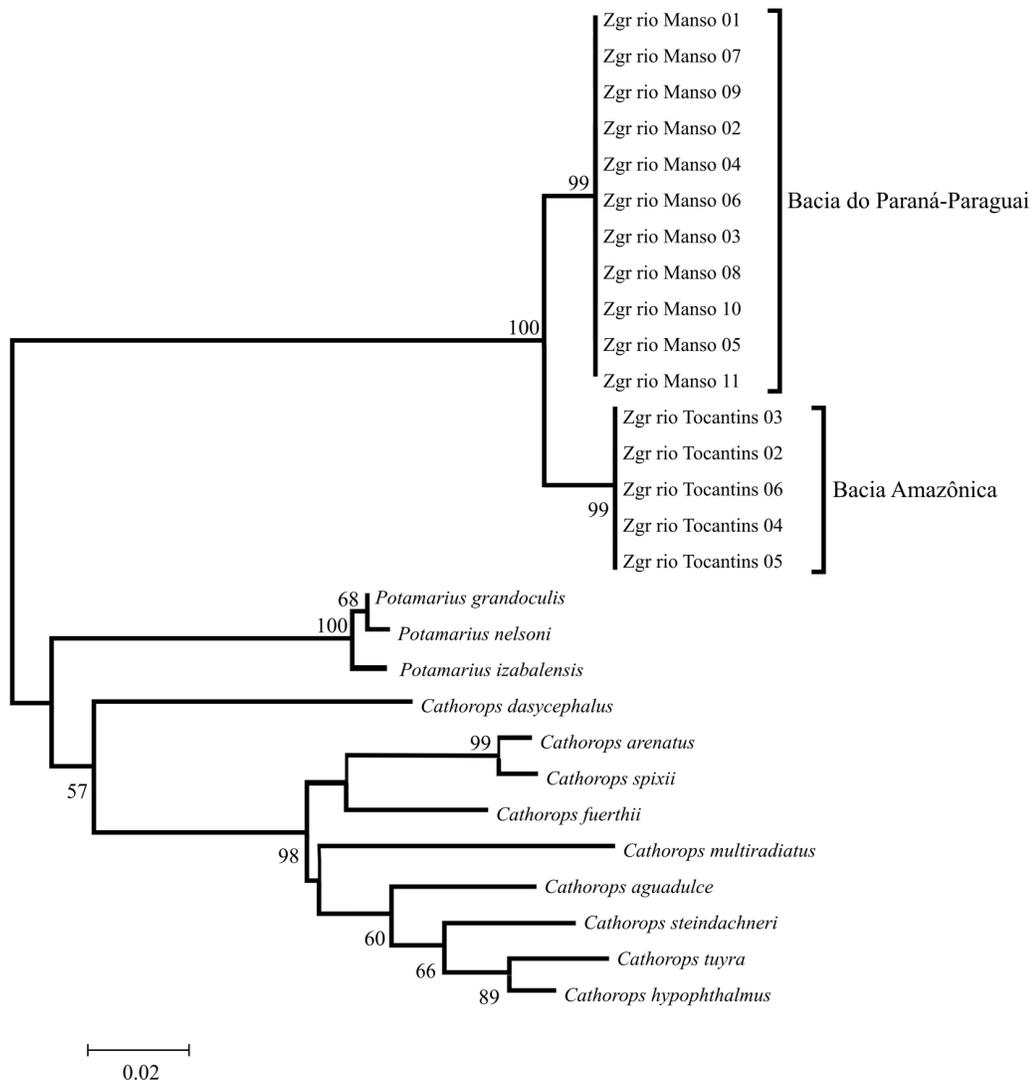


Figura 3. Dendrograma das distâncias-*p* da ATPase 6 de nove espécies do gênero *Cathorops*, de três espécies de *Potamarius* e de indivíduos de “jaú” coletados nos rios Manso (ZgrMs), bacia do Paraná-Paraguai, e Tocantins (ZgrTO), bacia Amazônica. As seqüências dos indivíduos dos gêneros *Cathorops* e *Potamarius* foram obtidas no GenBank.

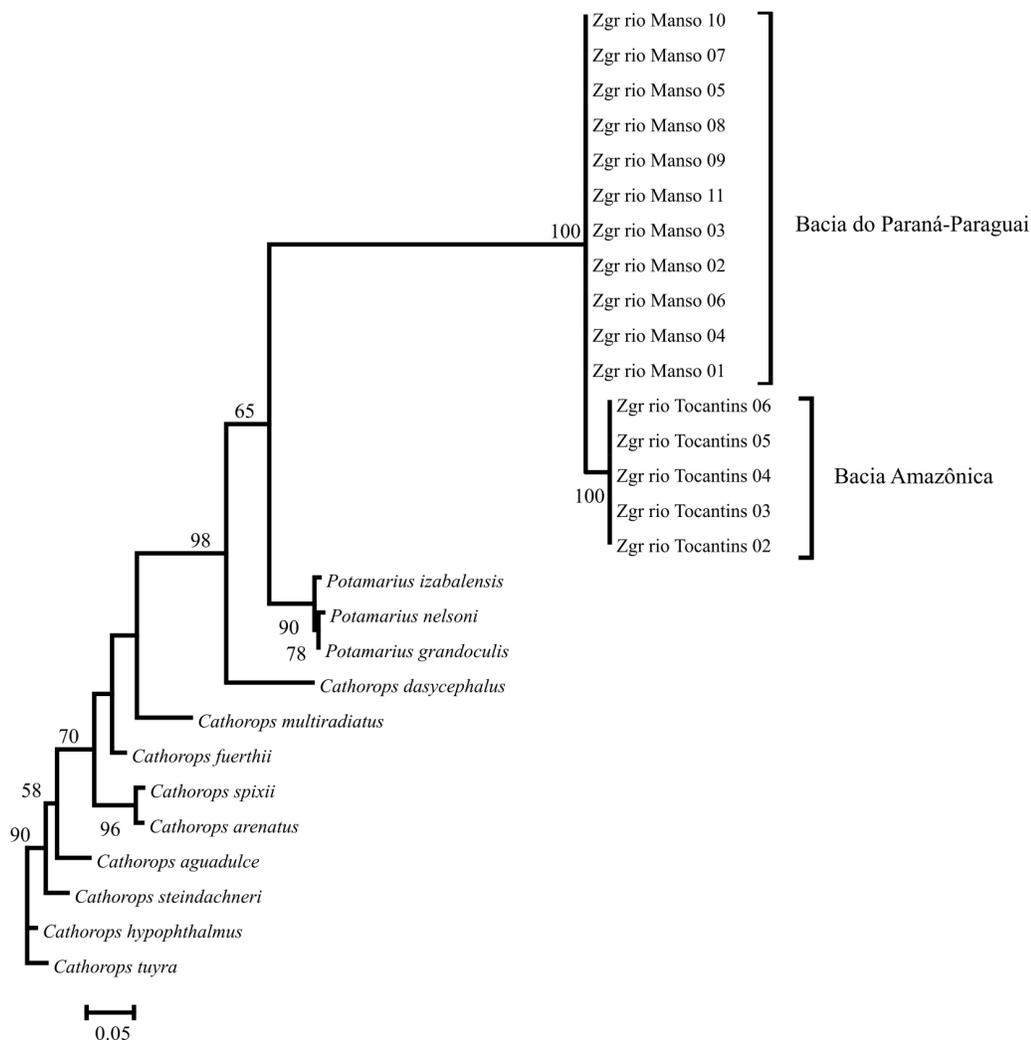


Figura 4. Dendrograma de máxima-verossimilhança construído com o modelo HKY+I (parâmetros: Nst=2; TRatio=7,2523; Pinvar=0,5911), a partir de seqüências nucleotídicas da *ATPase6* de nove espécies do gênero *Cathorops*, três espécies de *Potamarius* e de indivíduos de “jaú” coletados nos rios Manso (ZgrMs), bacia do Paraná-Paraguai, e Tocantins (ZgrTO), bacia Amazônica. As seqüências dos indivíduos dos gêneros *Cathorops* e *Potamarius* foram obtidas no GenBank.

4. Discussão

Em contraposição a Lundberg e Littmann (2003), que identificam a espécie da bacia do rio Paraná como *Zungaro jahu*, Silfvergrip (1992) e Graça e Pavanelli (2007) utilizam *Z. zungaro* para a mesma população, pelo menos em caráter provisório. Portanto, a condição taxonômica da população nativa da bacia do Paraná-Paraguai, em relação à espécie amazônica, está sujeita a interpretações discrepantes. A análise das seqüências mitocondriais *D-loop* e *ATPase 6* de *Zungaro* produziu evidências que apontam para a solução desse conflito. Os valores de distância genética obtidas com *D-loop* e *ATPase 6*, tanto com a distância *p* quanto com a distância HKY + I, são consistentes em indicar diferenciação genética entre as populações de *Zungaro* do rio Tocantins e do rio Manso. Além disso, a magnitude da divergência encontrada está em patamar que permite conclusão sobre a identificação taxonômica dos dois grupos.

As distâncias encontradas entre as duas populações de *Zungaro* estão em níveis equivalentes ao registrado na literatura entre muitas espécies próximas entre si (Samonte et al., 2007; Oliveira et al., 2006). Por essa perspectiva, foi adotada a estratégia de comparar as distâncias obtidas entre espécies de um mesmo gênero de Siluriformes, geradas a partir de seqüências disponíveis no *GenBank*.

Os valores da distância-*p* da região *D-loop*, entre indivíduos de “jaú” do rio Manso confrontados com indivíduos do rio Tocantins, variaram entre 4,5 e 4,8%. Esses são da mesma magnitude das distâncias-*p* encontradas entre indivíduos de espécies diferentes dentro dos gêneros de Siluriformes *Pseudobagrus* e *Hypostomus*. A distância entre indivíduos baseada no modelo HKY + I confirma que as populações do Manso e do Tocantins divergem entre si ao equivalente a espécies diferentes. Essa abordagem foi utilizada anteriormente com populações de diferentes bacias do ciclídeo *Geophagus*, e também foram encontradas variações semelhantes às variações interespecíficas dentro de outros gêneros de ciclídeos (Boni et al., dados não publicados).

As análises do fragmento da *ATPase 6* de “jaú” indicaram diferenças de menor magnitude. Essa ocorrência é esperada já que essa região é mais conservada do que o *D-loop*. Dessa forma, entre indivíduos de mesma espécie ou de espécies muito próximas as diferenças devem ser pouco acentuadas (Aviso,

2004). Ainda assim, as distâncias p e HKY + I seguem o mesmo padrão verificado para *D-loop*. Ou seja, as distâncias entre indivíduos de “jaú” do rio Manso e do rio Tocantins são compatíveis com o encontrado para diferentes espécies dentro de outros gêneros de Siluriformes.

Por outro lado, a proximidade filogenética pode ser inferida a partir das seqüências nucleotídicas dos genes mitocondriais *tRNA^{Pro}* e *tRNA^{Thr}*. Esses dois genes mitocondriais não apresentam nenhuma substituição nucleotídica em suas seqüências nas comparações entre as populações do Manso e de Tocantins. Esse é um resultado esperado para espécies próximas. Por exemplo, Perioto (2004) encontrou seqüências do gene *tRNA^{Pro}* idênticas entre os citótipos A, C e D de *Hoplias* aff. *malabaricus*. É consenso que os citótipos de *H. aff. malabaricus* constituem espécies diferentes, ainda não descritas. Assim, a identidade do gene *tRNA^{Pro}* entre as duas populações de *Zungaro* não é informativo sobre o grau de diferenciação genética e, apenas, revela o alto parentesco entre as duas populações.

Como demonstrado, existe divergência genética entre as populações de *Zungaro* das bacias Paraná-Paraguai e Amazônica, mesmo que em patamar não muito acentuado. Esse seria um nível de diferenciação que se poderia esperar entre espécies próximas, que oferecem dificuldades para a identificação em bases morfológicas. O alto grau de semelhança morfológica e genética, e a associação de haplótipos com bacias hidrográficas, podem ser explicados pela origem das populações. As hipóteses de vicariância e dispersão são plausíveis para explicar a diferenciação genética e o padrão biogeográfico.

Hubert e Renno (2006) mostram que a separação das bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai ocorreu no final do Mioceno, nos últimos 10 Ma. Portanto, na formação das duas bacias teria sido possível a separação definitiva das duas populações de “jaú”, por vicariância. A partir desse evento teria sido iniciada a diferenciação genética. É possível que as diferenças acumuladas estejam em volume compatível com o período decorrido desde a separação. Por outro lado, conforme Räsänen et al. (1995) as ocorrências de captura de cabeceiras continuaram mesmo após o estabelecimento da bacia Amazônica e do Paraná-Paraguai. Ainda hoje, em épocas de chuvas, seria quase certa uma comunicação entre essas bacias e conseqüente troca de faunas nessa região. Os rios Madeira e Guaporé, que são afluentes do Amazonas, encontram as cabeceiras do Rio

Paraguai no Estado do Mato Grosso. De qualquer modo, em algum momento o fluxo gênico entre as populações de “jaú” teria sido interrompido, caracterizando vicariância.

Com as diferenciações nos níveis encontrados nesse trabalho, é possível concluir que as populações das bacias Amazônica e do Paraná-Paraguai estão isoladas geograficamente por tempo suficiente para que ocorresse a especiação. Ou seja, essas populações não trocam genes por um período longo, o que deve ter levado a diferenciação dessas populações em duas espécies diferentes.

Entretanto, as diferenças genéticas acumuladas estão, aparentemente, em níveis muito baixos para o que poderia ser esperado no período de 10 Ma (Hubert e Renno, 2006), desde a separação das bacias do Amazonas e do Paraná-Paraguai. Independentemente do processo inicial, vicariância ou dispersão, o isolamento geográfico deve ter se estabelecido em momento posterior à separação das duas bacias. Esta interpretação parece acomodar melhor a divergência em níveis baixos, como a encontrada.

Esse acentuado padrão geográfico na distribuição dos haplótipos *D-loop* e *ATPase 6* fica evidenciado em todas as árvores construídas com as relações entre as populações das bacias do Manso e do Tocantins. Além disso, os resultados obtidos demonstram claramente diferenças entre as duas populações em níveis que discriminam espécies de peixes. Portanto, é inevitável concluir que a população de *Zungaro* da bacia do Paraná-Paraguai não pertence à espécie de *Zungaro zungaro* da bacia Amazônica.

Segundos os resultados do presente trabalho, as populações de “jaú” da bacia do Paraná-Paraguai devem realmente ser da espécie *Zungaro jahu*. Esse fato torna-se de importância elevada, pois a espécie de “jaú” encontrada nessa está sob o risco de extinção local (Alves, 2006). Assim, outros estudos da diversidade genética dessa espécie tornam-se imprescindíveis para que possam ser propostas ações que possibilitem a recuperação da diversidade genética de *Z. jahu*.

5. Agradecimentos

Ao Nupelia-UEM pelo suporte financeiro e logístico, à FURNAS Centrais Elétricas pelas coletas do rio Manso, e a CAPES pelo suporte financeiro. Ao Professor Carlos Sérgio Agostinho da Universidade Federal do Tocantins pelas coletas de “jaú” no rio Tocantins.

6. Referências

Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Suzuki, H.I., Júlio, Jr H.F., 2003. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil, in: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status*. World Fisheries Trust – The World Bank, Ottawa, pp. 19-98.

Alves, C.B.M., 2006. Jaú (*Zungaro jahu*): Um peixe mais ameaçado que os outros? *Boletim sociedade Brasileira de Ictiologia*. 83, 4-5.

Avise, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*, second ed. Sinauer Associates Inc. Publisher, Sunderland, Ma.

Betancur, R., Acero, A., Bermingham, E. and Cooke, R., 2007. Systematics and biogeography of New World sea catfishes (Siluriformes: Ariidae) as inferred from mitochondrial, nuclear, and morphological evidence. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 339-357.

Faber, J.E., Stepien, C.A., 1977. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae, in: Kocher, T.D, Stepien, C.A. (Eds.), *Mol. Syst. Fishes*. Academic Press, New York, pp. 129-143.

FAO., 2004. *State of World Fisheries and Aquaculture*. FAO Fisheries Department, Roma.

Froese, R., Pauly, D., 2007. FishBase. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (10/2007).

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. PhyML - A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704.

Graça, W.J., Pavanelli, C.S., 2007. Peixes da planície de inundação do alto rio Paraná e áreas adjacentes. EDUEM, Maringá.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., Galetti Jr., P.M., 2006. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica*. 126, 513-517.

Hubert, N., Renno, J.-F., 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*. 33, 1414–1436.

IUCN Red List of Threatened Animals disponível em 10/09/2007, no site: http://www.wcmc.org:80/species/animals/animal_redlist.html

Lundberg, J.G., Littmann, M.W., 2003. Família Pimelodidae, in: Reis, R.E., Kullander S.O., Ferraris, S.J. (Eds.), Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 432-446.

Lowe, T.M., Eddy, S.R., 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955-964.

Marceniuk, A.P., Menezes, N.A., 2007. Systematics of the family Ariidae (Ostariophysi, Siluriformes), with a redefinition of the genera. *Zootaxa* 1416, Magnolia Press, New Zealand.

Machordom, A., Doadrio, I., 2001. Evolutionary history and speciation modes in the cyprinid genus *Barbus*. *Proc. Royal Society London*. 268, 1297-1306.

Meyer, A., 1994. DNA technology and phylogeny of fish, in: Beaumont, A.R. (Ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London, pp. 219-249.

Ministério do Meio Ambiente, 2007. Biodiversidade e Florestas: Espécies ameaçadas. Disponível em <http://www.mma.gov.br>.

Monesi, N., Jacobs-Lorena, M., Paçó-Larson, M.L., 1998. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 10, 559-569.

Montoya-Burgos, J.I., 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.* 12, 1855-1867.

Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press Inc., New York.

Okada, E.K., Agostinho, A.A., Gomes, L.C., 2005. Spatial and temporal gradients in artisanal fisheries of a large Neotropical reservoir, the Itaipu Reservoir, Brazil. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 62, 714-724.

Oliveira, A.V., Prioli, A.J., Prioli, S.M.A.P., Bignotto, T.S., Júlio Jr, H.F., Carrer, H., Agostinho, C.S., Prioli, L.M., 2006. Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization. *J. Fish Biol.* 69, 260–277.

Perdices, A., Doadrio, I., 2001. The Molecular Systematics and Biogeography of the European Cobitids Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Mol. Phyl. Evol.* 19, 468–478.

Perioto, P.S., 2004. Variabilidade Genética do Complexo *Hoplias* aff. *malabaricus* Acessada com Marcadores Moleculares Nucleares e Mitocondriais. Maringá, 2004. 82f., il, Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento). Universidade Estadual de Maringá.

Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., Júlio Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M., Prioli, L.M., 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.* 25, 421-430.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14, 817-818.

Räsänen, M.E., Linna, A.M., Santos, J.C.R., Negri, F.R., 1995. Late Miocene tidal deposits in the Amazonian foreland basin. *Science.* 269, 386–390.

Samonte, I.E., Satta, Y., Sato, A., Tichy, H., Takahata, N., Klein, J., 2007. Gene Flow between Species of Lake Victoria Haplochromine Fishes. *Mol. Biol. Evol.* 24, 2069–2080.

- Silvano, R., Oyakawa, O., Amaral, B., Begossi, A., 2001. Peixes do Alto Rio Juruá (Amazônia, Brasil). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Silfvergrip, A.M.C., 1992. *Zungaro*, a senior synonym of *Paulicea* (Teleostei: Pimelodidae). Ichthyol. Explor Freshwaters. 3, 305-310.
- Sivasundar, A., Bermingham, E., Orti, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. Mol Ecol. 10, 407-417.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods Version 4. Sinauer Associates, Inc. Publisher, Sunderland, Ma.
- Sullivan, J.P., Lundberg, J.G., Hardman, M., 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear genome sequence. Mol. Phylogenet. Evol. 41, 636 – 662.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24, 1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22, 4673-4680.
- Vrijenhoek, R.C., 1998. Conservation genetics of freshwater fish. J. Fish Biol. 53, 394-412.
- Watanabe, K., Nishida, M., 2003. Genetic population structure of Japanese bagrid catfishes. Ichthyol. Res. 50, 140-148.

CAPÍTULO 2

Diversidade Nucleotídica Mitocondrial de Populações Naturais de *Zungaro jahu* (Pisces, Siluriformes, Pimelodidae)

Running Title: Diversidade Nucleotídica de *Zungaro jahu*.

Resumo

O “jaú”, *Zungaro jahu*, é um dos maiores peixes migradores da bacia do rio Paraná. Este sempre foi um peixe encontrado com relativa abundância nesse rio, mas após a construção de uma série de barragens tem-se registrado uma diminuição do tamanho efetivo da população. O objetivo desse trabalho foi avaliar a variabilidade e a estruturação genética das populações de “jaú” do alto rio Paraná e da bacia do rio Paraguai através do genoma mitocondrial. A AMOVA e o F_{ST} detectaram a identidade das duas subpopulações, que não estão diferenciadas geneticamente, ou seja, apresentam uma baixíssima variabilidade genética. Esse fato deve estar relacionado ou ao efeito fundador ou ao efeito *bottleneck*. Como *Z. jahu* é endêmico da bacia Paraná-Paraguai, esses resultados indicam que com a extinção local no rio Paraná, só restarão indivíduos dessa espécie no rio Paraguai, com grandes problemas de sobrevivência causados pela falta de diversidade genética.

Palavras-chave: *Zungaro*; jaú; marcadores moleculares; bacia do rio Paraná; rio Paraguai.

Abstract

Zungaro jahu (known as “Jaú”) is among the largest migratory fishes in the Paraná River basin. The species has usually been relatively abundant in this river. However, after the enclosure of several dams, a considerable decline on population size was recorded. The aim of this paper is evaluating the genetical variability and structure of *Zungaro jahu* populations of the upper Paraná River and the Paraguay River basins through mitochondrial genome. AMOVA and F_{ST} detected the identicalness of both subpopulations, deonstrating that they are not genetically different, i.e., present a very low genetical variability. This fact may be related to the founder or bottleneck effects. As *Z. jahu* is an endemic species of the Paraná-Paraguay basin, these results indicate that if this species disappear from Paraná River, due to reservoir building, remaining individuals will be located only in Paraguay River, with many survival difficulties caused by low genetical diversity.

Key-words: *Zungaro*; jaú, molecular makers; Paraná River basin; Paraguai river.

1. Introdução

Os recursos genéticos de animais aquáticos ainda são pouco conhecidos no Brasil e, ao mesmo tempo, encontram-se cada vez mais ameaçados por drásticas alterações ambientais antropogênicas. Os represamentos são considerados a maior fonte pontual de interferência do homem nos regimes hídricos naturais (Agostinho et al., 1992). Muitas das espécies migradoras realizam grandes deslocamentos populacionais de uma região para outra, devido a comportamentos reprodutivos e alimentares. Logo, a construção das barragens exerce impacto direto sobre estas espécies.

A cadeia de barragens construídas ao longo da bacia do rio Paraná contribuiu para a redução do volume de captura de várias espécies migradoras. Entre estas podem ser citadas *Zungaro jahu* (“jaú”, antigo *Paulicea luetkeni*), *Salminus brasiliensis* (dourado), *Brycon orbignyanus* (piracanjuba), *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) entre outras (Agostinho et al., 2003). Atualmente, estas são esporadicamente capturadas nos rios Paranaíba, Grande, Tietê e Paranapanema. Algumas delas já foram consideradas abundantes com importância pesqueira, principalmente a artesanal.

Zungaro jahu é uma espécie de Siluriformes pertencente à família Pimelodidae. Esse peixe tem um comportamento piscívoro e migratório, com fertilização externa, e habitam poços profundos de ambientes lóticos. Os juvenis são, normalmente, capturados nos reservatórios. Apesar de *Z. jahu* ainda não ser considerado uma espécie criticamente em perigo, ou em perigo, essa espécie corre risco de extinção a médio prazo, em função do declínio populacional e da fragmentação da sua área de ocupação (Fonte : [IUCN Red List of Threatened Animals](#)).

Segundo Agostinho et al. (2003) e Okada et al. (2005), os estoques de “jaú” têm diminuído drasticamente nas últimas décadas. Isso é devido, provavelmente, pela pesca de indivíduos de tamanho ainda muito reduzido, e/ou por efeitos negativos causados pelas barragens construídas. Uma provável decorrência da diminuição do tamanho efetivo da população é a perda parcial da variabilidade genética. Populações com base genética estreita tendem a apresentar maior suscetibilidade aos distúrbios ambientais.

Além do frágil *status* de conservação do “jaú”, sua biologia e ecologia ainda são muito pouco conhecidas (Agostinho et al., 2003, Resende, 2003), principalmente relacionadas à sua característica migratória. Ainda, dados mostram que desde 1997 até a presente data, poucos exemplares da espécie foram coletados pela equipe de ictiologia da UNIOESTE, em Toledo-PR (S. Makrakis, comunicação pessoal). Da mesma forma, as informações sobre a produção da pesca profissional no reservatório de Itaipu revelam a diminuição da pesca de “jaú” desde o início da década de 90 (Okada et al., 2005).

As duas espécies válidas para o gênero *Zungaro* são *Z. jahu* e *Z. zungaro*. A espécie Amazônica, *Z. zungaro*, está na lista do Ministério do Meio Ambiente (2004) como “sobre-explorada” ou “em perigo por sobre-exploração” no Brasil. Entretanto, a espécie ameaçada é, na verdade, *Z. jahu* (Alves, 2006). Portanto, a inclusão da espécie *Z. zungaro* ao invés de *Z. jahu* foi um erro que precisa ser reparado urgentemente. Ademais, *Z. jahu* também está listado como espécie vulnerável em dois estados, Minas Gerais e Paraná (Machado et al., 1998).

Os marcadores permitem a estimação de parâmetros genético-populacionais para avaliação do fluxo gênico, diferenciação e distância genética entre populações ou espécies. Várias regiões do DNA mitocondrial são utilizadas para estudos populacionais. A região conhecida como *D-loop*, ou região controle, tem cerca de 0,8 kb, e é responsável pelo controle da replicação do mtDNA e transcrição do RNA (Awise et al., 1987, Park e Moran, 1994). Uma vez que mutações acumulam-se mais rapidamente na região controle, esta é a melhor para estudos genético-populacionais e evolutivos entre espécies aparentadas muito próximas e entre populações (Meyer, 1994, Faber e Stepien, 1977, Sivasundar et al., 2001, Awise, 2004). De outra maneira, a região codificadora do gene da *ATPase 6* é um pouco mais conservada entre indivíduos de uma mesma espécie.

Logo, o conhecimento da variabilidade e estrutura genética de populações de *Zungaro* é fundamental para a compreensão dos impactos causados pela sobrepesca, além de gerar informações, ainda inexistentes, sobre a genética do grupo. Para isso foram avaliadas a variabilidade e a estruturação genética de populações de “jaú” do alto rio Paraná e do rio Manso, na bacia do rio Paraguai, com marcadores moleculares do genoma mitocondrial.

2. Metodologia Detalhada

Material Biológico e Locais de Coleta

Foram coletados exemplares identificados como *Zungaro jahu* na planície de inundação do alto rio Paraná e no reservatório de Itaipu, além de indivíduos do rio Manso, localizado na bacia do rio Paraguai (Figura 1).

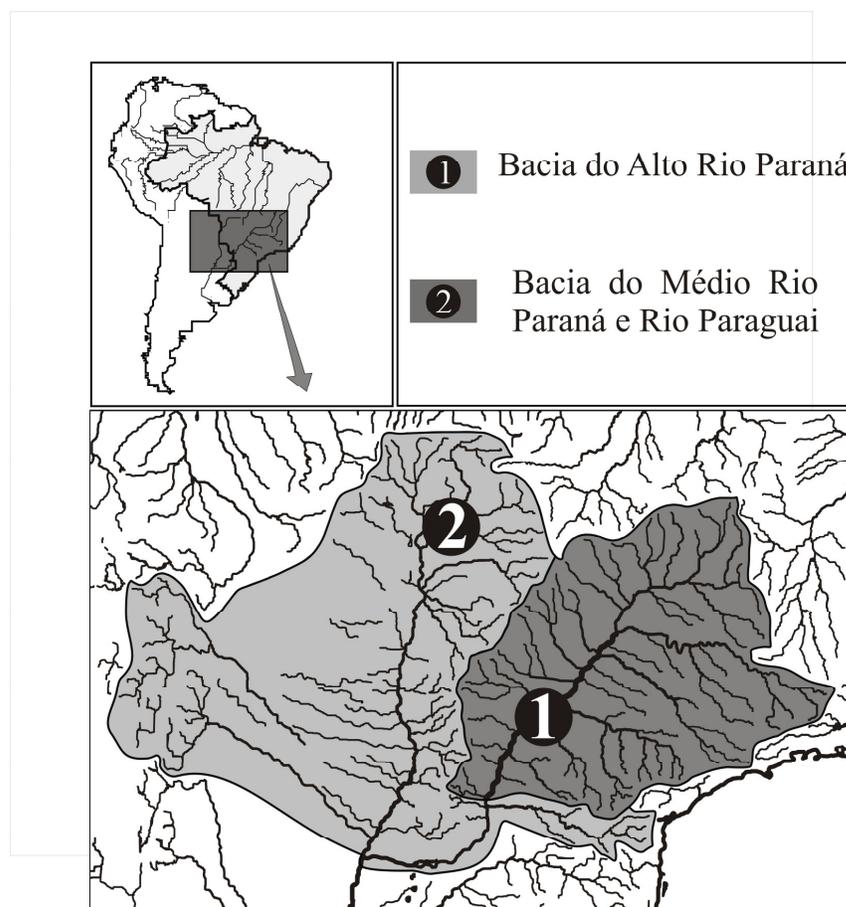


Figura 1. Área de coleta de “jaú” (*Zungaro jahu*). Os números correspondem aos pontos de coleta: (1) Planície de inundação do alto rio Paraná (região de Porto Rico-PR); (2) Itaipu – município de Guaíra-PR.

- **Planície inundação do alto rio Paraná.** O Núcleo de Pesquisas em Limnologia, Ictiologia e Aqüicultura – Nupélia – da Universidade Estadual de Maringá possui uma base avançada no município de Porto Rico (PR) (22° 47' 37" Sul e 53° 19' 03" Oeste). Esta área localiza-se imediatamente a jusante da barragem de Porto Primavera, cerca de 200 km a montante do remanso do reservatório de Itaipu, e pertence ao terço inferior do alto rio Paraná. Este constitui-se no único trecho do rio com leito ainda não

represado. Do lado do Estado do Mato Grosso do Sul, encontra-se a planície de inundação do alto rio Paraná, constituída por intensa rede de canais secundários, o rio Baía e os cursos inferiores de rios marginais e várzeas. Antes da formação do reservatório de Porto Primavera a área era freqüentemente alagada na época chuvosa do ano. Atualmente as inundações estão dependentes da abertura de comportas de usinas situadas à montante da planície.

- **Rio Manso.** Este rio está localizado na sub-bacia do rio Paraguai. As coletas serão realizadas na área de influência da APM Manso de Furnas Centrais Elétricas S/A, que está localizada no rio Manso, na chapada dos Guimarães, estado de Mato Grosso.

Uma amostra dos indivíduos, imediatamente após as coletas, foram fixados para sua preservação, em frascos com álcool etílico comercial, e mantidos a -20 °C. Foram analisados, no total, 10 indivíduos do rio Paraná e 11 do Rio Manso.

Extração de DNA

O DNA total foi extraído de tecido muscular segundo a metodologia baseada em fenol/clorofórmio (Monesi et al., 1998), seguida pela precipitação com acetato de sódio e etanol absoluto gelado. Após o período de incubação, 12-24 horas, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 13.000 rpm e o sobrenadante descartado. O *pellet* obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em 30 µL de tampão TE (Tris-HCl 1 mM pH 8, EDTA 0,1 mM). O DNA, assim como as amostras de peixes, foram armazenado em *freezer* a -20 °C.

As amostras foram quantificadas por comparação com concentrações de DNA fago λ conhecidas, em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e fotografado por um sistema de EDAS 290 (*Kodak 1D Image Analysis 3.5*).

Região controle (*D-loop*) e ATPase6 do DNA mitocondrial

A metodologia de amplificação dos fragmentos de mtDNA via PCR, foi realizada a partir de amostras de DNA total baseada em Prioli et al. (2002). Duas

regiões do genoma mitocondrial foram utilizadas. Um destes fragmentos, amplificado pelo par de *primers* H1091 e L15774 é constituído pelas seqüências dos genes *tRNA^{Pro}* e *tRNA^{Thr}*, que codificam os tRNAs dos aminoácidos prolina e treonina respectivamente, além de um pedaço da região *D-loop*. Essa região é constituída por um fragmento que contem a seqüência hipervariável 5' da fita pesada da região controle da molécula do DNA mitocondrial. O outro fragmento, de 1000 pb, amplificado pelos *primers* H8331 (5'-AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC-3') e L9236 (5'-GTTAGTGGTCAKGGGCTTGGRTC-3') amplifica a região dos genes da *ATPase 6 e 8* e um pedaço do *tRNA^{Lys}*.

Estes fragmentos foram amplificados em duas reações independentes de PCR para depois serem seqüenciados e analisados, utilizando réplicas. O volume da reação foi de 25 µL, constituído de Tris-KCl (20 mM Tris-HCl pH 8,4 com 50 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 2,5 µM de cada *primer*, 0,1 mM de cada dNTP, 2,5 U de *Taq* DNA polimerase, 15 ng de DNA e água deionizada e filtrada em equipamento Milli-Q para completar o volume para 25 µL.

As amplificações dos fragmentos de interesse foram executadas em termociclador por 40 ciclos, com os seguintes perfis de temperatura: um ciclo inicial de quatro minutos a 94 °C seguido de 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a 59 °C e dois minutos a 72 °C, e um último ciclo de 10 min a 72 °C. A eficiência da amplificação foi confirmada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo (20 µg/100 mL) e pela comparação dos fragmentos com quantidades conhecidas de DNA do marcador de peso molecular *Ladder* 100 pb (Invitrogen).

Seqüenciamento

Após as quantificações, os fragmentos obtidos foram amplificados, utilizando as mesmas concentrações dos reagentes, bem como o programa de acordo com as instruções do fabricante, com os *primers* L8331, para a região da *ATPase 6*, e L15774 para a região *D-loop*. Aproximadamente, 50 ng de DNA do produto final de cada reação de PCR foram usados diretamente em reações de seqüenciamento de nucleotídeos em um seqüenciador automático MegaBace (Amersham).

As seqüências nucleotídicas, sob o formato de cromatograma, foram alinhadas utilizando-se o CLUSTAL W (Thompson et al., 1994) e editadas manualmente com o programa BIOEDIT (Hall, 1999). O número de nucleotídeos

polimórficos e as distâncias-p foram calculadas com o programa MEGA 4.0 (Tamura et al., 2007). As matrizes de distância-p, para as duas regiões do genoma mitocondrial, foram utilizadas para o agrupamento com o algoritmo *neighbor-joining*. Análises de *bootstrap* foram baseadas em 1.000 reamostragens.

Admitindo-se que o significado evolutivo das deleções em seqüências do DNA não é bem conhecido (Nei e Kumar, 2000), não foram incluídas nas análises os sítios com deleção em cada uma das comparações entre indivíduos, tomados dois a dois.

Relações filogenéticas foram obtidas através dos modelos evolutivos que foram selecionados utilizando-se os programas PAUP 4.0 (Swofford, 2002) e MODELTEST 3.7 (Posada e Crandall, 1998). Para isso os procedimentos Akaike Information Criterion corrigido (AICc) e Bayesian Information Criterion (BIC) foram utilizados. Os modelos evolutivos HKY+I foi escolhido como sendo o melhor para o ajuste dos dados da *D-loop* por máxima verossimilhança. Com o programa PHYML (Guindon e Gascuel, 2003) foram obtidas as relações filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais. Empregou-se o método da máxima verossimilhança, baseados em 500 reamostragens, com os modelos mencionados acima.

As diversidades haplotípicas (h ; Nei, 1987) e nucleotídicas (π ; Nei, 1987) foram calculadas pelo Arlequin 3.1 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>). As divergências genéticas dos indivíduos tomados dois a dois entre as duas populações foram estimadas usando o índice F_{ST} (Excoffier et al., 1992) e o teste de significância foi baseado em 10.000 permutações. A variabilidade genética entre populações foi testada usando-se análises hierárquicas de variância molecular, AMOVA (Excoffier et al., 1992), calculadas no Arlequin 3.1.

Seqüências do GenBank

Seqüências de quatro indivíduos *Brachyplatystoma rousseauxii* foram selecionadas no *GenBank* e analisadas. Essas seqüências correspondem à mesma região do *D-loop* seqüenciada de “jáú” e foram utilizadas para possíveis comparações de distâncias genéticas. Todas as seqüências foram alinhadas e só os mesmos pares de bases da região *D-loop* foram considerados. Os números de acesso no *GenBank* das seqüências utilizadas são: DQ779043, DQ779044, DQ779045 e DQ779046.

3. Resultados

Após o seqüenciamento foi obtida uma seqüência da região *D-loop* com, aproximadamente, 2000 pares de bases (pb), contendo os tRNAs da treonina e da prolina e uma parte da região hipervariável *D-loop*. Após a edição, fragmentos menores, de 356 pb do início da região *D-loop*, e de 140 pb correspondentes aos dois tRNAs, contendo boa qualidade de seqüenciamento foram utilizados nas análises de divergência genética. As seqüências dessa região foram confirmadas, por similaridade, com acessos disponíveis no *GenBank*. Além disso, as seqüências foram analisadas pelo programa tRNA-Scan-SE (Lowe e Eddy, 1997) que identificou a região dos genes *tRNA^{Pro}* e *tRNA^{Thr}*. As seqüências da região desses genes foram idênticas para indivíduos de “jaú” das duas localidades, rio Paraná e rio Manso.

Assim como o esperado para essa região do mtDNA, a proporção de bases AT foi maior que a de nucleotídeos CG. As diferenças nucleotídicas entre as seqüências da região *D-loop* de *Zungaro jahu* das duas localidades foram muito pequenas, demonstrando baixa variabilidade genética entre essas populações. A Tabela 1 apresenta os números e as porcentagens (distância-*p*) de sítios nucleotídicos polimórficos para essa região de indivíduos comparados dois a dois. Essas diferenças variaram de zero a quatro (0,8%) sítios polimórficos.

Para comparações de valores, a Tabela 2 apresenta esses valores, em número e em porcentagem, de sítios polimórficos da mesma região do *D-loop* de indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*. Os polimorfismos registrados para essa região variaram de 0,6 a 2,0 % entre indivíduos da mesma espécie, quando comparados dois a dois. As diferenças entre os indivíduos de “jaú” das duas localidades são compatíveis com as encontradas entre indivíduos da mesma espécie do gênero *Brachyplatystoma*.

Tabela 1. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos polimórficos da região *D-loop* (~356 pb) que discriminam indivíduos de *Zungaro jahu* do rio Manso (MS) e do alto rio Paraná (PR).

Espécie	MS04	MS05	MS06	MS09	PR05	PR06	PR08	PR13
MS04	—	0,3	0,3	0,3	1,1	0,3	0,3	0,8
MS05	1	—	0,0	0,0	0,8	0,0	0,0	0,6
MS06	1	0	—	0,0	0,8	0,0	0,0	0,6
MS09	1	0	0	—	0,8	0,0	0,0	0,6
PR05	4	3	3	3	—	0,8	0,8	0,3
PR06	1	0	0	0	3	—	0,0	0,6
PR08	1	0	0	0	3	0	—	0,6
PR13	3	2	2	2	1	2	2	—

Tabela 2. Número (abaixo da diagonal) e porcentagem (acima da diagonal) de sítios nucleotídicos que discriminam indivíduos de *Brachyplatystoma rousseauxii*, através da região *D-loop* (~356 pb).

Espécie	<i>B. rousseauxii</i> 1	<i>B. rousseauxii</i> 2	<i>B. rousseauxii</i> 3	<i>B. rousseauxii</i> 4
<i>B. rousseauxii</i> 1	—	1,4	0,6	1,1
<i>B. rousseauxii</i> 2	5	—	0,8	2,0
<i>B. rousseauxii</i> 3	2	3	—	1,1
<i>B. rousseauxii</i> 4	4	7	4	—

Essas relações entre os haplótipos podem ser melhor visualizadas pelos dendrogramas apresentados nas Figuras 2 e 3. O dendrograma da Figura 2 foi construído a partir das distâncias-*p* da região *D-loop* de indivíduos de “jaú” dos rios Paraná e Manso e de indivíduos *B. rousseauxii*. Percebe-se claramente que os indivíduos *Z. jahu* das duas localidades apresentam muito poucas diferenças, que, certamente, são polimorfismos entre indivíduos de uma mesma espécie. Nota-se ainda que essas diferenças não são características para as regiões de

coleta dos indivíduos, rios Paraná e Manso. Esses indivíduos não apresentam uma separação clara entre as duas regiões, demonstrando um parentesco entre as populações. Além disso, fica evidente uma baixa diversidade genética entre as populações desses rios.

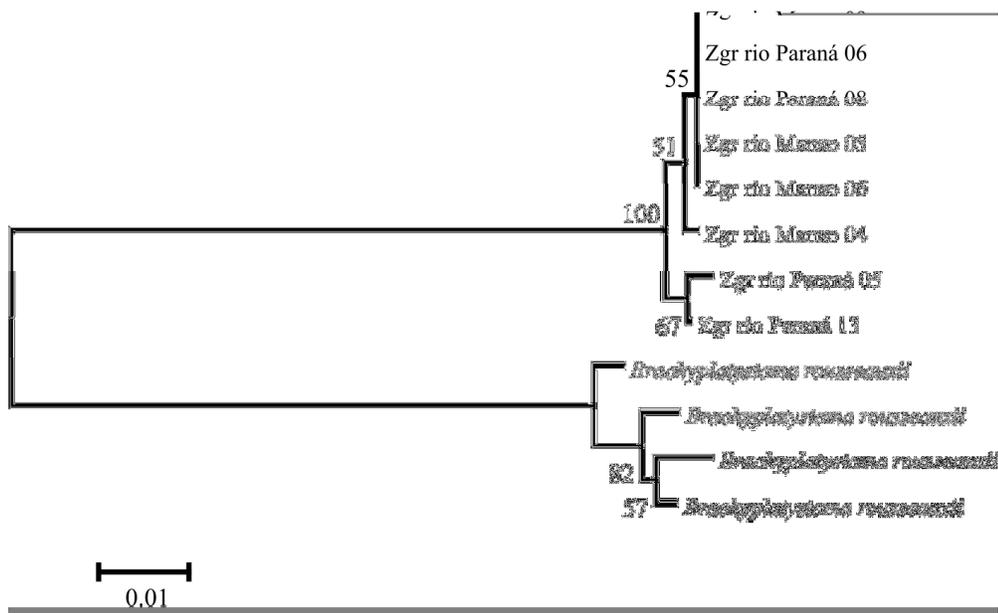


Figura 2. Dendrograma das distâncias- p da região *D-loop* de indivíduos de “jaú” (*Z. jahu*) coletados nos rios Paraná (ZgrPR) e Manso (ZgrMS) e de quatro indivíduos da espécie *B. rousseauxii*, obtidas no GenBank.

As análises filogenéticas a partir das seqüências da região *D-loop* de indivíduos de “jaú” das duas localidades, além de indivíduos *B. rousseauxii*, geraram o dendrograma da máxima-verossimilhança apresentado na Figura 3. O Modelo selecionado pelo Modeltest 3.0 foi o HKY+I. O gráfico confirma os resultados já descritos para essa região do DNA mitocondrial, evidenciando a baixa variabilidade entre as populações de *Z. jahu*.

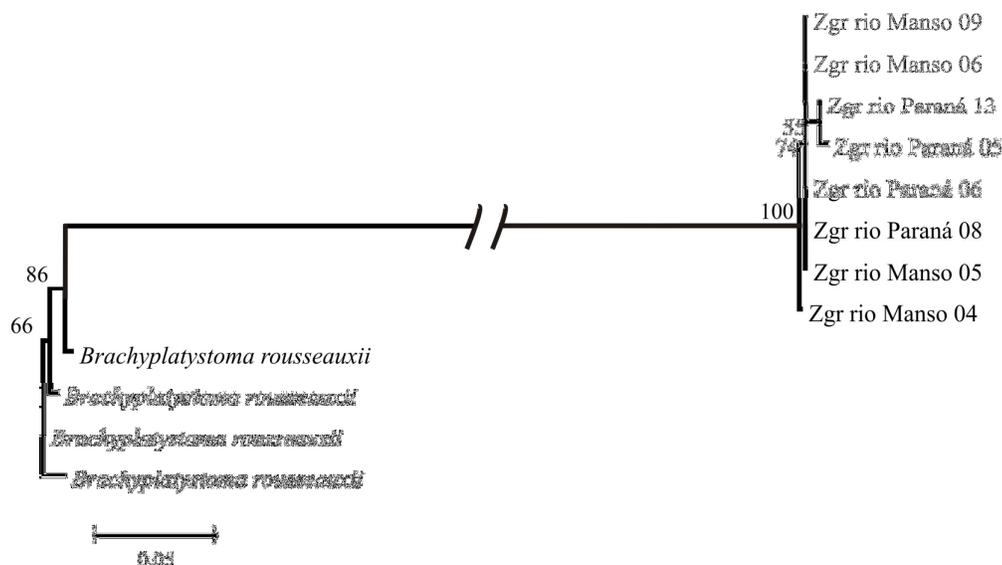


Figura 3. Dendrograma de máxima-verossimilhança construído com o modelo HKY+I (parâmetros: Nst=2; TRatio=11,4902; Pinvar=0,7431), a partir de seqüências nucleotídicas do *D-loop* de quatro indivíduos de *B. rousseauxii*, obtidas no GenBank, e de indivíduos de “jaú” coletados nos rios Manso (ZgrMs) e Paraná (ZgrPR).

A região da *ATPase 6* do mtDNA é codificadora e, normalmente, muito mais conservada que a região hipervariável *D-loop*. Após o seqüenciamento uma seqüência de, aproximadamente 1000 pb foi obtida, mas com alguns pedaços de má qualidade. Assim, uma seqüência menor do início do gene da *ATPase 6*, contendo 204 pb, foi analisada. Essas seqüências foram analisadas por similaridade com acessos disponíveis no *GenBank*. Foram seqüenciados e analisados nove indivíduos de “jaú” do rio Paraná e 11 do rio Manso. Após a edição das seqüências o alinhamento apontou apenas dois pontos de substituições nucleotídicas nos indivíduos do rio Paraná ZgrPR05 e ZgrPR07. Essas substituições sempre ocorreram na terceira base da seqüência de cada aminoácido, não gerando mudanças no polipeptídeo resultante dessa seqüência de bases. Ou seja, não houve substituição aminoacídica para essa região da *ATPase 6*.

A tabela 3 apresenta as diversidades genéticas e o teste de neutralidade para as duas populações de “jaú” analisadas, e também os valores das análises para a população como um todo. As populações do Paraná e do Manso apresentam diversidade haplotípica na região *D-loop* acima de 0,5 e diversidade nucleotídica de valores próximos ou menores que 0,5%.

Tabela 3. Diversidades haplotípica e nucleotídica da região *D-loop* de populações de *Z. jahu* do rio Manso e do rio Paraná. **n** = amostras; **NH** = Número de haplótipos; **h** = diversidade haplotípica, **π** = diversidade nucleotídica.

Populações	n	NH	<i>H</i>	π
Manso	4	2	1,00 ±0,18	0,0014 ±0,0017
Paraná	4	3	1,00 ±0,18	0,0052 ±0,0044
Total	8	4	1,00 ±0,06	0,0038 ±0,0030

Fica clara a não diferenciação entre as populações das duas regiões geográficas, rio Manso e rio Paraná. Além desse resultado estar explícito nos dendrogramas, eles são reafirmados pelas análises de diferenciação populacional, AMOVA (Tabela 4). Os valores obtidos do F_{ST} para as populações não foram significativos indicando não haver uma diferenciação entre essas populações. A maior parte da variação está dentro de cada população.

Tabela 4. Resultados da AMOVA entre as populações de *Z. jahu* do rio Manso e do rio Paraná baseada nas seqüências da região *D-loop*.

Fonte de Variação	Variância	% da Variação	Estatística F	P
Entre Populações	0,167	22,22	$F_{ST} = 0,222$	0,183 ^{NS}
Dentro de Populações	0,583	77,78		

4. Discussão

A fauna de origem amazônica do Paraná médio e inferior deve ter sido formada a partir das populações do rio Paraguai e suas possíveis ligações com os rios Madeira e Guaporé. Uma outra rota, menos provável, seria a migração de peixes da bacia do rio Amazonas para as cabeceiras do alto rio Paraná. Em seguida, após a colonização da bacia do alto rio Paraná, teriam migrado para o Paraná médio e a bacia do Paraguai.

Em favor da hipótese de passagem pelas cabeceiras do rio Paraguai está a própria distribuição da ictiofauna na bacia Paraná-Paraguai. De fato, alguns trabalhos demonstraram que espécies de peixes de origem amazônica, como cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e arraias, não eram encontradas no alto rio Paraná. Pelo menos até a formação do reservatório de Itaipu, os Saltos de Sete Quedas formavam uma barreira natural para essas populações (Agostinho et al, 1992). Outro forte argumento é dado por Lovejoy e Araújo (2000) em um estudo de sistemática molecular, biogeografia e estrutura populacional de *Potamorrhaphis*, onde foi encontrada uma íntima relação entre os haplótipos do rio Manu, bacia do rio Madeira, Amazonas, e do rio Paraná. Os autores concluíram que essa relação refletiu uma relação histórica entre o alto Madeira e o Paraná.

Zungaro jahu é um peixe que consegue vencer fortes correntezas e passar por obstáculos para sua migração e reprodução. Mesmo que Sete Quedas representasse uma importante barreira geográfica, em alguns momentos ocorriam cheias tão grandes que quase nivelavam o médio e o alto rio Paraná. Em períodos de grande inundação, indivíduos dessa espécie devem ter conseguido subir Sete Quedas e colonizar o alto rio Paraná, a partir do Paraná médio.

Quando foi construída a barragem de Itaipu, 150 km do médio Rio Paraná foram alagados e passaram a ter continuidade com o Alto Paraná. Além da transposição de “jaú” por Sete Quedas, que poderia ser periódica, a submersão permitiu uma mistura das populações que estavam, pelo menos parcialmente, geográfica e naturalmente separadas. A AMOVA e o F_{ST} detectaram a identidade das duas subpopulações, que não estão diferenciadas geneticamente. Na bacia Paraná-Paraguai, portanto, existe uma única população de *Z. jahu*, espacialmente homogênea.

Atualmente, a espécie que reside na bacia Paraná-Paraguai, incluindo o alto rio Paraná, é *Zungaro jahu*, enquanto na Amazônia é encontrada a espécie *Zungaro zungaro*, conforme Boni (neste volume), confirmando a interpretação de Lundberg e Littmann (2003). Evidentemente, a configuração filogeográfica atual é resultante de dispersão de *Z. jahu* por toda a bacia Paraná-Paraguai muito depois do estabelecimento da população inicial e a especiação. Caso contrário seria preciso admitir que *Z. jahu* fosse também uma espécie amazônica atualmente extinta na bacia, o que parece ser pouco provável.

Os resultados apresentados sugerem uma alta similaridade genética entre as populações de *Z. jahu* dos rios Paraná e Manso. A região *D-loop* normalmente apresenta uma variação considerável entre indivíduos próximos, e até mesmo entre indivíduos de uma mesma população. Nesse caso, as diferenças genéticas verificadas estão em patamares ainda mais baixos que os detectados, usualmente, entre populações de uma mesma espécie. Isso demonstra que as populações de “jaú” desses dois ambientes mantêm um contato genético e não apresentam variabilidade genética considerável.

A homogeneidade genética constatada pode estar relacionada a um dos dois fatores: efeito fundador ou efeito *bottleneck*. Na primeira possibilidade, os indivíduos que deram origem as populações de “jaú” das bacias dos rios Paraguai e Paraná teriam uma base genética restrita. Ou seja, a baixíssima variabilidade genética entre as populações do Manso e do Paraná, pode ser resultado de um efeito fundador. Dessa forma, poucos indivíduos conseguiram se estabelecer nas cabeceiras do alto rio Paraguai por migração da população amazônica. Isso seria justificado por possíveis ligações existentes no passado entre as bacias dos rios Amazonas e Paraguai, que permitiria a migração. Em seguida, a população apresentou um aumento populacional com baixa variabilidade genética. A desvantagem dessa hipótese explicativa é que entre a possível migração e o estabelecimento da distribuição haplotípica atual, o intervalo de tempo, e de gerações, deve ter sido longo o suficiente para especiação. Nesse período poderia ter se acumulado variabilidade genética em maior escala.

A outra possível explicação para a baixa variabilidade poderia ser algum evento no passado, que tenha resultado na diminuição da população e, conseqüentemente, redução da variabilidade, em um típico efeito *bottleneck*. Essa diminuição resultou em uma baixa variabilidade genética e a população que

conseguiu vencer a barreira de Sete Quedas já teria trazido para o alto rio Paraná uma diversidade genética restrita. Essa explicação está respaldada nos resultados obtidos.

Além dos moderados valores de diversidade haplotípica, baixos valores de diversidade nucleotídica foram encontrados na análise das duas populações em conjunto. É interessante notar que a grande maioria das mutações encontradas são transições, que, somadas ao número de mutações entre haplótipos, que usualmente diferem por um única substituição nucleotídica, podem caracterizar um processo relativamente recente. Segundo Grant e Bowen (1998), altos valores de h (acima de 0.5) e baixos valores de π (menores que 1%) são indicativos de populações que sofreram *bottleneck*, seguido de crescimento populacional e acúmulo de mutações.

Com a formação do reservatório, o rio Paraná deixou de ser, ao mesmo tempo, um ambiente próprio para o desenvolvimento de “jaú”. Isto se deve aos vários barramentos do Rio Paraná, o que dificultou a migração e desova desta e de outras espécies que tem seu ciclo reprodutivo caracterizado por essas migrações. Isto resultou em uma diminuição drástica nos estoques de *Z. jahu*, sendo em muitos trabalhos chamada a atenção para o perigo de extinção local dessa espécie. Esse fato agravou a situação dessa população, que provavelmente já apresentava uma baixa variabilidade genética e agora ainda tem um número restrito de indivíduos.

Além dessa baixa variabilidade genética de *Z. jahu* que foi causada ou pela colonização por poucos casais ou por um efeito de redução populacional, um outro fato tem gerado efeitos graves nas populações. Com o impacto potencial que as espécies nativas têm sofrido, os estoques de reprodutores podem ser uma alternativa para a recuperação da diversidade genética, promovendo a manutenção dos recursos genéticos, principalmente quando existe risco de extinção (Koljonen et al., 2002; Barroso et al., 2005). Muitas usinas hidroelétricas e também algumas pisciculturas comerciais, estimuladas por órgãos governamentais, vêm realizando soltura de alevinos no ambiente com objetivo de povoar ou repovoar os rios. Segundo informações da CESP (EHA Jupia), existem criações em tanques de piscicultura de *Z. jahu* para repovoamento. A CEMIG Geração e Transmissão, segundo o biólogo responsável João Lopes, também

está trabalhando com a reprodução desta espécie em cativeiro na Estação de Piscicultura de Volta Grande.

Sem um respaldo científico, normalmente, esses peixes são provenientes de poucos casais devido à alta prolificidade dos peixes, o que promove um gargalo genético (efeito *bottleneck*), levando a uma redução da variabilidade genética. Dessa forma, introduções de peixes de forma irracional, mesmo feitas com as melhores intenções, podem proporcionar uma redução ainda maior da variabilidade genética e, conseqüentemente, levar a perda de resistência a doenças e da capacidade de se adaptar em um novo ambiente (Allendorf e Phelps, 1980, Taniguchi, 2003).

Baixos níveis de diversidade genética foram encontrados para *Z. jahu*, o que pode ser um grande problema para a sobrevivência da espécie no futuro. Isso é agravado pelo fato das populações de “jaú” da bacia Amazônica serem de uma outra espécie do mesmo gênero, *Z. zungaro*. Com a extinção local das populações dessa espécie do Rio Paraná, apenas restarão indivíduos de *Z. jahu* na bacia do rio Paraguai, mas com uma baixíssima diversidade genética. Esse fato deixa clara a necessidade de medidas de conservação da espécie para que, no mínimo, possa ter um maior número de indivíduos, já que a diversidade genética já está ameaçada.

5. Agradecimentos

Ao Nupelia-UEM pelo suporte financeiro e logístico e a CAPES pelo suporte financeiro. Furnas Centrais Elétricas e ao Dr. Edson Okada e equipe pelas coletas dos exemplares do rio Manso.

6. Referências

Agostinho, A.A., Júlio, Jr H.F., Borguetti, J.R., 1992. Considerações sobre os impactos dos represamentos na ictiofauna e medidas para sua atenuação. Um estudo de caso: reservatório de Itaipu. UNIMAR. 14, 89-107.

Agostinho, A.A., Gomes, L.C., Suzuki, H.I., Júlio, Jr H.F., 2003. Migratory fishes of the Upper Paraná River Basin, Brazil, in: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status. World Fisheries Trust – The World Bank. pp. 19-98.

Allendorf, F.W., Phelps, S.R., 1980. Loss of genetic variation in a hatchery stock of cutthroat trout. Transactions of the American Fisheries Society. 109, 537-543.

Alves, C.B.M., 2006. Jaú (*Zungaro jahu*): Um peixe mais ameaçado que os outros? Boletim sociedade Brasileira de Ictiologia. 83, 4-5.

Avice, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A., Saunders, N.C., 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. Ann. Rev. Ecol. Syst. 18, 489-522.

Avice, J.C., 2004. Molecular Markers, Natural History, and Evolution, second ed. Sinauer Associates Inc. Publisher, Sunderland, Ma.

Barroso, R.M, Hilsdorf, A.W.S, Moreira, H.L.M. et al., 2005. Genetic diversity of wild and cultured populations of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiformes, Characidae, Bryconiae) using microsatellites. Aquaculture. 247, 51-65.

Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro, J. M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. 131: 479-491.

Faber, J.E., Stepien, C.A., 1977. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae, in: Kocher, T.D, Stepien, C.A. (Eds.), Molecular Systematics of Fishes. Academic Press, New York, pp. 129-143.

Grant, W.S., Bowen, B.W., 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *J. of Hered.* 89, 415–426.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003. PhyML - A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696-704.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41, 95-98.

IUCN Red List of Threatened Animals disponível em 10/09/2007, no site: http://www.wcmc.org:80/species/animals/animal_redlist.html

Koljonen, M.L., Tähtinen, J., Säisä, M., Koskiniemi, J., 2002. Maintenance of genetic diversity of Atlantic salmon (*Salmo salar*) by captive breeding programmes and the geographic distribution of microsatellite variation. *Aquaculture.* 212, 69-92.

Lowe T.M., Eddy, S.R., 1997. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence. *Nucleic Acids Res.* 25, 955-964.

Lovejoy, N.R., De Araújo, M.L.G., 2000. Molecular systematics, biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. *Mol. Ecol.* 9, 259–268.

Lundberg, J.G., Littmann, M.W., 2003. Família Pimelodidae, in: Reis, R.E., Kullander S.O., Ferraris, S.J. (Eds.), *Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America*. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 432-446.

Machado, A.B.M., Fonseca, G.A.B., Machado, R.B., Aguiar, L.M.S., Lins, L.V., 1998. Livro vermelho das espécies ameaçadas de extinção da fauna de Minas Gerais. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.

Meyer, A., 1994. DNA technology and phylogeny of fish, in: Beaumont, A.R. (Ed.), *Genetics and Evolution of Aquatic Organisms*. Chapman & Hall, London, pp. 219-249.

Ministério do Meio Ambiente., 2004. Lista Nacional das Espécies de Invertebrados Aquáticos e Peixes Ameaçados de Extinção. Instrução Normativa nº 5 (21/maio/2004). Disponível em <http://www.mma.gov.br>.

Monesi, N., Jacobs-Lorena, M., Paçó–Larson, M.L., 1998. The DNA puff gene BhC4-1 of *Bradysia hígida* is specifically transcribed early prepupal salivary glands of *Drosophila melanogaster*. *Chromosoma*. 10, 559-569.

Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York, NY, USA.

Nei, M., Kumar, S., 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Inc, New York.

Okada, E.K., Agostinho, A.A., Gomes, L.C., 2005. Spatial and temporal gradients in artisanal fisheries of a large Neotropical reservoir, the Itaipu Reservoir, Brazil. *Can. J. Fish Aquatic Sci.* 62, 714-724.

Park, L.K., Moran, P., 1994. Developments in molecular genetic techniques in fisheries. *Rev. Fish Biol. and Fish.* 4, 272-299.

Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics*. 14, 817-818.

Prioli, S.M.A.P., Prioli, A.J., Júlio Jr, H.F., Pavanelli, C.S., Oliveira, A.V., Carrer, H., Carraro, D.M., Prioli, L.M., 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Gen. Mol. Biol.* 25, 421-430.

Resende, E.K., 2003. Migratory fishes of the Paraguay-Paraná Basin, excluding the Upper Paraná Basin, in: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. (Eds.), *Migratory fishes of South America: biology, fisheries, and conservation status*. World Fisheries Trust – The World Bank. pp. 99-155.

Sivasundar, A., Bermingham, E., Orti, G., 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10, 407-417.

Swofford, D.L., 2002. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony and other Methods Version 4. Sinauer Associates, Inc. Publisher, Sunderland, Ma.

Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. and Evol.* 24, 1596-1599.

Taniguchi, N., 2003. Genetic factors in broodstock management for seed production. *Rev. Fish Biol. and Fish.* 13, 175-185.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequencing weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.